VALQUÍRIA BARBOZA MARIOTTI

**Análise morfoquantitativa da matriz extra-celular da
túnica média da aorta de ratas ovariectomizadas
submetidas a exercício físico aeróbio**

**São Paulo
2009**

Valquíria Barboza Mariotti

**Análise morfoquantitativa da matriz extra-celular da túnica
média da aorta de ratas ovariectomizadas submetidas a
exercício físico aeróbio**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza

São Paulo

2009

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2098
FMVZ

Mariotti, Valquíria Barboza

Análise morfoquantitativa da matriz extra-celular da túnica média da aorta de ratas ovariectomizadas submetidas a exercício físico aeróbio / Valquíria Barboza Mariotti. – São Paulo : V. B. Mariotti, 2009.
109 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza.

1. Aorta. 2. Matriz extra-celular. 3. Estrogênios. 4. Exercício físico aeróbio. 5. Estereologia. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Análise morfoquantitativa da matriz extracelular da túnica média da aorta de ratas ovariectomizadas submetidas a exercício físico aeróbio", protocolado sob o nº1168/2007, utilizando 20 (vinte) ratos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Morphoquantitative analysis of extracellular matrix of aorta tunica media in ovariectomized female rats submitted to aerobic physical exercise", protocol number 1168/2007, utilizing 20 (twenty) rats, under the responsibility Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum" meeting.

São Paulo, 13 de janeiro de 2009

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Nome do autor: MARIOTTI, Valquíria Barboza

Título: Análise morfoquantitativa da matriz extra-celular da túnica média da aorta de ratas ovariectomizadas submetidas a exercício físico aeróbio

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Ao animal de experimentação

*O meu respeito e gratidão a quem serviu a humanidade,
dando a sua vida em favor do saber científico.*

*“A grandiosidade de uma nação e o seu progresso moral
podem ser medidos pela forma como os seus animais são
tratados”*

Mahatma Gandhi

À memória de meu pai Aldo

Meus mais profundos agradecimentos ao nosso Mestre Jesus. Com o seu exemplo de vida nos ensina e nos dá forças. Esteve e estará sempre conosco.

*“E eis que eu estou convosco todos os dias, até a consumação dos séculos”
Mateus, 28:20*

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos que cruzaram o meu caminho e que contribuíram para a concretização das páginas que se seguem.

Ao meu orientador Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza pela disponibilidade em orientar-me, confiança, generosidade, atenção, paciência e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti e à Prof^a Dra. Sílvia de Campos Boldrini pela oportunidade de trabalho no Laboratório de Anatomia Funcional Aplicada à Clínica e Cirurgia do ICB-USP. Pelos ensinamentos, generosidade, confiança e apoio.

À Coordenadora do curso de Pós-graduação da FMVZ-USP Prof^a Dr^a Maria Angélica Miglino pela oportunidade de crescimento profissional, atenção e valioso apoio.

Às amigas Lynda Jhailú Tamayo Arango, Regina de Sousa Bolina Matos, Karla Araújo e Camila Ercolini pelos ensinamentos, sugestões e colaboração nas diversas etapas deste trabalho. E especialmente pelo companheirismo, apoio e amizade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa, e a todos os seus funcionários pela cordialidade no atendimento.

Às companheiras de experimento Renata Gabriel Fontinele, Amanda Messias Vazzoler e Andrea Bogoslavsky pelo trabalho em equipe e amizade.

A Evander Bueno de Lima e Lynda Jhailú Tamayo Arango pela realização das cirurgias nos animais de experimentação e amizade.

Aos técnicos de laboratório Diogo Palermo, Sandra F. Affonso e Ronaldo Agostinho da Silva, do Laboratório de Histologia do setor de Anatomia da FMVZ-USP; Cláudio Arroyo e Luciano Bugalho do Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia da FMVZ-USP; Marta Righetti e Sônia Yokomizo, do Laboratório de Histologia do ICB-USP, pelos ensinamentos e pela valiosa contribuição na realização das técnicas histológicas.

À Dr^a Márcia Cury Cioffi e à Dr^a Priscila Viau pelos esclarecimentos quanto à realização dos exames hormonais; e ao Laboratório Rhesus pelos exames hormonais realizados.

Aos pesquisadores em Estereologia PhD. Terry M. Mayhew e PhD. Matthias Ochs pelas sugestões e ensinamentos.

Aos professores doutores Francisco Javier Hernandez-Blasquez, José Roberto Kfoury, Pedro Primo Bombonato, Tatiana Carlesso e Carlos Eduardo Ambrósio do Departamento de Cirurgia da FMVZ-USP; Cláudio Antonio Ferraz de Carvalho, Rainer Guilherme Raetinger, Richard Halti Cabral e Nadir Eunice Valverde Barbato de Prates do ICB-USP; Myriam Krasilchick da Faculdade de Educação da USP; Michele Schultz Ramos de Andrade da EACH pela colaboração na minha formação acadêmica.

À Sra. Rosana Prisco pela prestabilidade na realização da análise estatística dos dados.

A todos os colegas e amigos pós-graduandos da FMVZ-USP pelos ensinamentos durante as disciplinas cursadas, trabalho em equipe e amizade.

Ao Dr. Emerson Ticona Fioretto e à Prof. Dra. Edna Haapalainen pelas sugestões e esclarecimentos.

A todos os colegas do Laboratório de Anatomia Funcional Aplicada à Cirurgia do ICB-USP, em especial Josenberg Baptista, William Mayer, Paulo Henrique Matos, Paulo Galvanini, Isabela Ugo Luques, Carlos Eduardo Seyfert, Ricardo Fontes, Cibele Miranda, Flávia Oliveira e Flávio Tampelini, pelos ensinamentos, convivência e amizade.

Aos funcionários do biotério da FMVZ-USP Dra. Cláudia Madalena Cabrera Mori, Idalina, Herculano, Rosires e Nelson, pelos ensinamentos e colaboração.

A Prof^a Dr^a Márcia Triunfol pelos ensinamentos quanto à confecção da redação científica.

Aos funcionários e colaboradores do Departamento de Cirurgia da FMVZ-USP Maicon Barbosa da Silva, Jaqueline Martins de Santana, Alessandra Aparecida de Sousa, Belarmino Ney Pereira, Edinaldo Ribas Farias (o "Índio"), Augusto, Maise Jesus de Oliveira, Miron. À equipe de manutenção da FMVZ-USP.

Às funcionárias do Departamento de Pós-Graduação da FMVZ-USP Cláudia Lima, Joana Ferreira Dias de Vasconcelos e Dayse Maria Alves Flexa.

A toda equipe da Biblioteca Virginie Buff D'Ápice e aos funcionários do setor de Informática da FMVZ-USP pela atenção e cordialidade no atendimento.

A todos que por um lapso não foram mencionados aqui, mas que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização desta pesquisa.

E especialmente à minha mãe Olga, à minha irmã Morgana e aos meus amigos pelo apoio. E pela paciência nos momentos de ansiedade e compreensão nos momentos em que estive ausente.

*“Feliz aquele que transfere o que sabe e
aprende o que ensina”*

Cora Coralina

“A experiência é mãe de toda certeza. A sabedoria é filha da experiência. Nenhum estudo humano poderá ser chamado de ciência verdadeira se não passar pela demonstração matemática”

Leonardo da Vinci

1452 - 1519

RESUMO

MARIOTTI, V. B. **Análise morfoquantitativa da matriz extra-celular da túnica média da aorta de ratas ovariectomizadas submetidas a exercício físico aeróbico.** [Morphoquantitative analysis of extracellular matrix of aorta tunica media in ovariectomized female rats submitted to aerobic physical exercises]. 2009. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A deprivação de estrogênios tem sido descrita como uma das causas da redução da complacência arterial no organismo feminino. Por outro lado, exercícios físicos aeróbicos são amplamente indicados para o tratamento de diversas desordens do sistema cardiovascular e para redução do enrijecimento de artérias centrais em mulheres na fase de pós-menopausa. Este estudo investigou as características morfoquantitativas da matriz extra-celular da túnica média da aorta ascendente de fêmeas de *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar submetidas a exercício físico aeróbico e à ovariectomia. Foram utilizadas 20 fêmeas com seis meses de idade. Os animais foram distribuídos em 4 grupos de 5 animais cada: GIS (grupo intacto sedentário); GIT (grupo intacto treinado); GOS (grupo ovariectomizado sedentário) e GOT (grupo ovariectomizado treinado). O exercício físico constituiu de uma hora diária de corrida em esteira ergométrica, a 60% da velocidade máxima, durante 12 semanas consecutivas. A preparação do material foi feita com técnicas convencionais de histologia. As colorações utilizadas foram: Hematoxilina-Eosina, Hematoxilina de Verhoeff, Resorcina de Weigert, Resorcina de Weigert com prévia oxidação e Picro-sirius, para a quantificação do volume ocupado pelas túnicas média e íntima e da luz da aorta, da densidade de volume das lamelas elásticas, das fibras elaunínicas, das fibras oxitalânicas e do tecido colágeno, respectivamente. A túnica média da aorta foi estudada por meio de métodos estereológicos em microscopia de luz. A análise morfoquantitativa revelou que a ovariectomia associada à prática de exercício físico aeróbico não interferiu no volume ocupado pelas túnicas media e íntima, e pela luz da aorta; e nem na razão entre esses parâmetros. O grupo GIT apresentou densidade de volume significativamente maior das lamelas elásticas, das fibras oxitalânicas e do colágeno. O grupo GOT apresentou densidade de volume significativamente menor do tecido colágeno. Com os resultados e as análises deste estudo, pode-se supor que o exercício físico aeróbico, mesmo se iniciado na fase adulta do animal, pode ser um recurso para evitar a perda da elasticidade da aorta ascendente de ratas Wistar em situações de carência de estrogênios.

Palavras-chave: Aorta. Matriz extra-celular. Estrogênios. Exercício físico aeróbico. Estereologia.

ABSTRACT

MARIOTTI, V. B. **Morphoquantitative analysis of extracellular matrix of aorta tunica media in ovariectomized female rats submitted to aerobic physical exercises** [Análise morfoquantitativa da matriz extra-celular da túnica média da aorta de ratas ovariectomizadas submetidas a exercício físico aeróbio]. 2009. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Low levels of estrogens have been related to arterial stiffness in female women. On the other hand, physical exercises are indicated for treatment of cardiovascular diseases and for reducing central arterial stiffness in postmenopausal women. The aim of this research was studied the features of extracellular matrix of ascending aorta tunica media in female rats submitted to ovariectomy and aerobic physical exercises training. Twenty six-months-old female Wistar rats were divided in four groups (n=5): sedentary intact (sed-int), exercise-trained intact (ex-int), sedentary ovariectomized (sed-ovx) and exercise-trained ovariectomized (ex-ovx). Exercise protocol was performed on a motor treadmill in a map speed for 12 weeks five times per week. The samples were prepared by convencional histology technics. The stains used were: Hematoxylin-Eosin, Verhoeff stain, Weigert's Resorcin, Weigert's Resorcin after oxidation and Picrossirus, for quantification the volume tunica media and intima and the volume lumen of aorta, volume density of lamellae, elauninic fibers, oxytalan fibers and collagenous, respectively. Aorta tunica media was studied by stereology methods in light microscopy. The results showed the ovariectomy and aerobic physical exercises did not interfere the volume of aorta tunica media and intima, the volume of lumen neither volume tunica media and intima-to-volume lumen ratio of aorta. Ex-int showed volume density significantly major of lamellae, oxytalan fibers and collagenous. Ex-ovx showed volume density significantly minor of collagenous. In conclusion, we can suppose aerobic physical exercises can avoid the ascending aorta stiffness in Wistar rats in low levels of estrogens situations.

Key words: Aorta. Extracellular matrix. Estrogens. Aerobic physical exercises. Stereology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Treinamento dos animais de experimentação em esteira ergométrica adaptada.....	49
Figura 2 – Fotomicrografia de cortes histológicos da aorta de ratos. A: Hematoxilina-Eosina (Aumento 50X); B: Hematoxilina de Verhoeff; C: Resorcina de Weigert; D: Resorcina de Weigert com prévia oxidação; E: Picro-sirius sem luz polarizada (Aumento: 1000X).....	53
Figura 3 - Fotomicrografia mostrando a técnica de quantificação dos volumes ocupados pelas túnicas média e íntima da aorta e por sua luz, com sistemas-teste formados por pontos-teste em forma de cruzes. A: quantificação das túnica média e íntima da aorta ($a/p = 2,25 \text{ mm}^2$). B: quantificação do lume da aorta ($a/p = 7,72 \text{ mm}^2$). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 50X.....	56
Figura 4 - Desenho do ponto-teste de escolha. A ponta da seta indica o quadrante considerado para a contagem do perfil de interesse.....	57
Figura 5 - Fotomicrografia da aorta mostrando a técnica de quantificação das lamelas elásticas coradas em preto (seta). Observar o sistema-teste de pontos e a “frame” sem viés delimitando a área de contagem: linhas de exclusão (brancas) e de inclusão (verdes). Coloração: Hematoxilina de Verhoeff. Aumento: 1000X.....	60
Figura 6 - Fotomicrografia da aorta mostrando a técnica de quantificação das fibras elaunínicas entre as lamelas elásticas (seta). Observar o sistema-teste de pontos e a “frame” sem viés delimitando a área de contagem: linhas de exclusão (pretas) e de inclusão (verdes). Coloração: Resorcina de Weigert. Aumento: 1000X.....	60
Figura 7 - Fotomicrografia da aorta mostrando a técnica de quantificação das fibras oxitalânicas entre as lamelas elásticas (seta). Observar o sistema-teste de pontos e a “frame” sem viés delimitando a área de contagem: linhas de exclusão (pretas) e de inclusão (verdes). Coloração: Resorcina de Weigert.com prévia oxidação. Aumento: 1000X.....	61
Figura 8 - Fotomicrografia da aorta mostrando a técnica de quantificação do colágeno, fotografado sem luz polarizada, corado em vermelho. Observar o sistema-teste de pontos e a “frame” sem viés delimitando a área de contagem: linhas de exclusão (pretas) e de inclusão (verdes). Coloração: Picro-sirius. Aumento: 1000X.....	61
Figura 9 – Gráfico das velocidades obtidas nos TEMs, comparando os grupos GIS, GIT, GOS e GOT. As linhas verticais do gráfico representam o desvio padrão.....	65
Figura 10 – Gráfico das velocidades obtidas nos três TEMs dos grupos sedentários (GIS e GOS) e dos grupos treinados (GIT e GOT). As linhas verticais do gráfico representam o desvio padrão.....	66
Figura 11 – Gráfico dos valores das massas corporais dos grupos GIS, GIT, GOS e GOT, obtidas nos três TEMs e na eutanásia. As linhas verticais do gráfico representam o desvio padrão.....	67

Figura 12 – Gráfico dos valores das massas corporais dos grupos sedentários (GIS e GOS) e dos grupos treinados (GIT e GOT), obtidas nos três TEMs e na eutanásia. As linhas verticais do gráfico representam o desvio padrão.....	67
Figura 13 - Gráfico dos valores das massas corporais dos grupos intactos (GIS e GIT) e dos grupos ovariectomizados (GOS e GOT), obtidos nos três TEMs e na eutanásia. As linhas verticais do gráfico representam o desvio padrão.....	68
Figura 14 - Gráfico das comparações dos volumes das túnicas média e íntima da aorta.....	69
Figura 15 – Gráfico das comparações do volume da luz da aorta.....	69
Figura 16 – Gráfico das comparações da razão volume da aorta/volume da luz da aorta.....	70
Figura 17 - Fotomicrografias da aorta mostrando a parede arterial e a luz. A: GIS; B: GIT; C: GOS; D: GOT. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 50X.....	70
Figura 18 – Gráfico das comparações da densidade de volume das lamelas elásticas ($p < 0,05$; b GIT X GOS; c GIT X GOT).....	72
Figura 19 – Fotomicrografias da aorta mostrando as lamelas elásticas evidenciadas em preto. A: GIS; B: GIT; C: GOS; D: GOT. Coloração: Hematoxilina de Verhoeff. Aumento: 1000X.....	72
Figura 20 – Gráfico das comparações da densidade de volume das fibras elaunínicas ($p < 0,05$; a GIS X GIT; c GIT X GOT).....	73
Figura 21 – Fotomicrografias da aorta mostrando as fibras elaunínicas, evidenciadas entre as lamelas elásticas. A: GIS; B: GIT; C: GOS; D: GOT. Coloração: Resorcina de Weigert. Aumento: 1000X.....	73
Figura 22 – Gráfico das comparações da densidade de volume das fibras oxitalânicas ($p < 0,05$; a GIT X GIS; b GIT X GOS; c GIT X GOT).....	74
Figura 23 - Fotomicrografias da aorta mostrando as fibras oxitalânicas, evidenciadas entre as lamelas elásticas. A: GIS; B: GIT; C: GOS; D: GOT. Coloração: Resorcina de Weigert pós-oxidação. Aumento: 1000X.....	74
Figura 24 - Gráfico das comparações da densidade de volume do colágeno ($p < 0,05$; a GIS X GIT; c GIT X GOT; d GOS X GOT).....	75
Figura 25 - Fotomicrografias da aorta mostrando o colágeno, fotografado sem luz polarizada, evidenciado em vermelho. A: GIS; B: GIT; C: GOS; D: GOT. Coloração: Picro-sírius. Aumento: 1000X.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Níveis de estradiol (pg/mL) dos grupos GOS e GOT - São Paulo – 2009.....	64
Tabela 2 – Médias $\pm$ dp das velocidades máximas (m/s) obtidas nos TEMs - São Paulo – 2009.....	65
Tabela 3 – Médias $\pm$ dp das massas corporais dos animais, obtidas por ocasião dos três TEMs e da eutanásia - São Paulo – 2009.....	66
Tabela 4 – Médias $\pm$ dp dos volumes (mm^3) das túnicas média e íntima da aorta, da luz e da razão entre ambos - São Paulo – 2009.....	69
Tabela 5 – Médias $\pm$ dp das densidades de volume (%) das lamelas elásticas, das fibras elastínicas, oxitalânicas e do colágeno - São Paulo – 2009.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a/p	área por ponto
cg	centigrama
DCV	doença cardiovascular
dp	desvio padrão
EDRFs	fatores relaxantes derivados do endotélio
FC	frequência cardíaca
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
GIS	grupo intacto sedentário
GIT	grupo intacto treinado
GOS	grupo ovariectomizado sedentário
GOT	grupo ovariectomizado treinado
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HDL	lipoproteína de alta densidade
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LDL	lipoproteína de baixa densidade
m/s	metros por segundo
nm	nanômetro
NO	óxido nítrico
PA	pressão arterial
pg	picrograma
RVP	resistência vascular periférica
SCV	sistema cardiovascular
TEM	teste de esforço máximo
TRH	terapia por reposição hormonal

LISTA DE SÍMBOLOS

% porcentagem

°C graus Celsius

M molar

μm micrômetro

= igual

Σ somatória

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	29
3.1 A AORTA.....	29
3.2 ASPECTOS HISTOLÓGICOS DA AORTA	30
3.3 MATRIZ EXTRA-CELULAR.....	31
3.3.1 Lamelas e fibras do sistema elástico.....	31
3.3.2 Colágeno.....	34
3.4 INFLUÊNCIAS DA DEPRIVAÇÃO DE ESTROGÊNIO NAS ARTÉRIAS.....	35
3.5 EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NAS ARTÉRIAS.....	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
4.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO.....	48
4.2 OVARECTOMIA E DOSAGEM DE ESTRADIOL.....	48
4.3 TESTE DE ESFORÇO MÁXIMO E PROTOCOLO DE EXERCÍCIOS FÍSICOS.....	49
4.4 MENSURAÇÃO DAS MASSAS.....	50
4.5 COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	51
4.6 QUANTIFICAÇÃO.....	54
4.6.1 Estereologia.....	54
4.6.2.1 Volumes da aorta e da luz.....	55
4.6.2.2 Razão volume da aorta/volume da luz da aorta.....	58
4.6.2.3 Densidade de volume dos componentes da matriz-extracelular.....	58

4.6.2 Análise Estatística.....	62
5 RESULTADOS.....	64
5.1 OVARIECTOMIA E NÍVEIS DE ESTRADIOL.....	64
5.2 DESEMPENHO NOS TESTES DE ESFORÇO MÁXIMO.....	65
5.3 MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS.....	66
5.4 VOLUMES DA AORTA E DA LUZ E RAZÃO VOLUME DA AORTA/VOLUME DA LUZ.....	68
5.5 DENSIDADE DE VOLUME DOS COMPONENTES DA MATRIZ EXTRA-CELULAR.....	71
6 DISCUSSÃO.....	77
6.1 OVARIECTOMIA E NÍVEIS DE ESTRADIOL.....	77
6.2 DESEMPENHO NOS TESTES DE ESFORÇO MÁXIMO.....	77
6.3 MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS.....	78
6.4 VOLUMES DA AORTA E DA LUZ E RAZÃO VOLUME DA AORTA/VOLUME DA LUZ.....	79
6.5 DENSIDADE DE VOLUME DOS COMPONENTES DA MATRIZ EXTRA-CELULAR.....	80
7 CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS.....	89
ANEXO.....	109

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A redução dos níveis de estrogênios promove alterações morfofuncionais importantes no organismo feminino humano e animal, contribuindo para o aumento do risco de doenças, perda da qualidade de vida e da independência, além de ser oneroso ao sistema público de saúde. Dentre as doenças, estão aquelas que acometem os órgãos do sistema cardiovascular, muito comuns também no decorrer dos processos de maturação e envelhecimento (EAKER et al., 1993; CASTILLO et al., 2005).

