AMANDA MESSIAS VAZZOLER

**Estudo Morfoquantitativo do Miocárdio do Ventrículo Esquerdo de
Ratas Ooforectomizadas Submetidas a Exercício Aeróbico**

São Paulo

2008

AMANDA MESSIAS VAZZOLER

**Estudo Morfoquantitativo do Miocárdio do Ventrículo Esquerdo de Ratas Ooforectomizadas
Submetidas a Exercício Aeróbico**

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 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

2008

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.1993
FMVZ

Vazzoler, Amanda Messias

Estudo Morfoquantitativo do Miocárdio do Ventriculo Esquerdo de Ratas Ooforectomizadas Submetidas a Exercício Aeróbico / Amanda Messias Vazzoler.
– São Paulo : A. M. Vazzoler, 2008.
79 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2008.

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. Miocárdio. 2. Ventriculo Esquerdo. 3. Ooforectomia. 4. Exercício Físico.
5. Menopausa. I. Título.

PARECER

Interessado: Amanda Messias Vazzoler

Assunto: Protocolo de Experimentação adotado em experimento animal.

A Presidência da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e após analisar o projeto protocolado sob o número 1262/2007, intitulado: "Estudo morfoquantitativo do miocárdio do ventrículo esquerdo de ratas ooforectomizadas submetidas a exercício aeróbico", no qual foram utilizados 24 (vinte e quatro) ratos, sob responsabilidade do Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 23 de abril de 2008

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: VAZZOLER, Amanda Messias

Título: Estudo Morfoquantitativo do Miocárdio do Ventrículo Esquerdo de Ratas
Ooforectomizadas Submetidas a Exercício Aeróbico

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 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: _____

“É curioso observar como a vida nos oferece respostas aos mais simples e variados questionamentos do cotidiano...

Vejamos:

A mais longa caminhada só é possível passo a passo...

O mais belo livro do mundo foi escrito letra por letra...

Os milênios se sucedem, segundo a segundo...

As mais violentas cachoeiras se formam de pequenas fontes...

A imponência do pinheiro e a beleza do ipê começaram ambas na simplicidade das sementes...

Não fosse a gota e não haveria chuvas...

O mais singelo ninho se fez de pequenos gravetos e a mais bela construção não se teria efetuado senão a partir do primeiro tijolo...

As imensas dunas se compõem de minúsculos grãos de areia...

Como já refere o adágio popular, nos menores frascos se guardam as melhores fragrâncias...

É quase incrível imaginar que apenas sete notas musicais tenham dado vida à "Wonderful World", de Louis Armstrong, e à "Aleluia", de Mendel...

O brilhantismo de Einstein e a ternura de Vinícios de Moraes tiveram que estagiar no período fetal e nem mesmo Jesus Cristo, expressão maior de Amor, dispensou a fragilidade do berço...

...Assim também o mundo de paz, de harmonia e de amor com que tanto sonhamos só será construído a partir de pequenos gestos de amor, alegria, auto domínio, benignidade, bondade, brandura, compreensão, respeito, longanimidade, perdão, dia-a-dia...

Ninguém pode mudar o mundo, mas podemos mudar uma pequena parcela dele:

Esta parcela que chamamos de "Eu".

Não é fácil nem rápido...

Mas com certeza...

Vale a pena tentar!"

(F. Azamor; adaptação A.M.V.)

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a meu amado e eterno avô
Paulo (in memorian), que mesmo distante
manteve-se sempre perto... ao amor da minha
vida, meu marido Emerson Morelli pelo amor
dedicado a mim, e aos meus pais Neide e
Armando que são tudo em minha vida. Nada
seria possível sem vocês ao meu lado... amo
vocês mais do que a mim mesma, ou melhor,
incondicionalmente!!!*

*"Mais do que qualquer outra coisa a
ser guardada, resguarda teu coração,
pois dele procedem as fontes da
vida."*

Provérbios 4:23

*"Há pessoas que transformam o sol
numa simples mancha amarela, mas
há também aquelas que fazem de
uma simples mancha amarela o
próprio sol"*

Pablo Picasso

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço primeiramente a *Jeová Deus*, por realizar meu sonho de me tornar mestre em ciências;

Ao meu orientador *Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza* pela orientação, paciência, confiança, amizade, respeito e direcionamento profissional. Sem o Senhor esse sonho não teria se realizado, alias, eu nem o teria sonhado. Muito Obrigada.