No caso das artérias, elas perdem a elasticidade, como na arteriosclerose, em que as paredes arteriais tornam-se mais rígidas, mais espessas e suas formas mais alongadas e dilatadas. A perda progressiva de tecido elástico, o acúmulo de tecido conjuntivo e o depósito de cálcio são as principais razões para tais alterações, levando à redução da distensibilidade da parede arterial, elevação dos níveis de pressão sistólica, aumento da impedância aórtica e, subseqüentemente, aumento da espessura da parede ventricular esquerda (WENGER et al., 1988). Estas alterações morfofuncionais estão intimamente relacionadas à menopausa, já que esta é inerente à redução dos níveis de estrogênios (IDICULLA; GOLDBERG, 1987; MISZKO; CRESS, 2000).

O aumento da expectativa de vida da mulher nos países desenvolvidos, que passou de 50 anos no início do século XX para mais de 80 anos no início do século XXI, tem contribuído para o aumento de pesquisas em situações em que haja redução dos níveis de estrogênios no organismo feminino, visto que nestes casos a mulher vive mais de um terço de sua vida no período de pós-menopausa (PAOLETTI; WENGER, 2003; NAMS, 2007). Segundo dados sobre a população mundial e brasileira, as alterações morfofuncionais do sistema cardiovascular ainda são as que mais acarretam doenças à mulher no climatério (DATA SUS, 2008).

Consequentemente, diversos recursos têm sido indicados para a prevenção e tratamento dos distúrbios cardiovasculares e metabólicos da pós-menopausa, incluindo terapia hormonal, dieta e exercícios físicos (TCHERNOF et al., 1998; SIMON, 2006). Estes últimos, inclusive, têm sido indicados como tratamento não farmacológico para muitas desordens, e a sua inclusão recomendada em serviços públicos de saúde (PATE et al., 1995). Realizado de maneira regular e moderada, e

associado a mudanças no estilo de vida, o exercício físico tem efeitos benéficos sobre o sistema cardiovascular do indivíduo, inclusive de idosos, obesos, sedentários e em mulheres pós-menopáusicas (BEITZ; DÖREN, 2004; CARELS et al., 2004; RACKLEY, 2004).

O exercício físico também pode ter efeito na ação hormonal, resultando em mudanças protéicas e em receptores (PATE et al., 1995; COPELAND et al., 2004), e pode ser um modulador favorável em casos onde exista diminuição da complacência arterial, assim como outras conseqüências fisiológicas e fisiopatológicas (SEALS, 2003). Por outro lado, estudos epidemiológicos de mais de 40 anos já sustentavam a hipótese de que o estilo de vida sedentária está relacionado ao maior desenvolvimento de doenças cardiovasculares (KANDEL, 1967; PAFFENBARGER et al., 1978).

Em contrapartida, os efeitos dos estrogênios sobre as doenças cardiovasculares (DCVs) são controversos e não totalmente compreendidos, já que a terapia por reposição hormonal (TRH) no climatério é atualmente questionada com relação aos seus riscos e benefícios, sendo os últimos inconsistentes e inconclusivos (CAULEY et al., 1990; STAMPFER; GOLDITZ, 1991; MATTHEWS et al., 1996; Mc KECHNIE et al., 2001; TATCHUM-TALOM et al., 2002; BUPHA-INTR; WATTANAPERMPPOOL, 2003; MAAS et al., 2004; GROSS et al., 2005).

Por isso, torna-se importante a realização de experimentos não farmacológicos que visam compreender as alterações morfofuncionais da parede de artérias elásticas em situações onde exista redução dos níveis de estrogênios. Todavia, na literatura nacional e internacional ainda é difícil encontrar estudos experimentais que mostrem as interações entre os efeitos da redução dos níveis de estrogênios e a prática de exercício físico aeróbio, com relação aos aspectos morfofuncionais da parede das artérias. A hipótese do presente estudo é que a prática regular de exercício físico aeróbio e a deprivação de estrogênios, por meio da ovariectomia, podem interferir nas características morfoquantitativas da parede da aorta ascendente de ratos.

O objetivo deste estudo foi, sobretudo, investigar as características morfoquantitativas dos sistemas elástico e colágeno da túnica média da aorta ascendente de grupos de animais de experimentação submetidos à ovariectomia bilateral e a exercício físico aeróbio, comparando com grupos de animais controle.

Os resultados deste estudo poderão oferecer maiores esclarecimentos e correlações em situações análogas em humanos, ou seja, no período de pós-menopausa, na menopausa precoce e na ovariectomia, contribuindo para melhorar a saúde e a qualidade de vida da mulher.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Os objetivos foram subdivididos em geral e específicos.

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da privação de estrogênios e do exercício físico aeróbio sobre as características morfoquantitativas da túnica média da aorta ascendente de ratas Wistar, comparando com grupos de animais controle.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Na aorta ascendente, estimar:

- o volume das túnicas média e íntima;
- o volume da luz da aorta;
- a razão entre o volume das túnicas média e íntima e o volume da luz da aorta.

Na túnica média, estimar a densidade de volume das seguintes estruturas:

- tecido elástico das lamelas;
- fibras elastínicas;
- fibras oxitalânicas;
- colágeno.

REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A AORTA

A aorta é uma artéria na qual o sangue circula centrifugamente em relação ao coração, transportando sangue oxigenado para o organismo. Sua parte ascendente inicia na base do ventrículo esquerdo do coração e termina adjacente ao tronco braquiocefálico. Após flexionar-se, formando o arco da aorta, cursa em direção ao tórax e abdômen (onde recebe o nome de aorta torácica e abdominal, respectivamente), tendo seu percurso adjacente à coluna vertebral, mais à esquerda da linha mediana. Termina antes de bifurcar-se nas artérias ilíacas comuns direita e esquerda, na região abdominal (WILLIAMS et al., 1995).

É classificada como de grande calibre – no adulto humano a sua porção ascendente tem aproximadamente 3 centímetros (cm) de diâmetro e cerca de 5 cm de comprimento (DÂNGELO; FATTINI, 1995; WILLIAMS et al., 1995). A aorta tem valiosa função como bomba auxiliar e é o maior vaso elástico distribuidor de sangue oxigenado para os diversos tecidos e órgãos do corpo (CATTEL et al., 1996; SILVER et al., 20001).

As artérias, entre as quais, a aorta, possuem propriedades morfológicas e mecânicas específicas que contribuem na fisiologia hemodinâmica do sistema arterial. Elas transportam sangue sob alta pressão para os tecidos e, por esta razão, têm de ser ao mesmo tempo resistentes e flexíveis (GUYTON; HALL, 1996). Elasticidade é a propriedade que apresentam certos corpos de retornar à sua forma primitiva ao cessar a ação que neles produziu uma deformação (FERREIRA, 2005). Essa característica das grandes artérias é capaz de controlar a elevada pressão sistólica mantendo uma pressão diastólica considerável (STEVENS; LOWE, 1995). Na aorta essa pressão é pulsátil e está em torno de 100 mmHg (GUYTON; HALL, 1996).

3.2 ASPECTOS HISTOLÓGICOS DA AORTA

Classificada como elástica, a aorta é composta das seguintes túnicas: íntima, média e adventícia.

A túnica íntima é a camada mais interna da parede de um vaso sanguíneo. Apresenta uma camada de células endoteliais apoiada em uma camada de tecido conjuntivo frouxo, a camada subendotelial, a qual contém algumas células musculares lisas com disposição longitudinal, fibras colágenas e ocasionais fibras elásticas. A túnica íntima está separada da média por uma lâmina elástica interna, a qual é o componente mais externo da íntima. Esta lâmina, composta principalmente de elastina, possui fenestras (aberturas) que permitem a difusão de substâncias para nutrir células situadas mais profundamente na parede do vaso (STEVENS; LOWE, 1995; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A túnica média é a camada mais espessa da aorta. É constituída principalmente por camadas concêntricas de células musculares lisas organizadas helicoidalmente (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Essas células são encontradas em situações que requerem contrações lentas sustentadas ou rítmicas, isentas de controle voluntário. São tipicamente fusiformes, apresentam um único núcleo com forma alongada ou elíptica de posição central. Os pequenos grupos de células são organizados em feixes por tecido colágeno fino contendo vasos sanguíneos e nervos. Participam da manutenção do diâmetro do vaso durante o fluxo de sangue, mantendo os níveis de pressão sanguínea no sistema arterial. Por suas propriedades contráteis, conferem o tônus à parede da artéria, o qual é controlado pelo sistema nervoso autônomo e por secreções endócrinas; por exemplo, na hipertensão arterial sistêmica (HAS), o tônus arterial periférico apresenta-se mais elevado (STEVENS; LOWE, 1995).

Interpostas entre as células musculares lisas existem quantidades variáveis de fibras e lamelas elásticas, fibras reticulares (colágeno dos tipos I e III), proteoglicanas e glicoproteínas. A túnica média possui uma lâmina elástica externa, mais delgada, que separa a média da adventícia. As lamelas elásticas são perfuradas, concêntricamente organizadas, cujo número aumenta com a idade: há cerca de 40 lamelas no recém-nascido humano e cerca de 70 no adulto. A túnica média apresenta cor amarelada em virtude do acúmulo de elastina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A túnica adventícia é a camada mais externa da aorta. Consiste principalmente de colágeno do tipo I e algumas células musculares lisas, tornando-se gradativamente contínua com o tecido conjuntivo do órgão pelo qual o vaso sangüíneo está passando. No interior da adventícia há pequenos vasos sangüíneos, os *vasa vasorum*, os quais enviam ramos penetrantes para o interior da média para supri-la com sangue (STEVENS; LOWE, 1995; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). A aorta também é suprida por nervos – os *nervi vasorum* – que podem suprir as três túnicas. Esses nervos recebem informações do sistema nervoso autônomo simpático para os vasos contrair-se, modulando o diâmetro da mesma (WILLIAMS et al., 1995; GUYTON; HALL, 1996).

3.3 MATRIZ EXTRA-CELULAR

Dentre os constituintes da matriz extra-celular dos vasos sangüíneos, tais como: água, íons, proteoglicanas, fibroblastos, neste estudo serão analisadas as lamelas e fibras do sistema elástico e o colágeno.

3.3.1 Lamelas e fibras do sistema elástico

O sistema elástico da aorta é composto essencialmente por lamelas e fibras de diferentes espessuras. O principal componente desse sistema é a elastina, uma gliocoproteína estrutural. Dentre os componentes da matriz extracelular, as fibras elásticas são essenciais, a sua composição é fragmentada hierarquicamente, e apresenta funções biomecânicas únicas. Diferentes proporções de elastina e microfibrilas promovem características funcionais variáveis, adaptáveis às necessidades locais dos tecidos (KIELTY et al., 2002).

As fibras do sistema elástico estão em processo de evolução contínua durante a elastogênese, partindo da forma oxitalânica (formadas exclusivamente por microfibrilas e sem elastina) para a elaunínica (formadas por grande quantidade de microfibrilas e elastina) e, posteriormente, elásticas maduras (formadas por grande

quantidade de elastina e poucas microfibrilas) (GAWLIK, 1965; COTTA-PEREIRA; IRUELA-ARISPE, 1989).

Estas podem ser diferenciadas através de sua composição e de suas características morfológicas e, em razão disso, são quimicamente distintas, daí obtém-se diferentes respostas aos métodos de coloração (MANDER et al., 1968; ROSS; BORNSTEIN, 1969; ROSS, 1973;).

A fibra oxitalânica é constituída por microfilamentos agrupados, com 15 a 16 nanômetros (nm) de espessura, e é caracterizada por apresentar resistência à hidrólise ácida, daí a denominação de oxitalânica. Coram-se pelo método de resorsina de Weigert com prévia oxidação por oxona. As fibras oxitalânicas estão distribuídas entre as fibras colágenas e têm trajeto ondulado (GAWLIK, 1965). À microscopia eletrônica, apresentam-se formadas por feixes de microfilamentos que não estão unidos por um componente estrutural definido e aparente (CARMICHAEL; FULLMER, 1966). Constituem a primeira fase de diferenciação das fibras do sistema elástico, representando a matriz estrutural glicoproteica com aspecto microfibrilar onde, posteriormente, deposita-se a elastina, proteína ultra-estrutural amorfa (BRADAMANTE; SVAJGER, 1977). Embora sua função seja a de proporcionar resistência, as fibras oxitalânicas têm sua função estendida para além da elastogênese. Sua localização dentro dos tecidos sugere que elas sirvam como proteína elástica acessória em regiões sujeitas a estresse mecânico (GOLDFISCHER et al., 1983; RODRIGUES JUNIOR, 1987; HORTA et al., 2005).

As fibras elaunínicas são mais espessas que as oxitalânicas e apresentam-se geralmente de forma tortuosa ou em espiral. Coram-se pelo mesmo método citado para as fibras oxitalânicas e também sem prévia oxidação. À microscopia eletrônica apresentam-se formadas por feixes de microfilamentos, entre os quais estão dispersos pequenos fragmentos de material amorfo. Seu diâmetro e comprimento variam de acordo com as características do tecido ao qual pertencem, refletindo sua adaptação funcional (GAWLIK, 1965).

À microscopia de luz, as fibras elásticas maduras diferenciam-se das oxitalânicas e das elaunínicas por se evidenciarem após coloração não apenas pelos métodos de resorcina de Weigert e resorcina de Weigert pós-oxidação, como também pelo método da hematoxilina férrica de Verhoeff, já que as fibras anteriores não se coram por esse método. À microscopia eletrônica apresentam-se com diâmetros de 200 a 1000 nm (GAWLIK, 1965).

Assim, a fibra elástica madura começa a surgir sob a forma de agregados de microfibrilas que tomam a disposição e a direção da futura fibra elástica. Com o processo de elastogênese, a elastina começa a se depositar nos interstícios dos feixes de microfibrilas e, quando completamente formada, a fibra elástica madura apresenta-se na maior parte com o componente amorfo, a elastina circundada por um envoltório de microfibrilas (ROSS, 1973; ROSS et al., 1977). Gawlik (1965) admite que as forças mecânicas atuam no processo de elastogênese, sendo que o diâmetro, comprimento, arranjo e número das fibras elásticas em uma determinada estrutura dependem da direção, intensidade, frequência e variabilidade dessas forças mecânicas.

A formação e disposição das fibras elásticas estão diretamente envolvidas com características funcionais que elas apresentam. Assim, a propriedade da fibra é decorrente da sua maior ou menor quantidade de elastina, sendo que as fibras oxitalânicas e elaunínicas, com pouca elastina, dariam resistência à tensão mecânica (RODRIGUES JUNIOR, 1987). Já as fibras elásticas maduras, que possuem grande quantidade de elastina, representariam o elemento responsável pela distensibilidade reversível do tecido conjuntivo, sendo capaz de aumentar o seu comprimento até uma vez e meia e retornarem ao seu comprimento inicial (PANIAGUA et al., 1983). Os microfilamentos das fibras elásticas também parecem desempenhar importante papel na integração e talvez na amarração das fibrilas colágenas (GOLDFISCHER et al., 1983; HORTA et al., 2005; RODRIGUES JUNIOR, 1987).

As lamelas elásticas estão dispostas circunferencialmente, para contrapor-se à tendência do vaso de distender-se em demasia durante a sístole (contração ventricular), contribuindo assim para tornar o fluxo de sangue mais uniforme e constante. Durante a sístole as lamelas elásticas das grandes artérias se distendem, o que reduz a variação da pressão arterial. Durante a diástole (relaxamento ventricular) a pressão no ventrículo cai para níveis muito baixos, mas o retorno do tecido elástico de seu estado distendido ao não distendido durante esta fase mantém a pressão diastólica no interior das grandes artérias elásticas, participando assim da manutenção da resistência periférica total. Como consequência, a pressão arterial e a velocidade do sangue diminuem e se tornam menos variáveis à medida que o sangue se distancia do coração. A aorta, além de dilatar-se no sentido transversal para armazenar maior volume de sangue, pode distender-se no

sentido longitudinal para atender aos deslocamentos dos segmentos corpóreos (DÂNGELO; FATTINI, 1995; STEVENS; LOWE, 1995; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

3.3.2 Colágeno

O colágeno, outro elemento da matriz extracelular dos vasos sangüíneos, é o principal tecido de sustentação da maioria dos órgãos. É dito frouxo quando as fibras colágenas são delgadas, desarranjadas e amplamente espaçadas; e denso quando as fibras colágenas estão compactadas e virtualmente confluentes (STEVENS; LOWE, 1995).

Corresponde a um grupo de proteínas constituídas por aminoácido glicina, prolinas e hidroxiprolinas (JENSEN; HOST, 1997). Essas proteínas formam um agregado de suporte para macromoléculas. O colágeno atua como arcabouço estrutural com papel importante na resistência a distensões excessivas dos vasos, conferindo rigidez e, ao mesmo tempo, limitando a extensibilidade dos mesmos (CATTEL et al., 1996). A orientação e organização do colágeno variam conforme o local, de acordo com o estresse tecidual exercido sobre a região (STEVENS; LOWE, 1995).

Existem ao menos 28 diferentes tipos de colágeno, com predominância dos tipos I e III. Diversas células são capazes de sintetizar o colágeno (osteoblastos, células endoteliais e musculares lisas), mas a grande maioria deriva dos fibroblastos (JENSEN; HOST, 1997).

Na parede da aorta, os colágenos tipo I e III são os mais prevalentes, correspondendo a 90% do total do colágeno desse vaso (KIELTY et al., 2002). Juntos, os colágenos tipo I e III cumprem função mecânica e conferem resistência à tensão. O tipo I confere rigidez e o tipo III está particularmente associado à extensibilidade da parede do vaso. O colágeno ainda fornece ancoragem para as células e exerce importante influência na função celular por meio de seu contato com receptores (BARNES; FARNDAL, 1999).

O comportamento mecânico dos colágenos tipo I e do tipo III, os quais se encontram em direção circunferencial, e das fibras elásticas, é característica

importante da parede vascular, pelo fato de a aorta ter função auxiliar de bomba na ejeção do sangue para o organismo (CATTEL et al., 1996; SILVER et al., 2001).

Na parede dos vasos sangüíneos existe ainda o colágeno tipo IV, que ocorre na lâmina basal das células musculares lisas; o colágeno tipo V, localizado no subendotélio e em associação à superfície das células musculares lisas; o colágeno tipo VI, encontrado entre as fibras elásticas da túnica média e no subendotélio, onde tem papel importante como placas de adesão; e o colágeno tipo VIII, elaborado pelas células endoteliais e células musculares lisas após injúria arterial (BARNES; FARNDAL, 1999).

Desta maneira, o papel conjunto de lamelas e fibras elásticas, o colágeno e as células musculares lisas conferem as características morfuncionais das artérias e proporcionam a qualidade das funções exercidas por elas. A elasticidade das artérias permite distensibilidade e complacência, o que garante a continuidade do fluxo sangüíneo. A resistência à tensão mecânica sustenta as variações de distensão e extensibilidade a que se submetem, garantindo a sua integridade, e participa na manutenção da resistência periférica total (RODRIGUES JUNIOR, 1987; GUYTON; HALL, 1996).

3.4 INFLUÊNCIAS DA PRIVAÇÃO DE ESTROGÊNIO NAS ARTÉRIAS

Os estrogênios são hormônios sexuais ovarianos e têm por função principal causar a proliferação celular e o crescimento dos tecidos dos órgãos sexuais e de outros tecidos relacionados com a reprodução, sendo responsáveis pelo desenvolvimento da maioria das características sexuais secundárias femininas. O mais importante dos estrogênios é o hormônio beta-estradiol. Os estrogênios são sintetizados sobretudo a partir do colesterol derivado do sangue, mas também em pequena extensão a partir da acetil-coenzima A, e secretados em quantidades maiores pelos ovários, apesar de quantidades mínimas também serem produzidas e secretadas pelas glândulas supra-renais (GUYTON; HALL, 1996).

A privação de estrogênios pode ocorrer por processos patológicos que acometam os ovários, como por exemplo tumores, que podem levar à ovariectomia antes da quarta década de vida da mulher (BOZAS et al., 2006), em adolescentes

antes dos 15 anos de idade (ZUCKER, 1982) e até em crianças (HOREJSÍ; ROB, 2003). Ou ainda, ocorre como característica da menopausa, uma consequência do processo natural de maturação e envelhecimento do organismo feminino. É diagnosticada após 12 meses de amenorréia decorrente da cessação definitiva das funções ovarianas. Esse processo que, geralmente, inicia na quarta década de vida da mulher, culmina com a menopausa por volta dos 51 anos (GREENDALE et al., 1999).

Projeções sobre a população mundial mostram que haverá um aumento do número de mulheres na menopausa, de 467 milhões na década de 90 para 1 bilhão e 200 milhões em 2030 (WHO, 1996). No Brasil, dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de 2008, revelam que em 2007 a população feminina com mais de 45 anos era de quase 27 milhões (IBGE, 2008). Indicadores demográficos do Ministério da Saúde mostram que a população feminina brasileira acima de 45 anos vem crescendo a cada ano. No início da década de 90 eram mais de 13 milhões, e em 2006 chegou a mais de 23 milhões (DATA SUS, 2008).

O processo que culmina com a menopausa, além de ser marcado pela queda acentuada da produção e liberação dos estrogênios, vem associado ao processo de envelhecimento do organismo, o que favorece alterações morfofisiológicas do mesmo e leva ao desenvolvimento de desordens como: HAS, hipercolesterolemia, diabetes mellitus, obesidade, arteriosclerose e aterosclerose (GIAMPAOLI et al., 2000; BITTNER, 2002; RACKLEY, 2004; BITTNER, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Durante a menopausa ocorre um declínio maior nos níveis de estrogênios do que de androgênios (por exemplo, a testosterona), ou seja, aumenta a relação androgênios/ estrogênios. Isso levaria a DCVs, já que tem sido descrito que níveis elevados de hormônios sexuais masculinos na mulher estão associados a dislipidemia, diabetes mellitus e HAS (HAFFNER et al., 1995; PHILLIPS et al., 1997; OH et al., 2002).

No que tange às alterações do envelhecimento na parede das artérias, estão relatadas as modificações da matriz extracelular (ROBERT, 1996). Dois fatores estão relacionados: a progressiva deposição de lipídios e cálcio nas fibras elásticas (JACOB et al., 2003) e o fator idade-dependente, que aumenta a atividade da elastase (LABAT-ROBERT; ROBERT, 1988). Concomitantemente, ambos os fatores privam o tecido elástico de sua capacidade flexível e aumentam a suscetibilidade a enzimas elastolíticas (LABAT-ROBERT; ROBERT, 1988). Por outro lado, o colágeno

aumenta suas ligações transversais, aumentando sua resistência a collagenases (BROMNLEE et al., 1988). Isso explica a predominância de colágeno na aorta envelhecida, o aumento da razão colágeno/elastina e a progressiva rigidez dos vasos (ROBERT, 1996).

Tais alterações também podem levar à dilatação das artérias e transformar-se, por exemplo, em um aneurisma, que pode romper-se e levar à morte (MORIGUCHI; MORIGUCHI, 1988). Qualquer distúrbio anatômico que comprometa o suprimento de sangue em um tecido, seja este por obstrução à passagem de sangue ou por hemorragia causada por ruptura de aneurismas, resulta em necrose do tecido adjacente (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Quanto às DCVs, no ano de 2005 a taxa de mortalidade específica para doenças deste grupo em mulheres acima dos 50 anos de idade foi de 722,58 por 100 mil habitantes. Para mulheres entre 30 e 49 anos essa taxa cai para 41,36 (DATA SUS, 2008).

Admite-se que a HAS, além de ser desenvolvida como consequência do envelhecimento do organismo, também é causada pela queda de estrogênios no período de pós-menopausa, mas este mecanismo é questionado (RAPPELLI, 2002). Pesquisas mostram que a alta prevalência de HAS é mais alta em mulheres no climatério do que no período que o antecede (STAESSEN et al., 1998).

A arteriosclerose é caracterizada pelo depósito de lipídios na túnica íntima das artérias, deposição de cálcio na elastina e aumento do colágeno na parede arterial. Ao mesmo tempo, o conteúdo de elastina diminui drasticamente, levando a diminuição na elasticidade das artérias, podendo inclusive provocar aumento da pressão sistólica. Em decorrência destas alterações, a calcificação arterial, mais notável na aorta, atinge aproximadamente 50% de homens e mulheres após a sexta década de vida e cerca de 100% dos indivíduos entre 80 e 89 anos. (MORIGUCHI; MORIGUCHI, 1988). A perda da elasticidade resulta em um aumento do calibre da artéria, podendo configurar-se até uma lesão de medionecrose cística (AMÂNCIO; CAVALCANTI, 1975).

A menopausa também colabora para o aparecimento da aterosclerose pois, dentre suas causas estão os transtornos hormonais e as alterações metabólicas do colesterol, muito comuns no período de pós-menopausa (SILVA et al., 1997). É caracterizada pelo espessamento focal da íntima, pela proliferação das células musculares lisas e de elementos celulares e extracelulares do tecido conjuntivo, e

pelo depósito de colesterol nas células musculares lisas. Acredita-se que o espessamento uniforme da íntima seja um fenômeno normal do envelhecimento. A partir da quebra de equilíbrio da íntima (lesão do endotélio, por exemplo), começa a ocorrer deposição de cálcio e lipídios. Foi demonstrado que a redução significativa dos estrogênios, principalmente o 17-beta-estradiol, promove importantes alterações sobre o perfil lipídico, pois eleva a lipoproteína de densidade baixa (LDL), a chamada aterogênica, e reduz a lipoproteína de alta densidade (HDL), denominada protetora contra a aterosclerose. Participam também deste processo células musculares lisas, que migram da média para a íntima. Apesar de o espessamento da íntima, a espessura da média permanece quase inalterada (TAKANO; MINEO, 1990; PINOTTI, 1995).

Apesar de o mecanismo exato de como os estrogênios conferem proteção ao sistema cardiovascular serem desconhecidos, estudos sugerem que os estrogênios podem ter efeito sobre apo-lipoproteínas, além de reduzirem os níveis totais de colesterol e do LDL (SULLIVAN, 1996).

Os estrogênios parecem exercer um papel cardiovascular protetor até a menopausa. Durante a idade reprodutiva, a mulher apresenta incidência de doença coronariana muito menor do que o homem na mesma faixa etária (WONG; WONG, 1999). Agem diretamente sobre receptores e enzimas da parede arterial, diminuindo a pressão e melhorando o fluxo sanguíneo; estimulam os prostanoídes (prostaciclina) que atuam como vasodilatadores e antiagregantes plaquetários, estimulam os peptídeos vasodilatadores que diminuem o estresse e repercutem benéficamente no metabolismo de lipídios e de proteínas fibrinolíticas (PINOTTI, 1995; MENDELSON; KARAS, 1999). A associação de estrogênios com progestágenos promove importante benefício antiaterogênico na aorta, além dos efeitos exercidos pelos esteróides na prevenção da incorporação de cálcio na parede arterial (ALDRIGHI, 1996).

Entretanto, os dados experimentais acerca dos efeitos dos estrogênios exógenos sobre as desordens cardiovasculares são controversos e não totalmente compreendidos, já que a TRH no climatério é atualmente questionada com relação aos seus riscos e benefícios, sendo os últimos inconsistentes e inconclusivos (CAULEY et al., 1990; STAMPFER; GOLDITZ, 1991; MATTHEWS et al., 1996; Mc KECHNIE et al., 2001; TATCHUM-TALOM et al., 2002; BUPHA-INTR;

WATTANAPERMPPOOL, 2003; GROSS et al., 2005; MAAS et al., 2004; STICE et al., 2008).

Resultados experimentais revelaram que apesar de a TRH na mulher no período de pós-menopausa ter demonstrado prevenir certas DCVs, ainda são estas que mais a acometem na pós-menopausa quando a TRH com estrogênios é utilizada, tendo efeito sobre a fisiologia cardiovascular e em todo o metabolismo corporal, inclusive efeitos prejudiciais inflamatórios e trombóticos (CUSHMAN, 1999; SIMON, 2006).

A *American Heart Association* não considera a TRH como terapêutica das DCVs, estando as estatinas priorizadas (MOSCA et al., 1999). Em estudo da Women's Health Initiative Investigators, afirma que a TRH combinada não previne DCVs ou, na maioria dos casos, pode aumentar o risco para que estas ocorram (BARRETT-CONNOR, 1997; GRADY et al., 2002; MANSON et al., 2002; ROSSOUW et al., 2002; ANDERSON et al., 2004).

Um estudo randomizado placebo controlado realizado nos Estados Unidos pelo The Women's Health Initiative ao longo de oito anos e meio, teve como objetivo verificar os benefícios e riscos mais comuns às mulheres no período de pós-menopausa submetidas à TRH. O estudo foi conduzido com a participação de mais de 16 mil mulheres com idade entre 50 e 79 anos e com útero intacto. Como consequência primária, apareceram a doença arterial coronariana e o câncer de mama, seguidos de acidente vascular encefálico, embolia pulmonar, câncer do endométrio e colorretal, e fratura de quadril. A conclusão dos pesquisadores foi que há mais riscos do que benefícios em se fazer reposição hormonal em mulheres na pós-menopausa em um tempo médio de 5,2 anos (ROSSOUW et al., 2002).

Todavia, existem relatos de que o efeito cardioprotetor da TRH é causado pela supressão do aumento da expressão do beta-1-adrenorreceptor in ratas ovariectomizadas, a qual como resposta reduz o dano cardíaco quando este receptor é ativado por hipertatividade simpática durante a isquemia. Além disso, o 17-beta-estradiol reduz a resposta hipertrófica à sobrecarga pressórica em ratos (KAM et al., 2004).

Como o papel da TRH como prevenção primária de DCV utilizada desde a peri-menopausa ou pós-menopausa recente ainda permanece controverso, e enquanto não houver evidências disponíveis, esta não deve ser indicada como

prevenção primária (MANSON et al., 2002) ou secundária (HULLEY et al., 1998) de doença coronariana.

Por isso, pesquisadores ainda investigam tratamentos não farmacológicos para a prevenção de DCVs em mulheres na menopausa. Dentre estes, está a prática regular de exercícios físicos (NAGPAL et al., 2007; PINES; BERRY, 2007).

O risco cardiovascular e metabólico em mulheres no período de pós-menopausa aumenta não só em função do envelhecimento ou da deprivação dos estrogênios, mas também como consequência da diminuição da atividade física e mudanças na dieta, ocorrendo aumento de gorduras totais, dislipidemia aterogênica, redução da tolerância à glicose, resistência à insulina e um aumento dos fatores pro-coagulantes (BUPHA-INTR; WATTANAPERMPPOOL, 2003). Exercícios físicos com uma dieta apropriada contribuem para aumentar o índice de massa corporal e o gasto de energia, diminui o índice de gorduras totais e viscerais, melhora a sensibilidade à insulina, reduz a fibrinogenemia e otimiza os parâmetros hemodinâmicos (GASPARD et al., 2001).

3.5 EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NAS ARTÉRIAS

Os efeitos do exercício físico para o organismo são bastante abrangentes. Dentre seus benefícios estão o de facilitar o aprendizado de novas habilidades, melhorar as funções cognitivas, reduzir a probabilidade de ocorrer doenças e, desde o início do século XX, tem aumentado a expectativa de vida da mulher em cerca de 25 anos (IDICULLA; GOLDBERG, 1987). Ocorre melhora da qualidade de vida e da forma física, atenua algumas das mudanças fisiológicas associadas ao envelhecimento, previne doenças crônicas, ameniza a perda óssea tão comum na fase de pós-menopausa e promove independência funcional (MISZKO; CRESS, 2000).

A prática de exercícios físicos também é bastante citada na literatura quanto aos seus benefícios sobre o sistema cardiovascular. Na década de 70 o exercício físico já era citado como um recurso para prevenir DCVs, pois este aumenta as anastomoses entre as artérias coronárias e seus ramos e, inclusive, através do pericárdio e da aorta (HARTLEY, 1973; MITCHELL, 1975). Owens et al. (2003), em

estudo realizado ao longo de 20 anos em mulheres de meia idade, afirmam que nunca é tarde para reduzir o risco cardiovascular aumentando o nível de atividade física. Inclusive a prática de atividade física habitual (aquela que o indivíduo realiza durante atividades do cotidiano como transporte, trabalho, casa e lazer) colabora para o baixo risco de DCVs em mulheres (SILVA et al., 2006), previne a mulher de doenças arteriais coronarianas (MANSON et al., 1999; DUVERNOY et al., 2006) e está associado a baixos índices de morte em mulheres na meia idade (VAN DAM et al., 2008).

Em 2002 o *Women's Health Initiative Observational Study* acompanhou cerca de 74 mil mulheres no período de menopausa, com idade entre 50 e 79 anos de idade. A pesquisa mostrou que índices elevados de atividade física tiveram associação inversa, intensa e gradual com risco de doenças coronarianas e cardiovasculares (MANSON et al., 2002).

Em homens idosos o exercício físico aeróbio tem um papel favorável, quando praticado ao longo de décadas, resultando em mínima perda de consumo de oxigênio, sem aumento da pressão arterial de repouso ou da composição corporal (KASCH et al., 1999). Em homens sedentários jovens a prática de exercícios físicos de baixa intensidade em dias alternados, em bicicleta ergométrica a 70% do consumo máximo de oxigênio, com sessões de 60 minutos cada, pode melhorar a distensibilidade da aorta, mas os efeitos podem não se manter sem o exercício (KAKIYAMA et al., 2005).

As repercussões do exercício físico aeróbio sobre o sistema cardiovascular sadio são bastante extensas, e dividem-se em agudas e crônicas. Durante o exercício os músculos necessitam de um fluxo sanguíneo acentuadamente maior para supri-los com oxigênio. Parte deste é suprido pela vasodilatação local da vasculatura dos músculos, produzida pelo aumento do metabolismo das células musculares. Por outro lado, a ativação do bulbo e a resposta do sistema nervoso simpático aumentam o débito cardíaco e elevam a PA, podendo, em exercícios vigorosos, aumentar de 30 a 40%, o que aumenta o fluxo sanguíneo em mais de duas vezes e distende os vasos. Inicialmente o vaso é submetido a uma maior pressão, mas a complacência permite que as fibras musculares se alonguem e a resistência do vaso diminui (SILVERTHORN, 2003; BRUM et al., 2004).

Ocorre aumento do volume sistólico e, conseqüentemente, a quantidade de sangue a ser acomodada na árvore arterial a cada batimento cardíaco deverá ser

maior. O aumento da PA resulta em ativação reticular do tronco cerebral, incluindo estimulação acentuadamente aumentada das áreas vasoconstritora e cardioaceleradora do centro vasomotor (SILVERTHORN, 2003).

A contração da musculatura esquelética durante o exercício físico comprime os vasos sangüíneos em todo o corpo. Isso causa a transferência de grandes quantidades de sangue dos vasos periféricos para o coração e pulmões, aumentando o débito cardíaco de 5 a 6 vezes. Por sua vez, o aumento do débito cardíaco eleva a PA sistólica e manutenção ou redução da diastólica (FORJAZ et al., 1998), o que faz aumentar a força que tende a empurrar o sangue pelo leito vascular, distendendo os vasos. Consequentemente, há redução da resistência vascular periférica (RVP), mas o débito cardíaco aumentado mantém a PA alta. Isso sugere que o reflexo barorreceptor normal que controla a PA não funcione durante o exercício, e sim ajusta-se para que a PA não caia, mantendo assim, o fluxo sangüíneo adequado para remover os metabólitos musculares ou para manter o músculo em metabolismo aeróbio (SILVERTHORN, 2003). Entretanto, segundo (BRUM et al., 2000), o exercício físico aumenta a sensibilidade do barorreceptor em normotensos, assim, pode haver um resultado mais eficiente na regulação da pressão arterial pelo baroreflexo.

Para que não haja enchimento excessivo dos ventrículos, o que é potencialmente perigoso devido ao estiramento excessivo de suas fibras musculares, o sistema nervoso simpático mantém a FC e a força contrátil do coração aumentadas para que este ejete maior quantidade de sangue por batimento (SILVERTHORN, 2003). Imediatamente após o término do exercício, ocorre queda da PA durante o período de recuperação, fazendo com que os valores pressóricos sejam inferiores àqueles observados antes do exercício, perdurando por um período de 24 horas após o término do exercício (BRUM et al., 2004).

O efeito do exercício físico aeróbio a longo prazo envolve a sua reconhecida ação hipotensora tanto em animais quanto em humanos (BRUM et al., 2000; KOKKINOS et al., 2001). Entretanto os mecanismos que explicam esse evento permanecem controversos. É um poderoso estimulante do eixo hipotalâmico-pituitário, controlando a liberação de vários hormônios neuroendócrinos (LEAL-CERRO et al., 2003) e acetilcolina (DORNYEI et al., 2000), e reduzindo níveis de hormônios adrenérgicos e causando desequilíbrio entre os sistemas adrenérgico e parassimpático, com predomínio da ação vagal (KENNEY, 1985). Como resposta há

uma bradicardia de repouso e menor resposta taquicárdica durante o exercício (BRUM et al., 2004).

O exercício físico aumenta o fluxo sanguíneo dentro das artérias coronárias por induzir a vasodilatação das mesmas. Esta resposta vascular é largamente dependente da integridade do endotélio, visto que o efeito modulador do endotélio no tônus vascular é mediado pela liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs) (SESSA et al., 1994). O exercício físico aumenta a bio-disponibilidade de NO (óxido nítrico), um dos EDRFs e melhora a função endotelial em pacientes com desordens cardiovasculares (GRAHAM; RUSH, 2004; SUVORAVA et al., 2004), pois o exercício físico regula e induz a expressão genética da síntese da enzima de NO (YEN et al., 1995) com a conseqüente redução da resistência periférica (SHEN et al., 1995). Uma vez formado, o NO difunde-se rapidamente para as células musculares lisas adjacentes e, após uma série de reações bioquímicas, ocorre o relaxamento do músculo liso vascular, pois leva à desfosforilação das cadeias leves de miosina, reduzindo o influxo de íon cálcio através do sarcolema, bem como a liberação de seus depósitos intracelulares. Isto resulta em diminuição da concentração de íon cálcio citosólico livre. O NO pode também abrir canais de potássio, promovendo hiperpolarização na célula do músculo liso vascular, ajudando assim a restabelecer o potencial de repouso da célula, com conseqüente relaxamento vascular (OHESSEN et al., 1988; MARTINEZ, 2005).

Assim, o exercício físico reduz o risco de DCVs pelos mesmos mecanismos que o fazem os estrogênios: altera as concentrações de lipoproteínas do plasma sanguíneo, reduz a pressão sanguínea e aumenta a vasodilatação endotélio-dependente por aumentar a síntese e liberação de EDRFs (WONG; WONG, 1999). As diversas alterações moleculares, particularmente do NO endotelial, poderiam contribuir, ao menos em parte, para os benefícios que o exercício físico produz para a manutenção da elasticidade da aorta (MAEDA et al., 2005).

Por outro lado, a inatividade física causa disfunção endotelial em ratos jovens e saudáveis, a qual é completamente reversível por exercícios físicos moderados em um curto período de tempo (SUVORAVA et al., 2004).

Artérias centrais, como a aorta e as carótidas têm bastante distensibilidade, amortecendo impactos durante as variações de pressão (NICHOLS; O'ROURKE¹, 1998 apud HAYASHI et al., 2005. p. 235). O exercício aeróbio de intensidade moderada pode reduzir a rigidez desses vasos na população saudável sedentária (TANAKA et al., 1998; TANAKA et al., 2000). Por meio da mensuração da velocidade de pulso da onda aórtica foi possível avaliar a complacência arterial e o diâmetro da luz de vasos centrais durante a diástole. Após a prática regular de exercícios físicos aeróbios moderados houve redução da resistência desses vasos em homens saudáveis de meia idade, embora o mecanismo fisiológico que explique a relação entre a prática de exercícios físicos aeróbios e a redução da resistência arterial não esteja claro (HAYASHI et al., 2005). Foi observado aumento do diâmetro da luz das artérias centrais e periféricas após três meses de prática de exercícios físicos aeróbios, o que pode estar relacionado ao remodelando estrutural ou à redução do tônus vascular das células musculares lisas, o que contribui para diminuir a resistência periférica arterial (DINENNO, 2001). Além disso, pode-se sugerir que exercícios físicos cíclicos podem, ainda que agudamente, reduzir a resistência de artérias centrais e periféricas (KINGWELL, 1997).