Aos meus pais *Armando* e *Neide*, meu amado avô *Paulo (in memorian)*, e a minha avó *Emília*, que nunca deixaram de acreditar em mim durante esses dois anos e por me fazerem acreditar mais na pessoa que eu me tornei;

Ao amor da minha vida, meu marido *Emerson G. Morelli* pelo amor, dedicação, apoio, carinho, companheirismo e confiança de que tudo daria certo;

Aos meus queridos irmãos *Andréa*, *Vanessa* e *Gustavo* pelo apoio, confiança e dedicação (amo vocês), ao meu maravilhoso e sempre fiel cunhadinho *Jorgenys* (Neno), por acreditar em meu potencial; e ao meu cunhado *Reinaldo* pela atenção e respeito; a minha pequena sobrinha *Mariana* pelo simples fato de existir e fazer parte da minha vida;

A uma amizade que eu conquistei nesse período de mestrado, *Renata G. Fontinele*. Não sei o que teria sido de mim sem você pra dividir a marmita, para não passar do ponto, para chegar cedo (ou atrasada?), para estudar, pra traduzir, pra desabafar, pra dar altas risadas no msn, enfim....sem o seu apoio e instrução eu não sei se teria começado essa jornada tão importante. Obrigada amiga por tudo!

Aos meus amigos que conquistei nesta jornada: *Fabiana S. Matsumoto*, *Renata de Britto Mary*, *Daniela Cagnoto*, *Claudia Kanashiro*, *Joel Alves de Sousa* e *Regina Bolina* por todos os momentos que passamos juntos desfrutando de amizade e trocando experiências. Com certeza estarão sempre em minha memória.

AGRADECIMENTOS

A *Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, pela oportunidade de aprimoramento científico e profissional.

A *Prof. Dra. Maria Angélica Miglino* pela oportunidade, confiança, ensinamentos, e por disponibilizar o uso do Laboratório de Histologia e Embriologia. Muito obrigada!

Ao *Coronel Prof. Dr. João Batista da Costa* que me inspirou e me incentivou a querer seguir a carreira acadêmica, meu muito obrigado;

A técnica e amiga do Laboratório de Histologia e Embriologia, *Dra. Sandra Freiburger Affonso* pela força e ensinamento.

Ao *Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio*, por ter cedido gentilmente o espaço para a realização do protocolo experimental no canil GRMD.

Aos colegas do canil GRMD, em especial ao *José Augusto Eulálio* e *Marina Brolio* pelo apoio, paciência e simpatia.

Ao *Prof. Dr. José Roberto Kfoury*, pelos ensinamentos, amizade e por disponibilizar o uso do laboratório LTIAM.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação do Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres sem exceção, pelos ensinamentos.

À minha melhor e grande amiga e irmã que amo tanto, *Francine Chamorro* pela confiança e apoio nas horas em que eu mais precisei e as minhas queridas amigas *Karina* e *Patrícia* por tudo que já vivemos e pela amizade verdadeira que a muito conquistamos e que levamos conosco hoje e sempre;

Aos meus eternos amigos *Amanda Abreu*, *Dileid Oliveira*, *Raphael Nietto* e *Rodrigo Betiol* pela amizade, confiança e pelos passeios que juntos fizemos;

À meu amigo *Marcos* e ao meu grande amigo *Davidson* pela “força” com as traduções e paciência durante minhas aulas de inglês;

Aos técnicos do setor de Anatomia, *Ednaldo Ribas Farias (Indio)*, *Diogo Mader*, *João do Carmo Freitas*, *Raimundo Leal de Sousa* e *Natália Garcia de Andrade (Branca)*, pelo carinho, respeito e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia, *Jaqueline Martins de Santana* e *Maicon Barbosa da Silva* e a secretária do M.A.V. *Fátima de Lourdes Minari* pela ajuda, carinho e respeito.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em especial a *Elza Maria R. B. Faquim*, pela paciência, orientação e correção desta dissertação, sem ela eu teria me desesperado.

Ao pessoal do Laboratório Rhesus Veterinária, em especial a *Dra. Márcia*, pela seriedade.

A todos os colegas da pós-graduação pela amizade, em especial, Thiago Aloia, Juliana Plácido, Evander Bueno, Guilherme Buzzon, Myrian Lança A. Gutierrez, Hugo Andrés Gutierrez e Valquíria Mariotti;

Enfim, a todas as pessoas que direta ou indiretamente, presentes ou ausentes contribuíram para que eu chegasse a me tornar o que me torno exatamente hoje, ***Mestre em Ciências***.