Por meio de avaliação simultânea por ultra-som e tonometria de aplanção das artérias carótida comum e femoral de remadores e de indivíduos controles, de ambos os sexos, com idade entre 41 e 59 anos, foi observada maior complacência arterial em remadores do que no grupo controle. Já a artéria femoral não apresentou diferenças no seu grau de rigidez. O aumento da complacência da carótida em remadores está associada a maior sensibilidade baroreflexa cardiovagal, como ocorre na manobra de Valsalva. Conclui-se que, em remadores de meia-idade, a prática regular da atividade resistida está associada a efeitos que favorecem as propriedades elásticas das artérias centrais, o que pode anular a rigidez que o exercício de força poderia causar às artérias (COOK et al., 2006). Com os mesmos métodos de avaliação empregados anteriormente, Sugawara et al. (2006) selecionaram 103 mulheres com idade entre 47 e 82 anos e submeteram-nas a exercícios aeróbios leves, moderados e vigorosos. Os resultados mostraram que o índice de rigidez da artéria carótida caiu após essas modalidades de exercício.

^{1,2} NICHOLS, W.; O'ROURKE, M. **McDonald's Blood Flow in Arteries: Theoretical, Experimental and Clinical Principles**, Aenord, London: [s.n.] 1998.

Todavia, existem relatos de que exercícios resistidos estão associados à redução das propriedades elásticas das artérias centrais. Porém, não é sabido se esta redução é em consequência da resistência imposta pelo exercício físico ou se é uma adaptação ao crescente treinamento resistido. Entre dois grupos de indivíduos com 27 anos de idade de ambos sexos, um grupo treinado e outro controle, não foram encontradas diferenças quanto a alterações hemodinâmicas, mas a complacência da carótida, avaliada simultaneamente por ultra-som e tonometria de aplanção, caiu imediatamente e 30 minutos após o exercício resistido, retornando a níveis basais após 60 minutos. No entanto, o estudo não deixou claro o que acontece com a complacência arterial após este período (DE VAN et al., 2005).

Modificações no estilo de vida, em particular exercícios aeróbicos (mas não resistidos) e a restrição de sódio na dieta alimentar, parecem ser intervenções clinicamente eficientes na prevenção e tratamento da rigidez arterial (TANAKA; SAFAR, 2005). Estudos têm demonstrado que indivíduos com alto nível de prática de exercícios físicos têm redução na rigidez arterial quando comparados com aqueles sedentários (FERREIRA et al., 2002; BOREHAM et al., 2004). Entretanto, em casos em que haja HAS isolada, a rigidez arterial pode ser irreversível e, nesses casos, a prática de exercícios físicos, não será eficaz (TANAKA; SAFAR, 2005).

Por isso, a atividade física deve ser iniciada precocemente, tendo muito mais caráter preventivo do que terapêutico (FERREIRA et al., 2006). Sugavara et al. (2006) citam os benefícios do exercício físico para a melhora da rigidez arterial em mulheres na pós-menopausa associando essa prática a um programa de exercícios aeróbicos de 12 semanas. Os autores concluíram que tanto o exercício moderado quanto o vigoroso são capazes de reduzir o endurecimento das artérias.

Sabe-se que a prática de exercícios físicos melhora alguns fatores de risco, como a taxa de gordura corporal, resistência à insulina, pressão arterial, os quais estão associados ao aumento do enrijecimento das artérias (STEHOUWER; FERREIRA, 2006). Além disso, tem sido demonstrado que o exercício físico apresenta um impacto na função endotelial, na inflamação e nas atividades simpáticas e, também é sabido que esses fatores estão envolvidos no enrijecimento arterial (TANAKA; SAFAR, 2005). Porém, os mecanismos pelos quais os exercícios afetam as propriedades dos vasos em humanos têm sido muito pouco estudados (STEHOUWER; FERREIRA, 2006).

Apesar de inúmeros estudos sobre a atuação do exercício físico e dos estrogênios no SCV, nos dias atuais ainda é difícil encontrar trabalhos que relacionam o exercício físico aeróbio e a carência de estrogênios com as alterações dos constituintes da matriz extra-celular das artérias elásticas.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Para a realização deste estudo foram utilizadas 20 fêmeas de *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar com seis meses de idade, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Os animais foram distribuídos em 4 grupos de 5 animais cada: grupo intacto sedentário (GIS), grupo intacto treinado (GIT), grupo ovariectomizado sedentário (GOS), grupo ovariectomizado treinado (GOT). Os animais foram identificados por meio de numeração em suas caudas.

O protocolo experimental foi submetido e aprovado pela Comissão de Bioética da FMVZ-USP.

4.2 OVARIECTOMIA E DOSAGEM DE ESTRADIOL

Os procedimentos cirúrgicos de ovariectomia foram realizados no Laboratório de Anatomia da FMVZ-USP.

Os animais dos grupos GOS e GOT foram pesados e anestesiados com injeções intraperitoneais de Cloridrato de cetamina (75mg/kg) e Xilazina (5mg/kg) (WIXSON et al., 1987). Após tricotomia e antissepsia da região ventral do abdômen, os animais foram posicionados em decúbito dorsal e uma incisão foi feita na região da linha alba; os ovários e cornos uterinos foram tracionados e suturados, e os ovários removidos bilateralmente. Ao final, a parede abdominal foi suturada (PATULLO, 2001). Durante a recuperação anestésica os animais foram mantidos aquecidos e em observação por cerca de 4 horas.

Para a analgesia pós-operatória foi administrado por via subcutânea o anti-inflamatório e analgésico Flunixin-Meglumina (2,5 mg/kg) uma vez ao dia, durante 3 dias consecutivos (FLECKNELL, 1999). Os animais permaneceram alojados em gaiolas coletivas, com três animais por gaiola, providas de comedouro com ração

comercial referência para roedores¹ e bebedouro com água *ad libitum*. Foram mantidos em condições ambientais controladas: temperatura entre 22°C e 24°C e iluminação com ciclos de 12 horas claro / 12 horas escuro.

Para dosagem dos níveis plasmáticos de estradiol², no dia da eutanásia foram coletadas amostras sanguíneas dos animais ovariectomizados.

4.4 TESTE DE ESFORÇO MÁXIMO E PROTOCOLO DE EXERCÍCIOS FÍSICOS

Todos os grupos estudados foram submetidos ao teste de esforço máximo (TEM) individual. Assim, para cada animal foi obtida a velocidade compatível com a capacidade aeróbia máxima de forma indireta (RODRIGUES et al., 2006). Foi utilizada uma esteira ergométrica³ adaptada (Figura 1), constituída por 8 raia de alumínio e tampa acrílica transparente, onde foi colado papel adesivo pardo no seu terço dianteiro, criando um ambiente escuro - para o qual os animais eram atraídos durante a corrida - e facilitando o treinamento.

Figura 1 – Treinamento dos animais de experimentação em esteira ergométrica adaptada

¹ Nuvital®

² As análises dos níveis de estradiol foram realizadas pelos Laboratórios Rhesus e Provet

³ Inbrasport®

Um TEM foi realizado no início do experimento a uma velocidade inicial de 0,08 m/s: a cada 4 minutos a velocidade da esteira era incrementada na mesma proporção (0,08 m/s). O valor do TEM era obtido quando o animal demonstrava sinais de fadiga e/ou quando não conseguia mais correr ou andar espontaneamente (SILVA et al., 1997). Os animais que não andavam ou corriam foram excluídos da pesquisa. Após a realização dos TEMs, os animais foram distribuídos entre os grupos GIS, GIT, GOS e GOT.

A cada 4 semanas foram realizados novos TEMs para que a velocidade do treinamento fosse ajustada para as próximas 4 semanas, caso os animais apresentassem variações nos seus desempenhos (FONTINELE, 2007). Foram iniciados os treinamentos regulares, cujo protocolo foi assim determinado:

- Os animais dos grupos GIS e GOS foram submetidos a exercício físico apenas uma vez por semana durante 10 minutos por um período de 12 semanas consecutivas com velocidade igual a 30% do respectivo TEM (FONTINELE, 2007). Essa conduta foi adotada para que esses animais tivessem ao menos uma atividade física dita basal e para que não perdessem a habilidade em correr na esteira, evitando interferências nos TEMs.
- Os animais dos grupos GIT e GOT foram submetidos a exercício físico regular cinco vezes por semana, em dias consecutivos e no mesmo período do dia, por 12 semanas consecutivas com velocidade igual a 60% daquela conseguida no TEM (DE ANGELIS et al., 1997). Na primeira semana correram por 30 minutos (IRIGOYEN et al., 2005). A partir da segunda semana, o tempo de treinamento foi gradativamente aumentado, sendo que a cada semana aumentou-se 10 minutos, até atingir o tempo de uma hora a partir da quarta semana de treinamento (DE ANGELIS et al., 1997).

4.3 MENSURAÇÃO DAS MASSAS

Mensalmente foram mensuradas as massas corporais dos animais, por ocasião dos TEMs e no dia da eutanásia, em balança digital⁴.

⁴ Marte®

4.5 COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Ao final de 12 semanas de experimento, os animais foram anestesiados com Cloridrato de cetamina (75mg/kg) e Xilazina (5mg/kg) (WIXSON et al., 1987). Os corações foram evidenciados por meio de toracotomia e coletadas amostradas de sangue do ventrículo esquerdo, para análise dos níveis plasmáticos de estradiol.

Uma cânula foi introduzida no ventrículo esquerdo lateralmente ao ápice do coração e uma incisão foi feita no átrio direito. Iniciou-se a perfusão com cerca de 100 mL de solução salina tamponada fosfatada (PBS)⁵ a 0,1M e pH 7,4, e heparina a 2%⁶ para a lavagem do sistema arterial e venoso, seguida de perfusão com cerca de 200 mL de solução fixadora de Karnovsky modificada (Solução de glutaraldeído 3%⁷ e formaldeído 1%⁸ em tampão cacodilato de sódio⁹ [0,125M; pH 7,4]). As perfusões foram realizadas com bomba perfusora¹⁰ a uma velocidade de 12 mL/min.

Foi coletado um trecho de 4 milímetros da porção ascendente da aorta a partir de sua raiz, situada na região adjacente à base do coração.

Cada segmento da aorta foi medido com a utilização de um paquímetro manual. As 20 amostras foram embebidas na mesma solução fixadora citada anteriormente por 72 horas a 4°C. Em seguida o material foi lavado em água corrente por duas horas, submetido à desidratação com passagens sucessivas em soluções de concentrações crescentes de etanóis (de 70% a 100%) e diafanizado pelo xilol.

A inclusão foi feita em uma mistura de parafina histológica (56–58)°C, cera de abelhas, vaselina líquida e ácido esteárico¹¹.

Foram feitos cortes de 6 micrômetros (µm) de espessura em micrótomo¹², coletados em lâminas de vidro para microscopia¹³, desparafinados em estufa a 58°C

⁵ Sigma®, USA

⁶ Roche®, BRA

⁷ Merck®, Alemanha

⁸ Sigma®, USA

⁹ EMS®, BRA

¹⁰ Masterflex® S/L®

¹¹ Synth®, BRA

¹² Leica DMR®

¹³ Knittel®, Alemanha

e em série de xilóis; hidratados em soluções de concentrações decrescentes de etanóis e lavados em água destilada.

Foram feitas 5 colorações distintas (Figura 2): Hematoxilina-Eosina (ROMEIS, 1968) utilizada para a quantificação do volume ocupado pelas túnicas média e íntima e pela luz da aorta, Hematoxilina férrica de Verhoeff (PROPHET et al., 1992), resorcina de Weigert, resorcina de Weigert pós-oxidação com solução aquosa a 1% de oxona (MONTES,1996) e Picro-sírius (JUNQUEIRA et al., 1979). As quatro últimas para a quantificação, respectivamente, das lamelas elásticas (constituídas por elastina), das fibras elaunínicas, das oxitalânicas e do colágeno.

Figura 2 – Fotomicrografia de cortes histológicos da aorta de ratos. **A:** Hematoxilín-Eosina (Aumento 50X); **B:** Hematoxilina de Verhoeff; **C:** Resorcina de Weigert; **D:** Resorcina de Weigert com prévia oxidação; **E:** Picro-sírius sem luz polarizada. (Aumento: 1000X)

As secções foram desidratadas em soluções de concentrações crescentes de etanóis, diafanizadas em série de xilóis, e as lâminas montadas com lamínula e meio de montagem para microscopia¹⁴.

4.6 QUANTIFICAÇÃO

O estudo morfoquantitativo foi realizado no Laboratório de Anatomia Funcional Aplicada à Clínica e Cirurgia, do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

4.6.1 Estereologia

Para a estimação dos parâmetros subseqüentes, foram utilizados alguns princípios da estereologia, que é uma ferramenta precisa para se obter informações quantitativas tridimensionais de estruturas microscópicas, baseada principalmente em observações feitas a partir de secções bidimensionais (GUNDERSEN, 1988).

Foram obtidos seis cortes de cada amostra, de forma sistemática e uniformemente aleatória, sendo o primeiro corte obtido a partir de uma tabela de números randômicos (Anexo A) dentro do intervalo $\{1, K\}$, onde K era o número de cortes desprezados a cada intervalo de coleta dos mesmos (HOWARD; REED, 2005).

Foi utilizado um microscópio trinocular¹⁵ acoplado a uma vídeo-câmera¹⁶, conectados a um computador e a um monitor colorido de 17 polegadas. Foram obtidas imagens de alta resolução com um plano focal pequeno, utilizando-se objetivas de 5X e 100X e uma alta abertura numérica. Por meio de um sistema de

¹⁴ Entellan®, Merck®, Alemanha

¹⁵ Carl Zeiss Microimaging®, modelo Axioshop 40, Alemanha

¹⁶ Axio Cam HRC-ZEISS®, Alemanha

imagem computadorizado¹⁷ foram capturadas imagens das secções histológicas em toda a sua extensão (BRÜEL et al., 2005).

4.6.2.1 Volumes da aorta ($V_{[A]}$) e da luz ($V_{[luz]}$)

O volume das túnicas média e íntima da aorta e o volume de sua luz foram estimados pelo Princípio de Cavalieri (MAYHEW; OLSEN, 1991). O matemático italiano Bonaventura Cavalieri (1598-1647) demonstrou que o volume de qualquer objeto $V_{(obj)}$ pode ser estimado a partir de secções paralelas separadas por uma distância conhecida (T), somando-se as áreas de todas as secções obtidas do objeto ($\sum a$) e multiplicada por T . Assim, temos: $V_{(obj)} = T \times \sum a$.

Utilizando as imagens capturadas ao microscópio com aumento de 50X, foi sobreposto sobre elas um sistema-teste formado por pontos-teste em forma de cruz (Figura 3), eqüidistantes o suficiente para que fossem contados pelo menos 100 pontos sobre a estrutura de interesse, obtendo-se maior grau de acurácia na quantificação (MANDARIM-DE-LACERDA, 1995; VAN VRÉ et al., 2007).

Para a quantificação do volume ocupado pelas túnicas média e íntima da aorta e por sua luz (Figura 3), foram utilizados sistemas-teste com área por ponto (a/p) iguais a $2,25 \text{ mm}^2$ e $7,72 \text{ mm}^2$ respectivamente (HOWARD; REED, 2005).

¹⁷ Software Axion Vision® KS400 Rel. 4.6, Alemanha

Figura 3 - Fotomicrografia mostrando a técnica de quantificação dos volumes ocupados pelas túnicas média e íntima da aorta e por sua luz, com sistemas-teste formados por pontos-teste em forma de cruces. **A**: quantificação das túnicas média e íntima da aorta ($a/p = 2,25 \text{ mm}^2$). **B**: quantificação da luz da aorta ($a/p = 7,72 \text{ mm}^2$). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 50X

E, então, foram contados os pontos que tocavam apenas a área de interesse contida dentro do primeiro quadrante do ponto-teste (VAN VRÉ et al., 2007) (Figura 4: seta).

Figura 4 - Desenho do ponto-teste de escolha. A ponta da seta indica o quadrante considerado para a contagem do perfil de interesse.

O V_{ref} foi obtido pela seguinte equação:

$$V_{(ref)} = \sum P \times (a/p) \times t \times k \quad (1)$$

Onde, $\sum P$ = somatória de pontos que tocam o material de interesse

t = espessura do corte em μm

k = constante, igual ao número de cortes desprezados a cada intervalo de coleta dos mesmos

a/p = área por ponto

O Coeficiente de Erro ($CE_{V(ref)}$) para Cavalieri foi estimado a partir do “Noise Effect,” “Variância devido à amostragem sistematicamente aleatória (Var_{SURS})” e “Variância Total de $\sum P$ ” (equações 2, 3, 4).

$$\text{Noise Effect} = c \times (b/\sqrt{a}) \times \sqrt{n} \times \sum P \quad (2)$$

Onde, c = constante (0,0724)

b/a = estimativa do formato da estrutura. Neste caso o valor de $b/a = 4,5$ (GUNDERSEN; JENSEN, 1987)

n = número de secções obtidas

$\sum P$ = número total de pontos que atingem a região de interesse

$$Var_{SURS}(\sum a) = 3 (A - NOISE) - 4B + C / 240 \quad (3)$$

Onde, A = somatória de pontos de A x A

B = somatória de pontos de A x (A + 1)

C = somatória de pontos de A x (A + 2)

$$\text{Variância Total de } \sum P = \text{Noise} + \text{Var}_{\text{SURS}}(\sum a) \quad (4)$$

$$\text{CE}(\sum P) = \sqrt{\text{Variância Total} / \sum P} \quad (5)$$

Para o coeficiente de erro foi considerado um valor igual ou menor que 0,05, e geralmente é expresso em percentagem (GUNDERSEN et al., 1999).

4.6.2.2 Razão volume da aorta/volume da luz ($V_{[A]}/V_{[luz]}$)

Também foi calculada a razão entre o volume ocupado pelas túnica média e íntima da aorta e a luz do vaso:

$$R_{[A/ luz]} = V_{[A]} / V_{[luz]}$$

Onde, $V_{[A]}$ é o volume total das túnica média e íntima da aorta

$V_{[luz]}$ é o volume total da luz da aorta

4.6.2.3 Densidade de volume dos componentes da matriz-extracelular da túnica média da aorta

A densidade de volume expressa a fração do volume ocupado pela estrutura de interesse, pelo volume total (volume referência) (THOMPSON, 1930), ou seja, número total de pontos contados sobre o perfil de interesse, dividido pelo número total de pontos contados sobre o espaço referência (que nos três casos é a túnica média da aorta).

Assim, foi utilizada a seguinte equação (WULFSOHN et al., 2004):

$$V_V = \sum P_{[\text{perfil de interesse}]} / \sum P_{[\text{espaço referência}]}$$

Onde,

$\sum P_{[\text{perfil de interesse}]}$ = somatória dos pontos que tocam o perfil de interesse

$\sum P_{[\text{espaço referência}]}$ = somatória dos pontos que tocam o espaço referência

O valor da densidade de volume vai de 0 a 1, mas pode ser expresso em percentagem (HOWARD; REED, 2005).

Utilizando-se objetiva de 100X e óleo de imersão, cada corte histológico foi dividido em campos e, seguindo o padrão de amostragem sistemático e uniformemente aleatório (BRÜEL et al., 2005) com o uso de uma tabela de números randômicos (Anexo A), foi capturado um campo de cada um dos seis cortes histológicos obtidos de cada amostra. O mesmo sistema-teste, com a/p igual a 2,25 mm², utilizado para a obtenção dos volumes das túnicas média e íntima da aorta, foi empregado neste item. No entanto, a área de contagem foi delimitada por uma “frame” sem viés, formada por linhas de inclusão e exclusão, com área igual a 100 cm² (BRÜEL et al., 2005). Os perfis de interesse foram as lamelas elásticas (Figura 5), as fibras elaunínicas (Figura 6), as fibras oxitalânicas (Figura 7) e o colágeno (Figura 8).

Na sendo possível a distinção das fibras oxitalânicas das elaunínicas, para a quantificação das primeiras, foram contados todos os pontos que caíam sobre o material corado, subtraído o total de pontos contados para a quantificação das elaunínicas.