RESUMO

VAZZOLER, A. M. **Estudo Morfoquantitativo do Miocárdio do Ventrículo Esquerdo de Ratas Ooforectomizadas Submetidas a Exercício Aeróbico.** [Morphoquantitative Study of Myocardium of Left Ventricle of Ooforectomized Female Rats Submitted to Aerobic Exercise]. 2008. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Diversos estudos indicam que a deficiência de estrógeno aumenta a incidência de doenças cardiovasculares em mulheres na pós-menopausa. Os efeitos decorrentes da deprivação de estrógeno no miocárdio ainda não estão totalmente esclarecidos. Estudos têm evidenciado efeitos benéficos da atividade física no sistema cardiovascular, em qualquer condição, em especial na menopausa. Utilizando ratos Wistar, como modelo experimental, os objetivos deste trabalho são: a) verificar se a ooforectomia e a atividade física produzem alterações no miocárdio do ventrículo esquerdo, b) verificar se a realização do exercício físico aeróbico tem efeito sobre essas alterações. Para a realização deste estudo foram utilizadas 15 ratas com 6 meses de idade, da linhagem Wistar, distribuídas em 3 grupos de 5 ratas cada: GC- Ratas com 6 meses de idade sem ooforectomia e sem atividade física; GS- Ratas com 6 meses de idade com ooforectomia bilateral sem atividade física; GA- Ratas com 6 meses de idade com ooforectomia bilateral que realizaram atividade física (corrida em esteira) durante 3 meses. Os animais dos 3 grupos foram eutanasiados com 9 meses de idade. A avaliação foi realizada através de microscopia de luz e estereologia. Os cortes histológicos foram corados por: Hematoxilina-Eosina e Picrosírius. Na parede do ventrículo esquerdo foram estimadas as densidades de volume dos cardiomiócitos, do tecido conjuntivo e a densidade de comprimento e densidade de volume dos vasos intramiocárdicos. Foi estimado o número total de núcleos de cardiomiócitos e sua densidade numérica foi estimada através do método disector. Os dados quantitativos dos três grupos foram estatisticamente comparados através do ANOVA e teste de Tukey. Os resultados mostraram que houve um aumento de peso nos animais do GS e GA em relação ao GC. Quanto ao treinamento, os animais do GA tiveram melhor rendimento nos TEMs. Quanto ao volume do VE, observamos uma diminuição, embora não significativa, nos animais do GS e GA em relação ao GC. A densidade de volume dos vasos intramiocárdicos foi maior no GC que no GA. As diferenças não foram estatisticamente significantes em relação à ooforectomia e ao exercício físico para os parâmetros: densidade de volume dos cardiomiócitos e do tecido conjuntivo, densidade de comprimento dos vasos intramiocárdicos, densidade numérica dos núcleos dos cardiomiócitos, número total de núcleos de cardiomiócitos e densidade numérica do colágeno. Esses dados nos levam a concluir que a ooforectomia acarreta alterações no volume do ventrículo esquerdo e a atividade física diminui a densidade de volume dos vasos intramiocárdicos. Quanto aos outros itens, nem a ooforectomia, nem a atividade física, isoladamente ou associada, parecem influenciar de maneira significativa nestes dados.

Palavras-Chave: Miocárdio. Ventrículo Esquerdo. Ooforectomia. Exercício Físico. Menopausa.