Figura 5 - Fotomicrografia da aorta mostrando a técnica de quantificação das lamelas elásticas coradas em preto (seta). Observar o sistema-teste de pontos e a “frame” sem viés delimitando a área de contagem: linhas de exclusão (brancas) e de inclusão (verdes). Coloração: Hematoxilina de Verhoeff. Aumento: 1000X

Figura 6 - Fotomicrografia da aorta mostrando a técnica de quantificação das fibras elauínicas entre as lamelas elásticas (seta). Observar o sistema-teste de pontos e a “frame” sem viés delimitando a área de contagem: linhas de exclusão (pretas) e de inclusão (verdes). Coloração: Resorcina de Weigert. Aumento: 1000X

Figura 7 - Fotomicrografia da aorta mostrando a técnica de quantificação das fibras oxitalânicas entre as lamelas elásticas (seta). Observar o sistema-teste de pontos e a “frame” sem viés delimitando a área de contagem: linhas de exclusão (pretas) e de inclusão (verdes). Coloração: Resorcina de Weigert.com prévia oxidação. Aumento: 1000X

Figura 8 - Fotomicrografia da aorta mostrando a técnica de quantificação do colágeno, fotografado sem luz polarizada, corado em vermelho. Observar o sistema-teste de pontos e a “frame” sem viés delimitando a área de contagem: linhas de exclusão (pretas) e de inclusão (verdes). Coloração: Picro-sirius. Aumento: 1000X

4.6.2 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados por média e desvio padrão. Empregou-se análise de variância com dois fatores com o objetivo de verificar o efeito da ovariectomia e do exercício físico nas variáveis de interesse, seguida de comparações múltiplas método de Tukey. A homogeneidade de variâncias foi verificada, e quando necessário utilizou-se transformação nos dados.

O peso e a velocidade foram avaliados empregando-se análise de variância com medidas repetidas nos testes de esforço máximo.

O nível de significância adotado em todos os testes foi 5%.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados são apresentados em tabelas, gráficos e fotomicrografias do material obtido.

5.1 OVARIECTOMIA E NÍVEIS DE ESTRADIOL

Após as cirurgias de ovariectomia, apenas um animal foi a óbito, o qual foi substituído.

Os níveis de estradiol nos animais ovariectomizados são mostrados na tabela 1.

Tabela 1 – Níveis de estradiol (pg/mL) dos grupos GOS e GOT - São Paulo – 2009

Animal	GOS	GOT
1	21,39	20,35
2	13,35	19,35
3	5,37	7,87
4	16,37	1,16
5	35,77	10,15
Valores de referência ¹ (pg/mL) em ratos: proestro: superior a 15; proestro/estro: de 25 a 100; diestro: de 5 a 10; gestação: inferior a 50; fêmea castrada: inferior a 50; macho: inferior a 18.		

A seguir são apresentadas as tabelas com as médias, seguidas dos seus valores de desvio padrão ($\pm$ dp) e os respectivos gráficos referentes aos parâmetros avaliados.

¹ Valores de referência obtidos dos exames hormonais realizados no laboratório Rhesus.

5.2 DESEMPENHO NOS TESTES DE ESFORÇO MÁXIMO

As velocidades alcançadas nos testes de esforço máximo (Tabela 2) foram analisadas separadamente entre os quatro grupos estudados (Figura 9) e também comparando os grupos sedentários com os treinados (Figura 10).

Tabela 2 – Médias $\pm$ dp das velocidades máximas (m/s) obtidas nos TEMs - São Paulo – 2009

TEM	GIS	GIT	GOS	GOT
1º TEM	0,28 $\pm$ 0,07	0,19 $\pm$ 0,04	0,19 $\pm$ 0,07	0,19 $\pm$ 0,04
2º TEM	0,26 $\pm$ 0,03	^a 0,28 $\pm$ 0,07	0,23 $\pm$ 0,07	^c 0,34 $\pm$ 0,08
3º TEM	0,23 $\pm$ 0,07	^b 0,33 $\pm$ 0,08	0,23 $\pm$ 0,07	0,26 $\pm$ 0,03

$p < 0,05$: **a** GIT no 2º TEM X GIT no 1º TEM; **b** GIT no 3º TEM X GIT no 1º TEM; **c** GOT no 2º TEM X GOT no 1º TEM.

Quanto às comparações dos quatro grupos, nota-se que o grupo GOS não apresentou melhora significativa, enquanto que o GIS apresentou queda. O GIT apresentou melhora significativa tanto no segundo TEM em comparação com o primeiro TEM, quanto no terceiro em comparação ao primeiro. O GOT apresentou melhora significativa apenas no segundo TEM em relação ao primeiro, e sofreu queda no terceiro TEM em relação ao segundo (Figura 9).

Figura 9 – Gráfico das velocidades obtidas nos TEMs, comparando os grupos GIS, GIT, GOS e GOT. As linhas verticais do gráfico representam o desvio padrão

A comparação entre os grupos sedentários (GIS e GOS) e treinados (GIT e GOT) mostra que os sedentários não obtiveram melhora significativa. Enquanto que os grupos treinados obtiveram melhora de 73% e 36%, respectivamente, na comparação entre o primeiro e terceiro TEM (Figura 10).

Figura 10 – Gráfico das velocidades obtidas nos três TEMs dos grupos sedentários (GIS e GOS) e dos grupos treinados (GIT e GOT). As linhas verticais do gráfico representam o desvio padrão

5.3 MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS

Os valores da massa corporal apresentados na tabela 3 foram analisados separadamente em cada grupo (Figura 11); comparando os grupos sedentários com treinados (Figura 12) e comparando grupos intactos com ovariectomizados (Figura 13).

Tabela 3 – Médias $\pm$ dp das massas corporais dos animais, obtidas por ocasião dos três TEMs e da eutanásia - São Paulo – 2009

	GIS	GIT	GOS	GOT
1º TEM	239,6 $\pm$ 8,17	257,4 $\pm$ 15,75	240,0 $\pm$ 26,19	250,4 $\pm$ 29,57
2º TEM	235,6 $\pm$ 10,52	254,4 $\pm$ 19,62	257,6 $\pm$ 39,78	257,6 $\pm$ 20,51
3º TEM	241,6 $\pm$ 15,19	241,2 $\pm$ 19,91	276,2 $\pm$ 47,25	262,4 $\pm$ 24,63
Eutanásia	243,6 $\pm$ 17,74	257,2 $\pm$ 14,80	^a 278,4 $\pm$ 50,54	^b 271,6 $\pm$ 26,66

p < 0,05: **a** GOS na eutanásia X GOS no 1º TEM; **b** GOT na eutanásia X GOT no 1º TEM.

Figura 11 – Gráfico dos valores das massas corporais dos grupos GIS, GIT, GOS e GOT, obtidas nos três TEMs e na eutanásia. As linhas verticais do gráfico representam o desvio padrão

As comparações entre os grupos sedentários (GIS e GOS) e treinados (GIT e GOT) revelam que ao longo do experimento houve ganho de peso, porém não há diferença significativa entre sedentários e treinados (Figura 12).

Figura 12 – Gráfico dos valores das massas corporais dos grupos sedentários (GIS e GOS) e dos grupos treinados (GIT e GOT), obtidas nos três TEMs e na eutanásia. As linhas verticais do gráfico representam o desvio padrão

Quando a comparação é feita entre os grupos intactos (GIS e GIT) e ovariectomizados (GOS e GOT), observa-se que ao longo do experimento o ganho de massa corporal dos animais dos grupos ovariectomizados é significativamente maior do que dos grupos intactos (Figura 13).

Figura 13 – Gráfico dos valores das massas corporais dos grupos intactos (GIS e GIT) e dos grupos ovariectomizados (GOS e GOT), obtidos nos três TEMs e na eutanásia. As linhas verticais do gráfico representam o desvio padrão

5.4 VOLUMES DA AORTA E DA LUZ E RAZÃO VOLUME DA AORTA/VOLUME DA LUZ

Os valores referentes aos volumes da aorta e da luz e a razão entre ambos não mostrou diferença significativa entre os grupos. A tabela 4 mostra os valores e as figuras 14, 15, 16 os representam graficamente. E a figura 17 exemplifica a aorta de cada um dos grupos estudados.

Tabela 4 – Médias $\pm$ dp dos volumes (mm^3) das túnica média e íntima da aorta, da luz e da razão entre ambos - São Paulo – 2009

	GIS	GIT	GOS	GOT
$V_{[A]} (\text{mm}^3)$	$1,95 \pm 0,21$	$1,64 \pm 0,18$	$2,02 \pm 0,30$	$1,95 \pm 0,34$
$V_{[luz]} (\text{mm}^3)$	$7,08 \pm 1,22$	$5,81 \pm 0,84$	$7,23 \pm 1,36$	$7,19 \pm 1,02$
$V_{[A]} / V_{[luz]}$	$0,27 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,04$	$0,27 \pm 0,06$

Figura 14 - Gráfico das comparações dos volumes das túnica média e íntima da aorta

Figura 15 – Gráfico das comparações do volume da luz da aorta

Figura 16 – Gráfico das comparações da razão volume da aorta / volume da luz da aorta

Figura 17 - Fotomicrografias da aorta mostrando a parede arterial e a luz. A: GIS; B: GIT; C: GOS; D: GOT. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 50X

5.5 DENSIDADE DE VOLUME DOS COMPONENTES DA MATRIZ EXTRA-CELULAR

A tabela 5 mostra a densidade de volume das lamelas elásticas, das fibras elaunínicas, oxitalânicas e do colágeno. As figuras 18, 20, 22 e 24 representam graficamente as comparações entre os grupos; e as figuras 19, 21, 23 e 25 ilustram o material obtido de cada um dos grupos estudados.

Tabela 5 – Médias + dp das densidades de volume (%) das lamelas elásticas, das fibras elaunínicas, oxitalânicas e do colágeno - São Paulo – 2009

	GIS	GIT	GOS	GOT
$V_{V[\text{lamelas}]}$	20,20 $\pm$ 4,60	^b 25,00 $\pm$ 4,30	15,60 $\pm$ 3,91	^c 16,20 $\pm$ 2,38
$V_{V[\text{elaunínicas}]}$	29,20 $\pm$ 2,77	^a 21,00 $\pm$ 3,80	25,40 $\pm$ 4,33	^c 30,00 $\pm$ 4,47
$V_{V[\text{oxitalânicas}]}$	11,40 $\pm$ 6,26	^b 26,60 $\pm$ 5,50	15,40 $\pm$ 4,66	^c 13,80 $\pm$ 1,78
$V_{V[C]}$	16,80 $\pm$ 2,77	^a 22,40 $\pm$ 1,94	19,20 $\pm$ 3,70	^{c,d} 14,20 $\pm$ 2,16

p < 0,05: **a** GIS X GIT; **b** GIT X GOS; **c** GIT X GOT; **d** GOS X GOT

Figura 18 – Gráfico das comparações da densidade de volume das lamelas elásticas ($p < 0,05$: **b** GIT X GOS; **c** GIT X GOT)

A densidade de volume das lamelas do grupo GIT é significativamente maior quando comparado ao GOS e ao GOT.

Figura 19 – Fotomicrografias da aorta mostrando as lamelas elásticas evidenciadas em preto. **A**: GIS; **B**: GIT; **C**: GOS; **D**: GOT. Coloração: Hematoxilina de Verhoeff. Aumento: 1000X

Figura 20 – Gráfico das comparações da densidade de volume das fibras elaunínicas ($p < 0,05$: a GIS X GIT; c GIT X GOT)

Os resultados mostram que a densidade de volume das fibras elaunínicas é significativamente menor no GIT quando comparado ao GIS e ao GOT.

Figura 21 – Fotomicrografias da aorta mostrando as fibras elaunínicas, evidenciadas entre as lamelas elásticas. A: GIS; B: GIT; C: GOS; D: GOT. Coloração: Resorcina de Weigert. Aumento: 1000X

Figura 22 – Gráfico das comparações da densidade de volume das fibras oxitalânicas ($p < 0,05$: a GIT X GIS; b GIT X GOS; c GIT X GOT)

A densidade de volume das fibras oxitalânicas do GIT é significativamente maior em comparação aos demais grupos.

Figura 23 - Fotomicrografias da aorta mostrando as fibras oxitalânicas, evidenciadas entre as lamelas elásticas. **A:** GIS; **B:** GIT; **C:** GOS; **D:** GOT. Coloração: Resorcina de Weigert pós-oxidação. Aumento: 1000X

Figura 24 - Gráfico das comparações da densidade de volume do colágeno ($p < 0,05$: **a** GIS X GIT; **c** GIT X GOT; **d** GOS X GOT)

A quantidade de colágeno é significativamente maior no GIT em comparação aos grupos GIS e GOT, e significativamente maior no GOS em comparação com GOT.

Figura 25 - Fotomicrografias da aorta mostrando o colágeno, fotografado sem luz polarizada, evidenciado em vermelho. **A:** GIS; **B:** GIT; **C:** GOS; **D:** GOT. Coloração: Picro-sirius. Aumento: 1000X

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A discussão dos achados desta pesquisa abordará os tópicos considerados relevantes e pertinentes aos objetivos propostos.

6.1 OVARECTOMIA E NÍVEIS DE ESTRADIOL

Após as cirurgias de ovariectomia, apenas um animal foi a óbito, o qual foi substituído.

A observação dos dados referentes à dosagem hormonal e dos valores de referência mostram que todos os animais ovariectomizados apresentaram taxa de estradiol compatível com a de animal castrado.

6.2 DESEMPENHO NOS TESTES DE ESFORÇO MÁXIMO

Nas comparações das velocidades máximas obtidas no primeiro TEM e no último, os grupos sedentários (GIS e GOS) não apresentaram diferença significativa. Ao contrário dos grupos treinados GIT e GOT, que obtiveram melhora em seus desempenhos da ordem de 73% e 36%, respectivamente. Podemos dizer que mesmo em situações com carência de estrogênios, o exercício físico foi capaz de promover um condicionamento físico, permitindo alcance de maior velocidade máxima nos TEMs.

Nossas conclusões corroboram o estudo de Stathokostas et al. (2008), no qual não observaram diferenças na capacidade aeróbica de mulheres submetidas à TRH em comparação com mulheres que não fizeram uso do medicamento.

Entretanto, MERCURO et al. (2006) sugerem que a privação de estrogênios reduz a capacidade para a realização de exercícios físicos.

6.3 MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS

Após 12 semanas de experimento pôde-se observar que os grupos ovariectomizados (GOS e GOT) apresentaram aumento da massa corporal, significativamente maior que os grupos intactos (GIS e GIT). Enquanto o grupo GIS obteve aumento de 1% e o grupo GIT não obteve variação, os grupos GOS e GOT obtiveram aumento da massa corporal da ordem de 16% e 8%, respectivamente. Provavelmente, o aumento tenha relação com a síndrome metabólica que acomete cerca de 40% das mulheres na menopausa, a qual é marcada pelo aumento da massa corporal, de fatores inflamatórios, pró-coagulantes e obesidade (LOBO, 2008).

Os receptores estrogênicos-alfa, localizados no hipotálamo, são os principais mediadores dos efeitos da homeostasia energética (HEINE et al., 2000). Eles controlam a ingestão alimentar, o consumo de energia e a distribuição de gordura no organismo. Após eliminação da expressão do receptor de estrogênicos-alfa no núcleo ventromedial do hipotálamo, um centro da homeostasia energética, fêmeas de camundongos e ratos desenvolveram fenótipo característico da síndrome metabólica caracterizada por obesidade, hiperfagia, intolerância à glicose, inatividade física e redução do consumo energético, sendo o último o principal fator desencadeador do ganho de peso nestes animais (MUSATOV, 2007).

Shinoda et al. (2002) concluiu que o exercício físico trouxe alguma redução do peso das gorduras em determinados órgãos de ratas ovariectomizadas, apesar de a ovariectomia levar ao aumento da massa corporal total.

Os hormônios ovarianos exercem efeitos sobre o metabolismo de lipídios e carboidratos e podem modular o metabolismo desses substratos, reduzindo a atividade de enzimas e o metabolismo dos mesmos (CAMPBELL; FEBBRAIO, 2001).

Assim como nos estudos mencionados, na presente pesquisa também demonstrou-se que a carência de estrogênicos leva ao aumento da massa corporal. O exercício físico aeróbio não interferiu neste aspecto a ponto de manter os valores da massa corporal próximos dos grupos intactos, mas colaborou para que o aumento da massa corporal fosse menos expressivo no GOT do que no GOS.

6.4 VOLUMES DA AORTA E DA LUZ E RAZÃO VOLUME DA AORTA/VOLUME DA LUZ

Nenhum dos grupos apresentou diferença significativa entre si, tanto nos volumes das túnicas média e íntima da aorta, da luz e a razão entre esses dois parâmetros. Corroborando achados de Matsuda et al. (1989), que não observaram diferenças na espessura da parede da aorta, no comprimento circunferencial interno e na razão entre a espessura da parede e a área da luz da aorta de ratos treinados e sedentários de nove semanas de idade. E Sugawara et al. (2004) não observaram diferenças na espessura da parede da artéria carótida e a área de sua luz quando compararam um grupo de indivíduos treinados com idade entre 52 e 66 anos com 40% da FC máxima e outro com 70% da FC máxima.

Em estudos com ratas hipertensas, Marques et al. (2006) demonstraram que a espessura da parede da aorta de ratas ovariectomizadas, sejam elas treinadas ou sedentárias, é bastante similar. Já entre os animais intactos a espessura foi menor nos treinados do que nos sedentários. E menor no grupo intacto-treinado em comparação ao ovariectomizado-treinado, concluindo que o exercício físico é mais eficiente em ovariectomizados do que nos intactos. Entretanto, vale ressaltar que a ovariectomia havia sido realizada aos três meses de idade. No presente estudo a remoção dos ovários foi realizada aos seis meses de idade, idade na qual as alterações oriundas do processo de maturação e envelhecimento, provavelmente, já estavam determinadas, como menciona Matsuda et al. (1989).

Esse tema ainda é controverso, pois para Wenger et al. (1988) a redução da espessura da parede arterial, assim como a sua dilatação, está relacionada ao seu processo de degeneração. Já Hayashi et al. (2005) citam que o aumento do diâmetro arterial está, em parte, associado à redução de seu enrijecimento.

Na presente pesquisa, a ovariectomia e o exercício físico aeróbio não interferiram nestes parâmetros.

6.5 DENSIDADE DE VOLUME DOS COMPONENTES DA MATRIZ EXTRA-CELULAR

Consideramos que a análise do comportamento dos componentes da matriz extra-celular seja feita de forma conjunta. Pois é a inter-relação e o papel conjunto dos sistemas elástico e colágeno que desempenham as funções exercidas pela parede de um vaso. A elastina confere elasticidade, ou seja, permite complacência; enquanto o colágeno atua na parede proporcionando resistência, isto é, limita a extensibilidade excessiva. Juntas, essas duas estruturas, promovem uma adequada propriedade mecânica na parede da artéria (MATSUDA et al., 1993; MATSUDA et al., 1989), fato que interfere na complexa fisiologia hemodinâmica do vaso. Valendo-nos das palavras de Cabral (2002, p. 74):

A importância de se conhecer a forma de alguma estrutura do organismo não se limita apenas ao caráter descritivo do estudo, mas principalmente, aos aspectos funcionais que poderão ser extraídos deste conhecimento.

Procuramos, então, integrar a anatomia à fisiologia, com o intuito de se alcançar o conhecimento não apenas teórico, mas também aplicável à clínica.

A densidade de volume significativamente maior das lamelas elásticas no GIT em comparação ao GOS e GOT sugere que níveis normais de estrogênios associados ao aumento da PA provocado pelo exercício físico desencadearam um processo protetor para evitar tensões exageradas na parede da aorta. Todavia, a ausência de diferença significativa entre GIT e GIS e a comparação estatística entre grupos treinados e sedentários mostram que o fator que mais interferiu nesta característica não foi o exercício, e sim a ovariectomia. Fato que corrobora estudos que relacionam a carência de estrogênios ao enrijecimento arterial (JONASON, et al., 1998; KALLIKAZAROS et al., 2002), justificada pelo aumento do vasoconstritor endotelina-1 (YANES et al., 2005) e redução do vasodilatador NO (JIANG, 1991). Também está descrito que a carência de estrogênios está relacionada com a deposição de cálcio nas placas de ateroma em artérias coronárias (CHRISTIAN et al., 2002). Os estrogênios controlam ainda a produção de TNF-alfa, uma citocina encontrada em ossos e em placas de ateroma, capazes de induzir a calcificação das células musculares lisas vasculares (TINTUT et al., 2000).

Em contrapartida, Park et al. (2008), por meio de estudos bioquímicos e biomecânicos do arco da aorta e da aorta descendente de ratas com seis semanas de idade, concluíram que após 12 semanas de ovariectomia a deficiência de estrogênios, associada ou não à dieta pobre em cálcio, não influenciou na rigidez, na degeneração da elastina ou na deposição de cálcio na parede do vaso. Entretanto, os autores não descartam a possibilidade de a deficiência de estrogênios causar rigidez arterial ao longo do processo de envelhecimento desses animais.

Se considerarmos, por hipótese, que a reduzida densidade de volume das lamelas elásticas nos grupos GOS e GOT ocorreu ao longo do leito vascular, essa característica pode ter prejudicado o fluxo sangüíneo, já que este é determinado não somente pela diferença de pressão entre dois pontos do leito vascular, como também pela RVP. A propriedade elástica das lamelas de retornar ao seu estado natural após um estiramento, faz com que o sangue seja impelido pelo leito vascular. Um tecido dotado de menor capacidade elástica, tem também menor capacidade de retornar ao seu estado não distendido (RODRIGUES JUNIOR, 1987; GUYTON; HALL, 1996). Assim, o aumento da PA provocado pelo exercício físico, somado ao enrijecimento arterial não distenderia os vasos e, conseqüentemente, não haveria redução da resistência e nem aumento do fluxo sangüíneo no leito vascular. Portanto, no que tange às características morfoquantitativas das lamelas elásticas, notamos que o exercício físico beneficiou o GIT, mas não o GOT.

Entretanto, estudos bioquímicos em ratos machos jovens com nove semanas de idade, Matsuda et al. (1989) apontam quantidade significativamente maior de elastina na parede da aorta descendente de treinados do que de sedentários. Em ratos, a estrutura lamelar das fibras elásticas da aorta apresenta degenerações e ocorrem mudanças na proporção de proteínas que constituem as lamelas com o avançar da idade, como por exemplo, em ratos de seis meses de idade o ácido-polar-amino torna-se significativamente aumentado (KEELEY; PARTIRIDGE, 1974). A composição anormal da elastina também pode ser por mudanças na amarração de outras proteínas por pontes de cálcio da elastina original (KEELEY; PARTIRIDGE, 1974). Em ratos treinados houve ainda menor deposição de cálcio, menor proporção de ácido-polar-amino e, provavelmente, menor degeneração, o que pode estar relacionado ao aumento da extensibilidade da elastina e da parede da aorta. Em outro estudo, Matsuda et al. (1993) verificaram aumento da elastina e redução de cálcio contido na elastina de ratos machos jovens treinados. Os autores ratificam

que a prática de exercícios físicos iniciada precocemente colabora para reduzir o cálcio depositado na elastina da parede arterial e, provavelmente, promove maior complacência da aorta.

Isso também poderia explicar a ausência de diferença significativa entre os grupos GIS e GIT, visto que aos seis meses de idade os animais já apresentariam alterações protéicas na composição das lamelas elásticas. Assim, ratificando estudos de Matsuda et al. (1989) e conclusões de Ferreira et al. (2006), sugerimos que o exercício físico iniciado precocemente possa interferir positivamente na complacência da aorta. Em estudos realizados em humanos, outros autores também consideram que o grau de eficiência da redução da rigidez arterial em mulheres na menopausa está relacionado com o quão precoce o exercício físico é iniciado (MOREAU et al., 2003; SUGAWARA et al., 2006).

Com relação às fibras elastínicas, a observação mais relevante foi a densidade de volume significativamente menor no grupo GIT em relação os grupos GIS e GOT, possivelmente havendo uma compensação do aumento do número de lamelas elásticas. As grandes tensões geradas durante o exercício podem ter desencadeado um mecanismo protetor para evitar que a elasticidade promovida pelo aumento da densidade de volume das lamelas elásticas não permitisse um excesso de dilatação do vaso. A ausência de diferença significativa entre si dos grupos GIS, GOS e GOT revelou que neste experimento a ovariectomia isolada ou associada ao exercício físico não interferiu neste parâmetro.

Em respeito às fibras oxitalânicas, mais uma vez o grupo GIT se diferenciou dos demais, apresentando densidade de volume significativamente maior. O que contribui para aumentar a resistência do vaso, visto que o papel das oxitalânicas é o de promover resistência em regiões sujeitas a estresse mecânico (GOLDFISCHER et al., 1983; RODRIGUES JUNIOR, 1987; HORTA et al., 2005). Os demais grupos não apresentaram diferença significativa entre si.

Quanto ao colágeno houve diferença nas comparações entre GIT e GIS, e entre GIT e GOT, com o GIT apresentando valores significativamente maiores. Sugerimos que o aumento do colágeno representa um papel importante, pois o aumento da PA e da FC durante o treinamento físico acarreta maior pressão nos vasos arteriais, especialmente no trecho ascendente da aorta, que recebe as maiores pressões quando o ventrículo esquerdo se contrai (MATSUDA et al., 1987). Segundo Xu et al. (2000), o aumento da pressão na luz estimula a produção de

colágeno. Provavelmente, um mecanismo protetor que ainda desconhecemos, tenha ação na produção de tecidos que impeçam a expansão dos vasos e reduza aqueles responsáveis pela dilatação excessiva, o que permite complacência e resistência, com conseqüente acomodação de um grande volume sangüíneo no leito vascular e, ao mesmo tempo, prevenindo uma possível laceração ou ruptura do vaso em situações de alta pressão.

Matsuda et al. (1989) também verificaram que em ratos treinados, além de o conteúdo de elastina da aorta aumentar, o conteúdo do colágeno também foi maior do que em ratos sedentários, havendo aumento do conteúdo elástico sem reduzir o conteúdo colágeno. Segundo os mesmos autores a proporção adequada de componentes com alta capacidade elástica e substâncias menos elásticas, podem ter uma capacidade elástica efetiva maior do que o componente elástico isoladamente.

Um achado relevante entre os grupos GOS e GOT é que o último apresentou densidade de volume significativamente menor de colágeno. Nesse caso é sugerido que o exercício físico colaborou para a redução do enrijecimento do vaso. Esse fato é importante para manter a adequada RVP e reduzir tensões na parede da aorta e para permitir o fluxo sangüíneo satisfatório pelo leito vascular.

Entretanto, sob o aspecto funcional, questionamos até que ponto o volume reduzido de colágeno foi eficaz para a manutenção da propriedade elástica sem prejuízo da sua resistência. São pertinentes avaliações mecânico-funcionais que simulem a hemodinâmica em grupos experimentais como os apresentados neste estudo, para se obter respostas mais precisas sob o efeito funcional dessas alterações na fisiologia da circulação.

Quanto aos benefícios do exercício físico para os vasos arteriais, sabe-se também que a prática crônica dos mesmos aumenta a produção de óxido nítrico (LEWIS, et al., 1999; HAMBRECHT et al., 2003) e óxido nítrico vasodilatador derivado do endotélio, e reduz as concentrações plasmáticas de endotelina-1, um vasoconstritor em humanos (MAEDA et al., 2003), resultando em vasodilatação. Assim, também podemos especular sobre fatores que auxiliem na complacência arterial por reduzir o tônus vasoconstritor.

Apesar de os mecanismos pelos quais o exercício físico aeróbio afete as propriedades das artérias ainda serem pouco estudados em humanos (FERREIRA, 2006), especula-se que também exista relação com os benefícios já bastante

consagrados como a melhora da HAS, redução da gordura corporal, melhora da resistência à insulina, etc., que estão intimamente ligados ao enrijecimento arterial (STEHOUWER; FERREIRA, 2006). Além disso, deve-se considerar os benefícios do exercício físico na atividade simpática e na disfunção endotelial, que desencadeiam enrijecimento das artérias (FERREIRA et al., 2006). Desta forma, muito provavelmente a melhora deve-se à ação benéfica conjunta desses fatores.

Assim como o exercício, o estradiol também aumenta a liberação de NO. Na fase aguda da suplementação com 17-beta-estradiol ocorre relaxamento da aorta (JIANG, 1991), de artérias mesentéricas (SHAW et al., 2000) e coronárias (MUGGE et al., 1993). Após a ovariectomia ocorre aumento da pressão arterial, pois a carência de estrogênios está envolvida no aumento da endotelina-1, o que colabora para desencadear a HAS pós-menopáusia em ratas (YANES et al., 2005).

As desordens que a privação de estrogênios acarretam para o SCV são exemplos de como a perda da distensibilidade vascular favorece DCVs no futuro (BLACHER et al., 1999). O aumento da rigidez arterial, associada às desordens causadas pelo envelhecimento, colabora para o desenvolvimento de HAS (pelo aumento da RVP), sobrecarga do ventrículo esquerdo, alterações da perfusão coronariana (LONDON et al., 2004), hipertrofia ventricular esquerda, lesão endotelial e desenvolvimento de aterosclerose (NICHOLS, 2005). O aumento de 2 mmHg na pressão sistólica, aumenta em 7% o risco de morte por acidente vascular encefálico e em 5% de morte por doença arterial coronariana (LEWINGTON et al., 2002).

As alterações na quantidade e qualidade de qualquer um dos constituintes da matriz, tais como: água, íons, proteoglicanas, colágeno e fibras elásticas podem ser a base de doenças que afetam diretamente a aorta. O aumento na rigidez vascular é determinado por um aumento na proporção colágeno-elastina e também pela deposição de cálcio e lipídeos (AGUILA; MANDARIM-DE-LACERDA, 2003). Desta forma, a carência de estrogênios e as pressões a que o vaso é submetido durante o exercício físico aeróbio influenciariam na constituição da matriz, mudando a proporção de seus constituintes.

Desta maneira, as mudanças estruturais da parede das artérias, como as mudanças quantitativas da elastina e do colágeno, refletem as mudanças adaptativas produzidas pelo exercício e pelas alterações a que o organismo é submetido ao longo do seu processo de maturação e desenvolvimento. Sokolis (2007) diz que a constituição da aorta varia conforme o grau de pressão a que está

sujeita: em regiões de maior pressão apresenta característica mais rígida e com maior conteúdo de colágeno; e em regiões de menor pressão é mais distensível e com maior conteúdo elástico.

Em vista do exposto, pode-se supor que a prática de exercício físico aeróbio submáximo a 60% da capacidade aeróbia pode ser uma indicação para atenuar a perda da elasticidade arterial provocada pela deprivação de estrogênios. Em seus estudos, Zieman et al. (2005) ressaltam que o aumento da complacência arterial está associado à redução de risco cardiovascular. Inclusive, as DCVs ainda são as que mais acometem a mulher no climatério no Brasil (DATA SUS, 2008) e no mundo, o que leva a índices altos de morbidade e mortalidade em mulheres no período de pós-menopausa.

Todavia, devemos lembrar a importância de se realizar experimentos morfológicos em conjunto com áreas como a fisiologia e a clínica, para que os achados sejam aplicáveis ao dia-a-dia do profissional de saúde de forma a beneficiar um ser, seja ele homem ou animal.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados e as análises realizadas neste estudo, pode-se concluir que em ratas Wistar:

- 1) A prática de exercício físico aeróbio com intensidade submáxima de 60%, com duração de 3 meses, melhora o desempenho físico mesmo na presença de baixos níveis de estrogênios.
- 2) A carência de estrogênios acarreta aumento da massa corporal total.
- 3) A deprivação de estrogênios e a prática de exercício físico aeróbio em ratos a partir dos seis meses de idade, não modificam o volume ocupado pelas túnicas média e íntima da aorta, por sua luz, e tampouco a razão entre esses parâmetros.
- 5) A deprivação de estrogênios reduz a densidade de volume das lamelas elásticas da túnica média da aorta. Entretanto, o exercício físico aeróbio não interfere nesta redução.
- 6) O exercício físico aeróbio associado a níveis normais de estrogênios aumenta a densidade de volume das lamelas elásticas, das fibras oxitalânicas e do conteúdo colágeno da túnica média da aorta; e reduz a densidade de volume das fibras elaunínicas.
- 7) O exercício físico aeróbio associado à carência de estrogênios reduz a densidade de volume do colágeno da túnica média da aorta.

Assim, pode-se supor que o exercício físico aeróbio, mesmo se iniciado na fase adulta do animal, pode ser um recurso para evitar a perda da elasticidade da aorta ascendente de ratas Wistar em situações de carência de estrogênios.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Aorta wall quantitative alterations due to different long-term high-fat diet in rats. **Food and chemical Toxicology**, v. 41, p. 1391-1397, 2003.

ALDRIGHI, J. M. **Repercussões dos estrogênios e progesterônios sobre as lesões ateroscleróticas da aorta e das artérias coronárias em coelhas ovariectomizadas submetidas à dieta hipercolesterolêmica**. 1996. 101 f. Tese (Livre Docência). Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 1996.

AMÂNCIO, A.; CAVALCANTI, P. C. U. **Clínica geriátrica**. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1975, 312 p.

ANDERSON, G. L.; LIMACHER, M.; ASSAF, A. R.; BASSFORD, T.; BERESFORD, S. A.; BLACK, H.; BONDS, D.; WOMEN'S HEALTH INITIATIVE STEERING COMMITTEE. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial. **The Journal of the American Medical Association**, v. 291, p. 1701–1712, 2004.

BARNES, M. J.; FARNDAL, R. W. Collagens and atherosclerosis. **Experimental Gerontology**, v. 34 n. 4, p. 513-525, 1999.

BARRETT-CONNOR, E. Sex differences in coronary heart disease. Why are women so superior? **Circulation**, v. 95, p. 252– 264, 1997.

BEITZ, R.; DÖREN, M. Physical activity and postmenopausal health. **Journal of the British Menopause Society**, v. 10, n. 2, p. 70-74, 2004.

BITTNER, V. Menopause and cardiovascular risk cause or consequence? **Journal of the American College of Cardiology**, v. 47, n. 10, p. 1984-1986, 2006.

BITTNER, V. Women and coronary heart disease risk factors. **Journal of Cardiovascular Risk**, v. 9, n. 6, p. 315-322, 2002.

BLACHER, J.; GUERIN, A. P.; PANNIER, B.; MARCHAIS, S. J.; SAFAR, M. E.; LONDON, G. M. Impact of aortic stiffness on survival in end-stage renal disease. **Circulation**, v. 99, p. 2434–2439, 1999.

¹ De acordo com as Diretrizes para apresentação de dissertações e teses na FMVZ-USP, elaborada a partir das normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

BOREHAM, C. A.; FERREIRA, I.; TWISK, J. W.; GALLAGHER, A. M.; SAVAGE, M. J.; MURRAY, L. J. Cardiorespiratory fitness, physical activity and arterial stiffness: The Northern Ireland Young Hearts Project. **Hypertension**, v. 44, p. 721–726, 2004.

BOZAS, G.; DIMOPOULOS, M. A.; KASTRITIS, E.; EFSTATHIOU, E.; KOUTSOUKOU, V.; RODOLAKIS, A.; VLAHOS, G.; VOULGARIS, Z.; PAPAGEORGIOU, T.; GIKA, D.; PAPADIMITRIOU, C.; BAMIAS, A. Young age is associated with favorable characteristics but is not an independent prognostic factor in patients with epithelial ovarian cancer: a single institution experience. **Oncology**, v. 70, n. 4, p. 265-272, 2006.

BRADAMANTE, Z.; SVAJGER, A. Pre-elastic (oxytalan) fibres in the developing elastic cartilage of the external ear of the rat. **Journal of Anatomy**, v. 123, p. 735-743, 1977, Pt .3.

BRÜEL, A.; OXLUND, H.; NYENGARD, J. R. The total length of myocytes and capillaries, and total number of myocyte nuclei in the rat heart are time-dependently increased by growth hormone. **Growth Hormone & IGF Research**, v. 15, p. 256–264, 2005.

BRUM, P. C.; FORJAZ, C. L. M.; TINUCCI, T.; NEGRÃO, C. E. Adaptações agudas e crônicas do exercício físico no sistema cardiovascular. **Revista Paulista de Educação Física**, v. 18, p. 21-31, 2004.

BRUM, P. C.; SILVA, G. J.; MOREIRA, E. D.; IDA, F.; NEGRÃO, C. E.; KRIEGER, E. M. Exercise training increases baroreceptor gain-sensitivity in normal and hypertensive rats. **Hypertension**, v. 36, p. 1018-1022, 2000.

BUPHA-INTR, T.; WATTANAPERMPOOL, J. Cardioprotective effects of exercise training on myofilament calcium activation in ovariectomized rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 96, p.1755–1760, 2004.

CABRAL, R. H. **Análise morfofuncional das artérias torácica interna, radial, gastromental direita e da veia safena magna**. 2002. 159 f. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2002.

CAMPBELL, S. E.; FEBBRAIO, M. A. Effects of ovarian hormones on exercise metabolism. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 4, n. 6, p. 515-520, 2001.

CARELS, R. A.; DARBY, L. A.; CACCIAPAGLIA, H. M.; DOUGLASS, O. M. Reducing cardiovascular risk factors in postmenopausal women through a lifestyle change intervention. **Journal of Women's Health**, v. 13, n. 4, p. 412-426, 2004.

CARMICHAEL, G. G.; FULLMER, H. M. The fine structure of the oxytalan fiber. **The Journal of Cell Biology**, v. 28, n. 1, p. 33-36, 1966.

CASTILLO, C.; ARIZNAVARRETA, M. C.; LAHERA, V.; CACHOFEIRO, V.; GIL-LOYZAGA, P.; TRESGUERRES, J. A. Effects of ovariectomy and growth hormone administration on body composition and vascular function and structure in old female rats. **Biogerontology**, v. 6, n. 1, p. 49-60, 2005.

CATTEL, M. A.; ANDERSON, J. C.; HASLETON, P. S. Aged-related changes in amounts and concentrations of collagen and elastin in normotensive human aorta. **Clinica chimica acta**, v. 245, n. 1, p. 73-84, 1996.

CAULEY, J. A.; CUMMINGS, S. R.; BLACK, D. M. Prevalence and determinants of estrogen replacement therapy in elderly women. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 163, p. 1438-1444, 1990.

COOK, J. N.; DEVAN, A. E.; SCHLEIFER, J. L.; ANTON, M. M.; CORTEZ-COOPER, M. Y.; TANAKA, H. Arterial compliance of rowers: implications for combined aerobic and strength training on arterial elasticity. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 290, n. 4, p. H1596-H1600, 2006.

COPELAND, J. L.; CHU, S. Y.; TREMBLAY, M. S. Aging, physical activity, and hormones in women--a review. **Journal of aging and physical activity**, v. 12, n. 1, p. 101-116, 2004.

COTTA-PEREIRA, G.; IRUELA-ARISPE, M. L. Extracellular matrix: functional significance of oxytalan, elaunin and elastic fibers. **Progress in Clinical and Biology Research**, v. 295, p. 101-107, 1989.

CHRISTIAN, R. C.; HARRINGTON, S.; EDWARDS, W. D.; OBERG, A. L.; FITZPATRICK, L. A. Estrogen status correlates with the calcium content of coronary atherosclerotic plaques in women. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 87, n. 3, p. 1062-1067.

CUSHMAN, M.; LEGAULT, C.; BARRETT-CONNOR, E.; STEFANICK, M. L.; KESSLER, C.; JUDD, H. L.; SAKKINEN, P. A.; TRACY, R. P. Effect of postmenopausal hormones on inflammation-sensitive proteins: the postmenopausal estrogen/progestin interventions (PEPI) study. **Circulation**, v. 100, p. 717–722. 1999.

DÂNGELO, J. G.; FATTINI, C. A. **Anatomia humana sistêmica e segmentar**: para o estudante de medicina. 2ª ed. São Paulo: Atheneu. 1995. 671 p.

DATA SUS. **Indicadores Demográficos do Ministério da Saúde**. 2007. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?idb2007/a02.def>>. Acesso em 08: set. 2008.

DE ANGELIS, K. L. D.; OLIVEIRA, A. R.; WERNER, A.; BOCK, P.; BELLÓKLEIN, A.; IRIGOYEN, M. C. Exercise training in aging: hemodynamis, metabolic, and oxidative stress evaluations. **Hypertension**, v. 30, n. 3, p. 767-771, 1997.

DE VAN, A. E.; ANTON, M. M.; COOK, J. N.; NEIDRE, D. B.; CORTEZ-COOPER, M. Y.; TANAKA, H. Acute effects of resistance exercise on arterial compliance. **Journal of Applied Physiology**, v. 98, n. 6, p. 2287-2291, 2005.

DINENNO, F. A.; TANAKA, H.; MONAHAN, K. D.; CLEVINGER, C. M.; ESKURZA, I.; DE SOUZA, C. A.; SEALS, D. R. Regular endurance exercise induces expansive arterial remodeling in the trained limbs of healthy men. **The Journal of Physiology**, v. 534, p. 287–295, 2001.

DÖRNYEI, G.; MONOS, E.; KALEY, G.; KOLLER, A. Regular exercise enhances blood pressure lowering effect of acetylcholine by increased contribution of nitric oxide. **Acta Physiologica Hungarica**, v. 87, n. 2, p. 127-138, 2000.

DUVERNOY, C. S.; MARTIN, J. W.; BRIESMIESTER, K.; MUZIK, O.; MOSCA, L. Self-reported physical activity and myocardial flow reserve in postmenopausal women at risk for cardiovascular disease. **Journal of Women's Health (Larchmt)**, v. 15, n. 1, p. 45-50, 2006

EAKER, E. D.; CHESEBRO, J. H.; SACKS, F. M. Cardiovascular disease in woman. **Circulation**, v. 88, p. 1999-2009, 1993.

FERREIRA, A. B. H. **Dicionário digital aurélio**. 1. ed. Curitiba: Positivo, 2005.

FERREIRA, I.; BOREHAM, C. A.; STEHOUWERB, C. D. A. The Benefits of Exercise for Arterial Stiffness. **American Journal of Hypertension**, v. 19, n. 10, p. 1037-1038, 2006.

FERREIRA, I.; TWISK, J. W.; VAN MECHELEN, W.; KEMPER, H. C.; STEHOUWER, C. D. Current and adolescent levels of cardiopulmonary fitness are related to large artery properties at age 36. The Amsterdam Growth and Health Longitudinal Study. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 32, p. 723–731, 2002.

FLECKNELL, P. Pain - assessment, alleviation and avoidance in laboratory animals. **ANZCCART News**, v. 12 n. 4, 1999.

FONTINELE, R. G. **Efeitos da atividade física na estrutura da cartilagem articular de joelho de ratas ovariectomizadas**. 2007. 86 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

FORJAZ, C. L.; MATSUDAIRA, Y.; RODRIGUES, F. B.; NUNES, N.; NEGRÃO, C. E. Post-exercise changes in blood pressure, heart rate and rate pressure product at different exercise intensities in normotensive humans. **Brazilian Journal Medicine Biological Research**, v. 31, n. 10, p. 1247-1255, 1998.

GASPARD, U.; BUICU, C.; CREUTZ, V. Multiple benefits of physical exercise in menopausal women. **Revue Médicale de Liège**, v. 56, n. 4, p. 219-222, 2001.

GAWLIK, Z. Morphological and morphochemical properties of the elastic system in the motor organ of man. **Folia Histochemica et Cytochemica**. v. 3, n. 3, p. 233-251, 1965.

GIAMPAOLI, S.; PANICO, S.; MELI, P.; CONTI, S.; LO NOCE, C.; PILOTTO, L.; VANUZZO, D.; Gruppo di ricerca dell'osservatorio epidemiologico cardiovascolare. Cardiovascular risk factors in women in menopause. **Italian Heart Journal. Supplement: Official Journal of the Italian Federation of Cardiology**, v. 1, n. 9, p. 1180-1187, 2000.

GOLDFISCHER, S.; COLTOFF-SCHILLER, B.; SCHWARTZ, E.; BLUMENFELD, O. O. Ultrastructure and staining properties of aortic microfibrils (oxytalan). **The journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society**, v. 31, n. 3, p. 382-90, 1983.

GRADY, D.; HERRINGTON, D.; BITTNER, V.; BLUMENTHAL, R.; DAVIDSON, M.; HLATKY, M.; HSIA, J.; HULLEY, S.; HERD, A.; KHAN, S.; NEWBY, L. K.; WATERS, D.; VITTINGHOFF, E.; WENGER, N. HERS Research Group. Cardiovascular disease outcomes during 6,8 years of hormone therapy: Heart and estrogen/progestin replacement study follow-up (HERS II). **The Journal of the American Medical Association**, v. 288, p. 49–57, 2002.

GRAHAM, D. A.; RUSH, J. W. Exercise training improves aortic endothelium-dependent vasorelaxation and determinants of nitric oxide bioavailability in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 96, n. 6, p. 2088-2096, 2004.

GREENDALE, G. A.; LEE, N. P.; ARRIOLA, E. R. The menopause. **Lancet**, v. 353, p. 571-80, 1999.

GROSS, M. L.; RITZ, E.; KORSCH, M.; ADAMCZAK, M.; WECKBACH, M.; MALL, G.; BERGER, I.; HANSEN, A.; AMANN, K. Effects of strogens on cardiovascular structure in uninephrectomized SHRsp rats. **Kidney International**, v. 67, p. 849-857, 2005.

GUNDERSEN, H. J.; BENDTSEN, T. F.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MØLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J. R.; PAKKENBERG, B.; SØRENSEN, F. B.; VESTERBY, A.; et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 96, n. 5, p. 379-394, 1988.

GUNDERSEN, H. J. G; JENSEN, E. B. The efficiency of systematic sampling in stereology an its prediction. **Journal of Microscopy**, v. 147, p. 229-263, 1987. Pt. 3.

GUNDERSEN, H. J. G; JENSEN, F. B; KIEU, K.; NIELSEN, J. The efficiency of systematic sampling in stereology-reconsidered. **Journal of Microscopy**, v. 193, p. 199-211, 1999. Pt. 3.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 1996. 1014 p.

HAFFNER, S. M.; NEWCOMB, P. A.; MARCUS, P. M. Relation of sex hormones and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-SO₄) to cardiovascular risk factors in postmenopausal women. **American Journal of Epidemiology**, v. 142, p. 925–934. 1995.

HAMBRECHT, R.; ADAMS, V.; ERBS, S.; LINKE, A.; KRÄNKEL, N.; SHU, Y.; BAITHER, Y.; GIELEN, S.; THIELE, H.; GUMMERT, J. F.; MOHR, F. W.; SCHULER, G. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. **Circulation**, v. 107, n. 25, p. 3152-3158, 2003.

HARTLEY, L. H.; JONES, G. L.; MASON, J. The usefulness of exercise therapy in the management of coronary heart disease. **Advances in Cardiology**, v. 9, p. 174-179, 1973.

HAYASHI, K.; SUGAWARA, J.; KOMINE, H.; MAEDA, S.; YOKOI, T. Effects of aerobic exercise training on the stiffness of central and peripheral arteries in middle-aged sedentary men. **Japanese Journal of Physiology**, v. 55, n. 4, p. 235-239, 2005.

HEINE, P. A.; TAYLOR, J. A.; IWAMOTO, G. A.; LUBAHN, D. B.; COOKE, P. S. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 23, p. 12729-12734, 2000.

HOREJSÍ, J.; ROB, L. Malignant tumors of the female genitalia in childhood--yesterday, today and tomorrow. **Cas Lek Cesk**, v. 142, n. 2, p. 84-87, 2003.

HORTA, P. P.; DE CARVALHO, J. J.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Exercise training attenuates blood pressure elevation and adverse remodeling in the aorta of spontaneously hypertensive rats. **Life Sciences**, v. 77, n. 26, p. 3336-3343, 2005.

HOWARD, C. V.; REED, M. G. **Unbiased stereology**: three-dimensional measurement in microscopy. 2nd ed. Abingdon: Garland Science/BIOS Scientific Publishers, 2005, 277 p.

HULLEY, S.; GRADY, D.; BUSH, T.; FURBERG, C.; HERRINGTON, D.; RIGGS, B.; VITTINGHOFF, E. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. **The Journal of the American Medical Association**, v. 280, p. 605-613, 1998.

IBGE. (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). **Fonte de dados estatísticos da população brasileira**. 2007. Disponível em: <Internet: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/contagem2007/defaulttab.shtm>>. Acesso em: 08 set. 2008.

IDICULLA, A. A.; GOLDBERG, G. Physical fitness for the mature woman. **The Medical Clinics of North America**, v. 71, n. 1, p. 135-148, 1987.

IRIGOYEN, M. C.; PAULINI, J.; FLORES, K.; BERTAGNOLI, M; MOREIRA, E. D.; CONSOLIM-COLOMBO, F.; BELLO-KLEIN, A. ; DE ANGELIS, K. Exercise training improves baroreflex sensitivity associated with oxidative stress reduction in ovariectomized rats. **Hypertension**, v. 46, n. 4, p. 998-1003, 2005.

JACOB, M. P. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, n. 5-6, p. 195-202, 2003.

JENSEN, L. T.; HØST, N. B. Collagen: scaffold for repair or execution. **Cardiovascular Research**, v. 33, n. 3, p. 535-539, 1997.

JIANG, C. W.; SARREL, P. M.; LINDSAY, D. C.; POOLE-WILSON, P. A.; COLLINS, P. Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17 beta-oestradiol in vitro. **British Journal of Pharmacology**, v. 104, n. 4, p. 1033-1037, 1991.

JONASON, T.; HENRIKSEN, E.; KANGRO, T.; VESSBY, B.; RINGQVIST, I. Menopause is associated with the stiffness of the common carotid artery in 50-year-old women. **Clinical Physiology**, v. 18, n. 2, p. 149-155, 1998.

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **The Histochemical Journal**, v.11, p. 447-455, 1979.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 2008. 524 p.

KAKIYAMA, T.; SUGAWARA, J.; MURAKAMI, H.; MAEDA, S.; KUNO, S.; MATSUDA, M. Effects of short-term endurance training on aortic distensibility in young males. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 37, n. 2, p. 267-271, 2005.

KALLIKAZAROS, I.; TSIIOUFIS, C.; ZAMBARAS, P.; STEFANADIS, C.; TOUTOUZAS, P. Conjugated estrogen administration improves common carotid artery elastic properties in normotensive postmenopausal women. **Clinical Cardiology**, v. 25, n. 4, p. 167-172.

KAM, K. W.; QI, J. S.; CHEN, M.; WONG, T. M. Estrogen reduces cardiac injury and expression of beta1-adrenoceptor upon ischemic insult in the rat heart. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 309, n. 1, p. 8-15, 2004.

KANNEL, W. B. Habitual level of physical activity and risk of coronary disease: The Framingham study. **Canadian Medical Association Journal**, v. 96, p. 811-812, 1967.

KASCH, F. W.; BOYER, J. L.; SCHMIDT, P. K.; WELLS, R. H.; WALLACE, J. P.; VERITY, L. S.; GUY, H.; SCHNEIDER, D. Ageing of the cardiovascular system during 33 years of aerobic exercise. **Age and Ageing**, v. 28, p. 531-536, 1999.

KEELEY, F. W.; PARTRIDGE, S. M. Amino acid composition and calcification of human aortic elastin. **Atherosclerosis**, v. 19, n. 2, p. 287-296, 1974.

KENNEY, W. L. Parasympathetic control of resting heart rate: relationship to aerobic power. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 17, p. 451-455, 1985.

KIELTY, C. M.; SHERRATT, M. J.; SHUTTLEWORTH, C. A. Elastic fibres. **Journal of Cell Science**, v. 115, p. 2817-2828, 2002. Pt. 14.

KINGWELL, B. A.; BERRY, K. L.; CAMERON, J. D.; JENNINGS, G. L.; DART, A. M. Arterial compliance increases after moderate-intensity cycling. **The American Journal of Physiology**, v. 273, p. H2186-H2191, 1997.

KOKKINOS, P. F.; NARAYAN, P.; PAPADEMETRIOU, V. Exercise as hypertension therapy. **Cardiology Clinics**, v. 19, n. 3, p. 507-516, 2001. Review.

LABAT-ROBERT, J.; ROBERT, L. Aging of the extracellular matrix and its pathology. **Experimental Gerontology**, v. 23, n. 1, p. 5-18, 1988. Review.

LEAL-CERRO, A.; GIPPINI, A.; AMAYA, M. J.; LAGE, M.; MATO, J. A.; DIEGUEZ, C.; CASANUEVA, F. F. Mechanisms underlying the neuroendocrine response to physical exercise. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 26, n. 9, p. 879-885, 2003. Review.

LEWINGTON, S.; CLARKE, R.; QIZILBASH, N.; PETO, R.; COLLINS, R. Prospective Studies Collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. **Lancet**, v. 360, n. 9349, p. 1903-1913, 2002.

LEWIS, T. V.; DART, A. M.; CHIN-DUSTING, J. P. KINGWELL, B. A. Exercise training increases basal nitric oxide production from the forearm in hypercholesterolemic patients. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 19, n. 11, p. 2782-2787, 1999.

LOBO, R. A. Metabolic syndrome after menopause and the role of hormones. **Maturitas**, v. 60, n. 1, p. 10-18, 2008. Review.

LONDON, G. M.; MARCHAIS, S. J.; GUERIN, A. P.; PANNIER, B. Arterial stiffness: pathophysiology and clinical impact. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 26, n. 7-8, p. 689-699, 2004.

MAAS, A. H. E. M.; SHOUW, Y. T.; GROBBEE, D. E.; GRAAF, Y. Rise and fall of hormone therapy in postmenopausal women with cardiovascular disease. **Menopause**, v. 11, n. 2, p. 228-235, 2004.

MAEDA, S.; IEMITSU, M.; MIYAUCHI, T.; KUNO, S.; MATSUDA, M.; TANAKA, H.; Aortic stiffness and aerobic exercise: mechanistic insight from microarray analyses. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 37, n. 10, p. 1710-1716, 2005.

MAEDA, S.; TANABE, T.; MIYAUCHI, T.; OTSUKI T.; SUGAWARA, J.; IEMITSU, M.; KUNO, S.; AJISAKA, R.; YAMAGUCHI, I.; MATSUDA, M. Aerobic exercise training reduces plasma endothelin-1 concentration in older women. **Journal of applied physiology**, v. 95 n. 1, p. 336-341, 2003.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. **Métodos quantitativos em morfologia**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Eduerj, 1995. 131 p.

MANDER, S. T.; MANDER, L. N.; CARMICHAEL, G. G. The staining mechanism of aldehyde-fuchsin, with reference to the oxytalan fiber in the mouse. **The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society**, v. 16, n. 7, p. 480-485, 1968.

MANSON, J. E. A prospective study of walking as compared with vigorous exercise in the prevention of coronary heart disease in women. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 9, p. 650-658, 1999.

MANSON, J. E. Walking compared with vigorous exercise for the prevention of cardiovascular events in women. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 10, p. 716-725, 2002.

MARQUES, C. M.; NASCIMENTO, F. A.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; AGUILA, M. B. Exercise training attenuates cardiovascular adverse remodeling in adult ovariectomized spontaneously hypertensive rats. **Menopause**, v.13, n. 1, p. 87-95, 2006.

MARTINEZ, R. P. Z. **Alterações cardiovasculares causadas pelo tratamento prolongado com dose baixa de nitro-largina metil éster (l-name) em ratos: efeito do enalapril e losartan**. 2005. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

MATSUDA, M.; NOSAKA, T.; SATO, M.; IJIMA, J.; OHSHIMA, N.; FUKUSHIMA, H. Effects of exercise training on biochemical and biomechanical properties of rat aorta. **Angiology**, v. 40, n. 1, p. 51-58, 1989.

MATSUDA, M.; NOSAKA, T.; SATO, M.; OHSHIMA, N. Effects of physical exercise on the elasticity and elastic components of the rat aorta. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 66, n. 2, p. 122-126, 1993.

MATTHEWS, K. A.; KULLER, L. H.; WING, R. R.; MEILAHN, E. N. Prior to use of estrogen replacement therapy, are users healthier than nonusers? **American Journal of Epidemiology**, v. 143, n. 10, p. 971-978. 1996.

MAYHEW, T. M.; OLSEN, D. R. Magnetic resonance imaging (MRI) and model-free estimates of brain volume determined using the Cavalieri principle. **Journal of Anatomy**, v. 178, p. 133-44, 1991.

MC KECHNIE, R.; RUBENFIRE, M.; MOSCA, L. Association between self-reported physical activity and vascular reactivity in postmenopausal women. **Atherosclerosis**, v. 159, n. 2, p. 483-490, 2001.

MENDELSON, M. E.; KARAS, R. H. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, p. 1801-1811, 1999.

MERCURO, G.; SAIU, F.; DEIDDA, M.; MERCURO, S.; VITALE, C.; ROSANO, G. M. Impairment of physical exercise capacity in healthy postmenopausal women. **American Heart Journal**, v. 151, n. 4, p. 923-927, 2006.

MISZKO, T. A.; CRESS, M. E. A lifetime of fitness. Exercise in the perimenopausal and postmenopausal woman. **Clinics in Sports Medicine**, v. 19, n. 2, p. 215-32, 2000.

MITCHELL, J. H. Exercise training in the treatment of coronary heart disease. **Advances in Internal Medicine**, v. 20, p. 249-272, 1975.

MONTES, G. S. Structural biology of the fibers of the collagenous and elastic systems. **Cell Biology International**, v. 20, n. 1, p. 15-27, 1996.

MOREAU, K. L.; DONATO, A. J.; SEALS, D. R.; DE SOUZA, C. A.; TANAKA, H. Regular exercise, hormone replacement therapy and the age-related decline in carotid arterial compliance in healthy women. **Cardiovascular Research**, v. 57, p. 861-868, 2003.

MORIGUCHI, Y; MORIGUCHI, E. H. **Biologia geriátrica ilustrada**. São Paulo: Fundo Editorial BYK, 1988, 239 p.

MOSCA, L.; GRUNDY, S. M.; JUDELSON, D.; KING, K.; LIMACHER, M.; OPARIL, S.; PASTERNAK, R.; PEARSON, T. A.; REDBERG, R. F.; SMITH, S. C.; WINSTON, M.; ZINBERG, S. Guide to preventive cardiology for women. AHA/ACC Scientific Statement Consensus panel statement. **Circulation**, v. 99, p. 2480-2484, 1999.

MÜGGE, A.; RIEDEL, M.; BARTON, M.; KUHN, M.; LICHTLEN, P. R. Endothelium independent relaxation of human coronary arteries by 17 beta-oestradiol in vitro. **Cardiovascular Research**, v. 27, n. 11, p. 1939-1942, 1993.

MUSATOV, S.; CHEN, W.; PFAFF, D. W.; MOBBS, C. V.; YANG, X. J.; CLEGG, D. J.; KAPLITT, M. G.; OGAWA, S. Silencing of estrogen receptor alpha in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 7, p. 2501-2506, 2007.

NAGPAL, S.; WALIA, L.; LATA, H.; SOOD, N.; AHUJA, G. K. Effect of exercise on rate pressure product in premenopausal and postmenopausal women with coronary artery disease. **Indian journal of physiology and pharmacology**, v. 51, n. 3, p. 279-283, 2007.

NAMS. (NORTH AMERICAN MENOPAUSE SOCIETY). **Menopause practice: a clinician's guide**. 2007. Disponível em: <Internet: <http://www.menopause.org>>. Acesso em: 10 abr. 2007.

NICHOLS, W. W. Clinical Measurement of arterial stiffness obtained from noninvasive pressure waveforms. **American Journal of Hypertension**, v. 18, n. 1, p. 3s-10s. 2005. Pt. 2.

OHSEN, S. P.; CLAPHAM, D. E.; DAVIES, P. Haemodynamic shear stress activates a K⁺ current vascular endothelial cells. **Nature**, v. 331, p.168-170, 1988.

OH, J. Y.; BARRETT-CONNOR, E.; WEDICK, N. M.; WINGARD, D. L.; RANCHO BERNARDO STUDY. Endogenous sex hormones and the development of type 2 diabetes in older men and women: the Rancho Bernardo study. **Diabetes Care**, v. 25, p. 55–60, 2002.

OWENS, J. F.; MATTHEWS, K. A.; RÄIKÖNEN, K.; KULLER, L. H. It is never too late: change in physical activity fosters change in cardiovascular risk factors in middle-aged women. **Preventive Cardiology**, v. 6, n. 1, p. 22-28, 2003.

PAFFENBARGER, R. S.; WING, A. L.; HYDE, R. T. Physical activity as an index of heart attack risk in college alumni. **American Journal of Epidemiology**, v. 108, n. 3, p. 161-175, 1978.

PANIAGUA, R.; REGADERA, J.; NISTAL, M.; SANTAMARÍA, L. Elastic fibres of the human ductus deferens. **Journal of Anatomy**, v. 137, p. 467-476, 1983. Pt 3.

PAOLETTI, R.; WENGER, N. K. Review of the international position paper on women's health and menopause: a comprehensive approach. **Circulation**, v. 107, n. 9, p. 1336-1339, 2003.

PARK, J. H.; OMI, N.; NOSAKA, T.; KITAJIMA, A.; EZAWA, I. Estrogen deficiency and low-calcium diet increased bone loss and urinary calcium excretion but did not alter arterial stiffness in young female rats. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 26, n. 3, p. 218-225, 2008.

PATE, R. R.; PRATT, M.; BLAIR, S. N. Physical activity and public health. A recommendation from de Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports Med. **The Journal of the American Medical Association**, v. 273, p. 402-407, 1995.

PATULLO, I. M. F. **Análise comparativa entre o efeito da osteoporose experimental sobre o osso longo e o da articulação temporomandibular**. 2001. 60 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

PHILLIPS, G. B.; JING, T. Y.; LARAGH, J. H.; Serum sex hormone levels in postmenopausal women with hypertension. **Journal of Human Hypertension**, v. 11, p. 523–526, 1997.

PINES, A.; BERRY, E. M. Exercise in the menopause - an update. **Climacteric**, v. 10, p. 42-46, 2007. Suplemento 2.

PINOTTI, J. A.; HALBE, H. W.; HEGG, R. **Menopausa**. São Paulo: Roca, 1995. 355 p.

PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN, L. H. **Afip laboratory methods in histotechnology**. Washington, American Registry of Pathology, 1992, 278 p.

RACKLEY, C. E. Hormones and coronary atherosclerosis in women. **Endocrine**, v. 24, n. 3, p. 245-250, 2004.

RAPPELLI, A. Hypertension and obesity after the menopause. **Journal of Hypertension Supplement**, v. 20, n. 2, p. S26-S28, 2002.

ROBERT, L. Aging of the vascular wall and atherogenesis: role of the elastin-laminin receptor. **Atherosclerosis**, v. 126, n. 1-2, p. 169-179, 1996.

RODRIGUES, B.; IRIGOYEN, M. C.; DE ANGELIS, K. Correlation between speed and oxygen consumption (VO₂) in rats submitted to maximum exercise test. **Fiep Bulletin**, v. 76, p. 231-233, 2006.

RODRIGUES JUNIOR, A. J. **Estudo Morfofuncional do sistema de fibras elásticas da fáscia transversal na região inguinal no homem em várias idades**. 1987, 75 f. Tese (Livre-docência) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1987.

ROMEIS, B. **Mikroskopische technik**. München, Wien: R. Ouldenbourg Verlag. 1968.

ROSS, R.; BORNSTEIN, P. The elastic fiber. I. The separation and partial characterization of its macromolecular components. **The Journal of Cell Biology**, v. 40, n. 2, p. 366-381, 1969.

ROSS, R.; FIALKOW, R. J.; ALTMAN, L. K. The morphogenesis of elastic fibers. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 79, p. 7-17, 1977.

ROSS, R. The elastic fiber. **The journal of Histochemistry and Cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society**, v. 21, n. 3, p. 199-208, 1973.

ROSSOUW, J. E.; ANDERSON, G. L.; PRENTICE, R. L.; LACROIX, A. Z.; KOOPERBERG, C.; STEFANICK, M. L.; JACKSON, R. D.; BERESFORD, S. A.; HOWARD, B. V.; JOHNSON, K. C.; KOTCHEN, J. M.; OCKENE, J.; Writing Group for the Women's Health Initiative. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. **The Journal of the American Medical Association**, v. 288, n. 3, p. 321-333, 2002.

SEALS, D. R. Habitual exercise and the age-associated decline in large artery compliance. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 31, n. 2, p. 68-72, 2003.

SESSA, W. C. The nitric oxide synthase family of proteins. **Journal of Vascular Research**, v. 31, n. 3, p. 131-43, 1994. Review.

SHEN, W.; ZHANG, X.; ZHAO, G.; WOLIN, M. S.; SESSA, W.; HINTZE, T. H. Nitric oxide production and NO synthase gene expression contribute to vascular regulation during exercise. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 27, n. 8, p. 1125-1134, 1995. Review.

SHINODA, M. ; LATOUR, M. G. ; LAVOIE, J. M. Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. **International journal of obesity and related metabolic disorders**, v. 26, n. 3, p. 335-343, 2002.

SILVA, G. J. J.; BRUM, P. C.; NEGRÃO, C. E.; KRIEGER, E. M. Acute and chronic effects of exercise on baroreflexes in spontaneously hypertensives. **Hypertension**, v. 30, n. 3, p. 714-719, 1997.

SILVA, R. B.; COSTA-PAIVA, L.; PINTO NETO, A. M.; BRAGA ADE, A.; MORAIS, S. S. Habitual physical activity and cardiovascular risk in post menopause. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 52, n. 4, p. 242-246, 2006.

SILVER, F. H.; HORVATH, I.; FORAN, D. J. Viscoelasticity of the vessel wall: the role of collagen and elastic fibers. **Critical reviews in biomedical engineering**, v. 29, n. 3, p. 279-301, 2001.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. 2ª ed. São Paulo: Manole. 2003. 816 p.

SIMON, T. Why is cardiovascular health important in menopausal women? **Climacteric**, v. 9, n. S1, p. 13-18, 2006.

SOKOLIS, D. P. Passive mechanical properties and structure of the aorta: segmental analysis. **Acta Physiologica**, v. 190, p. 277-289, 2007.

STAESSEN, J. A.; CELIS, H.; FAGARD, R. The epidemiology of the association between hypertension and menopause. **Journal of Human Hypertension**, v. 12, n. 9, p. 587-592, 1998.

STAMPFER, M. J.; COLDITZ, G. A. Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of the epidemiological evidence. **Preventive Medicine**, v. 20, p. 47-63, 1991.

STATHOKOSTAS, L.; KOWALCHUK, J. M.; PETRELLA, R. J.; PATERSON, D. H. Maximal and submaximal aerobic fitness in postmenopausal women: influence of hormone-replacement therapy. **Applied physiology, nutrition, and metabolism**, v. 33, n. 5, p. 922-928, 2008.

STEHOUWER, C. D.; FERREIRA, I. Diabetes, lipids and other cardiovascular risk factors. In: SAFAR, M. E.; O'ROURKE, M. F. (Ed.). **Arterial stiffness in hypertension—handbook of hypertension**. Amsterdam: Elsevier, 2006. v. 23, p. 427-456.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Histologia**. 1ª ed. São Paulo: Manole. 1995. 378 p.

STICE, J. P.; EISERICH, J. P.; KNOWLTON, A. A. Role of Aging vs. the Loss of Estrogens in the Reduction in Vascular Function in Female Rats. **Endocrinology**, v. 150, n. 1, p. 212-219, 2009.

SUGAWARA, J.; INOUE, H.; HAYASHI, K.; YOKOI, T.; KONO, I. Effect of low-intensity aerobic exercise training on arterial compliance in postmenopausal women. **Hypertension Research**, v. 27, n. 12, p. 897-901, 2004.

SUGAWARA, J.; OTSUKI, T.; TANABE, T.; HAYASHI, K.; MAEDA, S.; MATSUDA, M. Physical activity duration, intensity, and arterial stiffening in postmenopausal women. **American Journal of Hypertension**, v. 19, n. 10, p. 1037-1038, 2006.

SULLIVAN, J. M. Estrogen replacement therapy. **American Journal of Medicine**, v. 101, n. 4A, p. 56S-60S, 1996.

SUVORAVA, T.; LAUER, N.; KOJDA, G. Physical inactivity causes endothelial dysfunction in healthy young mice. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 44, n. 6, p. 1320-1327, 2004.

TAKANO, T.; MINEO, C. Atherosclerosis and molecular pathology: mechanisms of cholesteryl ester accumulation in foam cells and extracellular space of atherosclerotic lesions. **Journal of Pharmacobio-Dynamics**, v. 13, n. 7, p. 385-413, 1990.

TANAKA, H.; DE SOUZA, C. A.; SEALS, D. R. Absence of age-related increase in central arterial stiffness in physically active women. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 18, p. 127-132, 1998.

TANAKA, H.; DINENNO, F. A.; MONAHAN, K. D.; CLEVINGER, C. M.; DE SOUZA, C. A.; SEALS, D. R. Aging, habitual exercise, and dynamic arterial compliance. **Circulation**, v. 102, p. 1270-1275, 2000.

TANAKA, H.; SAFAR, M. E. Influence of lifestyle modification on arterial stiffness and wave reflections. **American Journal of Hypertension**, v. 18, p. 137-144, 2005.

TATCHUM-TALOM, R.; MARTEL, C.; MARETTE, A. Influence of estrogen on aortic stiffness and endothelial function in female rats. **American journal of physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 282, p. H491-H498, 2002.

TCHERNOF, A.; CALLES-ESCANDON, J.; SITES, C. K.; POEHLMAN, E. T. Menopause, central body fatness, and insulin resistance: effects of hormone-replacement therapy. **Coronary artery disease**, v. 9, p. 503-511, 1998.

TINTUT, Y; PATEL, J; PARHAMI, F; DEMER, L. L. Tumor necrosis factor-alpha promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. **Circulation**, v. 102, n. 21, p. 2636-2642, 2000.

THOMPSON, E. Quantitative microscopy analysis. **Journal of Geology**, v. 38. p.193, 1930.

VAN DAM, R. M.; LI, T.; SPIEGELMAN, D.; FRANCO, O. H.; HU, F. B. Combined impact of lifestyle factors on mortality: prospective cohort study in US women. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 337, p. 1440, 2008.

VAN VRÉ, E. A.; VAN BEUSEKOM, H. M.; VRINTS, C. J.; BOSMANS, J. M.; BULT, H.; VAN DER GIESSEN, W. J. Stereology: a simplified and more time-efficient method than planimetry for the quantitative analysis of vascular structures in different models of intimal thickening. **Cardiovascular Pathology**, v. 16, n. 1, p. 43-50, 2007.

WENGER, N. K.; O'ROURKE, R. A.; MARCUS, F. I. The care of elderly patients with cardiovascular diseases. **Annals of Internal Medicine**, v. 109, n. 5, p. 425-428, 1988.

WILLIAMS, P. L.; WARWICK, R.; DYSON, M.; BANNISTER, L. H. **Gray anatomy**. volume 1. 37 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 1995. v. 1, 808 p.

WIXSON, S. K.; WHITE, W.J.; HUGHES, H. C.; LANG, C. M.; MARSHALL, W.K. A comparison of pentobarbital, fentanyl-droperidol, ketamine-xylazine and ketamine-diazepam anesthesia in adult male rats. **Laboratory Animal Science**, v. 37, n. 6, p. 726-730, 1987.

WHO. (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Technical report series: report of a WHO Scientific Group**. Research on menopause in the 1990s. Disponível em: <Internet: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_866.pdf>. Acesso em: 27 jul. 2007. Geneva: WHO, 1996.

WONG, S.; WONG, J. Is physical activity as effective in reducing risk of cardiovascular disease as estrogen replacement therapy in postmenopausal women? **International Journal of Nursing Studies**, v. 36, n. 5, p. 405-414, 1999.

WULFSOHN, D.; NYENGAARD, J. R.; TANG, Y. Postnatal growth of cardiomyocytes in the left ventricle of the rat. **The Anatomical Record Part A**, v. 277A, p. 236-247, 2004.

XU, C.; ZARINS, C. K.; PANNARAJ, P. S.; BASSIOUNY, H. S.; GLAGOV, S. Hypercholesterolemia superimposed by experimental hypertension induces differential distribution of collagen and elastin. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 20, n. 12, p. 2566-2572, 2000.

YANES, L. L.; ROMERO, D. G.; CUCCHIARELLI, V. E.; FORTEPIANI, L. A.; GOMEZ-SANCHEZ, C. E.; SANTACRUZ, F.; RECKELHOFF, J. F. Role of endothelin in mediating postmenopausal hypertension in a rat model. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 288, n. 1, p. R229-R233, 2005.

YEN, M. H.; CHEN, S. J.; WU, C. C. Comparison of responses to aminoguanidine and N omega-nitro-L-arginine methyl ester in the rat aorta. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 22, n. 9, p. 641-645, 1995.

ZIEMAN, S. J.; MELENOVSKY, V.; KASS, D. A. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 25, n. 5, p. 932-943, 2005. Review.

ZUCKER, J. M. Malignant ovarian tumors in childhood. **Bulletin du Cancer**, v. 69, n. 3, p. 304-13, 1982.

Anexo A – Tabela de números randômicos.

You are looking for a random number R fulfilling $1 \leq R \leq 57$.

- 1: Take the first unused digit in the first (unnumbered) blocks- and cross it out! (= 9)
- 2: In the block with that number read the unused digits in pairs until a pair fulfill the criterion.(= 26)
Cross out all read pairs. If the upper limit of the number you are looking for is => 100 you deal with triplets in stead, etc.

Random Numbers

72137	72138	72139	72140	72141	72142	72143	72144	72145	72146	72147	72148	72149	72150	72151	72152	72153	72154	72155	72156	72157	72158	72159	72160	72161	72162	72163	72164	72165	72166	72167	72168	72169	72170	72171	72172	72173	72174	72175	72176	72177	72178	72179	72180	72181	72182	72183	72184	72185	72186	72187	72188	72189	72190	72191	72192	72193	72194	72195	72196	72197	72198	72199	72200	72201	72202	72203	72204	72205	72206	72207	72208	72209	72210	72211	72212	72213	72214	72215	72216	72217	72218	72219	72220	72221	72222	72223	72224	72225	72226	72227	72228	72229	72230	72231	72232	72233	72234	72235	72236	72237	72238	72239	72240	72241	72242	72243	72244	72245	72246	72247	72248	72249	72250	72251	72252	72253	72254	72255	72256	72257	72258	72259	72260	72261	72262	72263	72264	72265	72266	72267	72268	72269	72270	72271	72272	72273	72274	72275	72276	72277	72278	72279	72280	72281	72282	72283	72284	72285	72286	72287	72288	72289	72290	72291	72292	72293	72294	72295	72296	72297	72298	72299	72300	72301	72302	72303	72304	72305	72306	72307	72308	72309	72310	72311	72312	72313	72314	72315	72316	72317	72318	72319	72320	72321	72322	72323	72324	72325	72326	72327	72328	72329	72330	72331	72332	72333	72334	72335	72336	72337	72338	72339	72340	72341	72342	72343	72344	72345	72346	72347	72348	72349	72350	72351	72352	72353	72354	72355	72356	72357	72358	72359	72360	72361	72362	72363	72364	72365	72366	72367	72368	72369	72370	72371	72372	72373	72374	72375	72376	72377	72378	72379	72380	72381	72382	72383	72384	72385	72386	72387	72388	72389	72390	72391	72392	72393	72394	72395	72396	72397	72398	72399	72400	72401	72402	72403	72404	72405	72406	72407	72408	72409	72410	72411	72412	72413	72414	72415	72416	72417	72418	72419	72420	72421	72422	72423	72424	72425	72426	72427	72428	72429	72430	72431	72432	72433	72434	72435	72436	72437	72438	72439	72440	72441	72442	72443	72444	72445	72446	72447	72448	72449	72450	72451	72452	72453	72454	72455	72456	72457	72458	72459	72460	72461	72462	72463	72464	72465	72466	72467	72468	72469	72470	72471	72472	72473	72474	72475	72476	72477	72478	72479	72480	72481	72482	72483	72484	72485	72486	72487	72488	72489	72490	72491	72492	72493	72494	72495	72496	72497	72498	72499	72500	72501	72502	72503	72504	72505	72506	72507	72508	72509	72510	72511	72512	72513	72514	72515	72516	72517	72518	72519	72520	72521	72522	72523	72524	72525	72526	72527	72528	72529	72530	72531	72532	72533	72534	72535	72536	72537	72538	72539	72540	72541	72542	72543	72544	72545	72546	72547	72548	72549	72550	72551	72552	72553	72554	72555	72556	72557	72558	72559	72560	72561	72562	72563	72564	72565	72566	72567	72568	72569	72570	72571	72572	72573	72574	72575	72576	72577	72578	72579	72580	72581	72582	72583	72584	72585	72586	72587	72588	72589	72590	72591	72592	72593	72594	72595	72596	72597	72598	72599	72600	72601	72602	72603	72604	72605	72606	72607	72608	72609	72610	72611	72612	72613	72614	72615	72616	72617	72618	72619	72620	72621	72622	72623	72624	72625	72626	72627	72628	72629	72630	72631	72632	72633	72634	72635	72636	72637	72638	72639	72640	72641	72642	72643	72644	72645	72646	72647	72648	72649	72650	72651	72652	72653	72654	72655	72656	72657	72658	72659	72660	72661	72662	72663	72664	72665	72666	72667	72668	72669	72670	72671	72672	72673	72674	72675	72676	72677	72678	72679	72680	72681	72682	72683	72684	72685	72686	72687	72688	72689	72690	72691	72692	72693	72694	72695	72696	72697	72698	72699	72700	72701	72702	72703	72704	72705	72706	72707	72708	72709	72710	72711	72712	72713	72714	72715	72716	72717	72718	72719	72720	72721	72722	72723	72724	72725	72726	72727	72728	72729	72730	72731	72732	72733	72734	72735	72736	72737	72738	72739	72740	72741	72742	72743	72744	72745	72746	72747	72748	72749	72750	72751	72752	72753	72754	72755	72756	72757	72758	72759	72760	72761	72762	72763	72764	72765	72766	72767	72768	72769	72770	72771	72772	72773	72774	72775	72776	72777	72778	72779	72780	72781	72782	72783	72784	72785	72786	72787	72788	72789	72790	72791	72792	72793	72794	72795	72796	72797	72798	72799	72800	72801	72802	72803	72804	72805	72806	72807	72808	72809	72810	72811	72812	72813	72814	72815	72816	72817	72818	72819	72820	72821	72822	72823	72824	72825	72826	72827	72828	72829	72830	72831	72832	72833	72834	72835	72836	72837	72838	72839	72840	72841	72842	72843	72844	72845	72846	72847	72848	72849	72850	72851	72852	72853	72854	72855	72856	72857	72858	72859	72860	72861	72862	72863	72864	72865	72866	72867	72868	72869	72870	72871	72872	72873	72874	72875	72876	72877	72878	72879	72880	72881	72882	72883	72884	72885	72886	72887	72888	72889	72890	72891	72892	72893	72894	72895	72896	72897	72898	72899	72900	72901	72902	72903	72904	72905	72906	72907	72908	72909	72910	72911	72912	72913	72914	72915	72916	72917	72918	72919	72920	72921	72922	72923	72924	72925	72926	72927	72928	72929	72930	72931	72932	72933	72934	72935	72936	72937	72938	72939	72940	72941	72942	72943	72944	72945	72946	72947	72948	72949	72950	72951	72952	72953	72954	72955	72956	72957	72958	72959	72960	72961	72962	72963	72964	72965	72966	72967	72968	72969	72970	72971	72972	72973	72974	72975	72976	72977	72978	72979	72980	72981	72982	72983	72984	72985	72986	72987	72988	72989	72990	72991	72992	72993	72994	72995	72996	72997	72998	72999	73000	73001	73002	73003	73004	73005	73006	73007	73008	73009	73010	73011	73012	73013	73014	73015	73016	73017	73018	73019	73020	73021	73022	73023	73024	73025	73026	73027	73028	73029	73030	73031	73032	73033	73034	73035	73036	73037	73038	73039	73040	73041	73042	73043	73044	73045	73046	73047	73048	73049	73050	73051	73052	73053	73054	73055	73056	73057	73058	73059	73060	73061	73062	73063	73064	73065	73066	73067	73068	73069	73070	73071	73072	73073	73074	73075	73076	73077	73078	73079	73080	73081	73082	73083	73084	73085	73086	73087	73088	73089	73090	73091	73092	73093	73094	73095	73096	73097	73098	73099	73100	73101	73102	73103	73104	73105	73106	73107	73108	73109	73110	73111	73112	73113	73114	73115	73116	73117	73118	73119	73120	73121	73122	73123	73124	73125	73126	73127	73128	73129	73130	73131	73132	73133	73134	73135	73136	73137	73138	73139	73140	73141	73142	73143	73144	73145	73146	73147	73148	73149	73150	73151	73152	73153	73154	73155	73156	73157	73158	73159	73160	73161	73162	73163	73164	73165	73166	73167	73168	73169	73170	73171	73172	73173	73174	73175	73176	73177	73178	73179	73180	73181	73182	73183	73184	73185	73186	73187	73188	73189	73190	73191	73192	73193	73194	73195	73196	73197	73198	73199	73200	73201	73202	73203	73204	73205	73206	73207	73208	73209	73210	73211	73212	73213	73214	73215	73216	73217	73218	73219	73220	73221	73222	73223	73224	73225	73226	73227	73228	73229	73230	73231	73232	73233	73234	73235	73236	73237	73238	73239	73240	73241	73242	73243	73244	73245	73246	73247	73248	73249	73250	73251	73252	73253	73254	73255	73256	73257	73258	73259	73260	73261	73262	73263	73264	73265	73266	73267	73268	73269
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------