ABSTRACT

VAZZOLER, A. M. **Morphoquantitative Study of Myocardium of Left Ventricle of Ooforectomized Rats Submitted to Aerobic Exercise.** [Estudo Morfoquantitativo do Miocárdio do Ventrículo Esquerdo de Ratas Ooforectomizadas Submetidas a Exercício Aeróbico]. 2008. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Several studies indicate that the estrogen deficiency increase the incidence of the cardiovascular diseases in women in the post-menopausal period. The effects of the estrogen deprivation in the myocardium still remain unclear. Studies have proved beneficial effects of the physical activity in the cardiovascular system, especially in the menopause. Using Wistar rats, as an experimental model, the aims of this work are: a-) to check if the ooforectomy and the physical activity produce alterations in the left ventricle of the myocardium; b-) to check if the aerobic exercise realization affects these alterations. To achieve these goals it was used 15 Wistar rats of 6 months of age, distributed in 3 groups of five rats each: Control group- Rats with six months of age without ooforectomy and physical activity; GS- Rats with six months of age with ooforectomy bilateral and without physical activity and, GA- Rats with six months of age with ooforectomy bilateral and physical activity during 3 months. All rats were euthanased with 9 months of age. The results were obtained by using light microscopy and stereology. The histological section was stained with Hematoxylin and Eosin, and Picrosirius stain. On the wall of the left ventricle were estimated the density of volume of the cardiomyocyte, of the connective tissue and the density of length and the density of volume of the intramyocardial vessels. It was estimated the total number of nuclei of cardiomyocyte and its numerical density was estimated a cross the *disector* method. The data of the three groups were statistically compared for the ANOVA and Tukey's test. The results showed that there was an increase in the weight in the animals of GS and of GA. In relation to training, the animals of GA obtained the best income in the TEMs. In relation to the volume of the left ventricle, it was observed a decrease, although not significant, in the animals of GS and GA. The density of volume of the intramyocardial vessels was higher in the GC than GA. In relation to the ooforectomy and the physical exercise for the items: density of volume of the cardiomyocyte and of the connective tissue, density of length of the intramyocardial vessels, numerical density of nuclei of cardiomyocyte, total number of nuclei of cardiomyocyte and numerical density of collagen, the differences weren't significant. We can conclude that the ooforectomy result in changes in the volume of the left ventricle and that the physical activity decrease the density of volume of the intramyocardial. In relation to the other items, neither the ooforectomy, neither the physical activity, alone or together, seem doesn't affect these data.

Key-words: Myocardium. Left Ventricle. Ooforectomy. Physical Activity. Menopause.

LISTA DE ABREVIações

VE.....Ventrículo Esquerdo

GC.....Grupo Controle

GS.....Grupo Sedentário

GAGrupo Atleta

TEM.....Teste de Esforço Máximo

HEHematoxilina-Eosina

EPMErro Padrão da Média

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Demonstrativo das velocidades médias em cada TEM, seguidos pelo desvio padrão e significância estatística	48
Tabela 2	Demonstrativo das médias das pesagens dos animais dos diferentes grupos estudados, seguidas pelo desvio padrão e significância estatística.....	50
Tabela 3	Demonstrativo das médias do volume do ventrículo esquerdo nos diferentes grupos estudados, seguido pelo erro padrão da média (EPM) e significância estatística	51
Tabela 4	Demonstrativo das médias (%) da densidade de volume de cardiomiócitos, interstício e vasos intramiocárdicos nos diferentes grupos estudados, seguidos pelo erro padrão da média (EPM) e significância estatística.....	54
Tabela 5	Demonstrativo das médias da densidade de comprimento dos vasos intramiocárdicos dos diferentes grupos estudados, seguidos pelo erro padrão da média (EPM) e significância estatística	55
Tabela 6	Demonstrativo das médias da densidade numérica dos núcleos dos cardiomiócitos dos diferentes grupos estudados, seguidos pelo erro padrão da média (EPM) e significância estatística	56
Tabela 7	Demonstrativo das médias do número total de núcleos de cardiomiócitos nos diferentes grupos estudados, seguidos pelo erro padrão da média (EPM) e significância estatística.....	57
Tabela 8	Demonstrativo das médias da densidade numérica de colágeno no interstício do miocárdio dos diferentes grupos estudados, seguidos pelo erro padrão da média (EPM) e significância estatística	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotografia mostrando o procedimento da citologia vaginal realizada nos animais dos grupos Sedentário e Atleta.....	38
Figura 2	Fotomicrografia representando a estimativa da densidade de volume do miocárdio do ventrículo esquerdo, com sobreposição de um sistema teste composto por pontos equidistantes entre si. Neste exemplo 92 pontos tocam as cardiomiócitos, 8 pontos tocam o interstício e 4 pontos tocam os vasos intramiocárdicos.....	41
Figura 3 (A-B)	Esquema mostrando a estimativa de células, e aplicação de um sistema teste, com método disector. Em A: secção "look up", as células contidas dentro de um sistema teste, com linhas de inclusão(pontilhadas) e exclusão(contínuas), B: secção "look dow", células contidas na mesma área da A. Na comparação de A e B (disector), é possível observar células que desaparecem (representadas em preto), em número de quatro.	43
Figura 4 (A-F)	Fotomicrografia da secção "look up" e "look dow" do miocárdio do ventrículo esquerdo (A-B) do animal do GC; (C-D) do animal do GS; (E-F) do animal do GA. As setas indicam os núcleos dos cardiomiócitos presentes na secção "look up" e ausentes na secção "look dow"	44
Figura 5	Os dados da figura mostram a velocidade máxima média obtida nos GC, GS e GA.....	47
Figura 6	Os dados da figura mostram a média das velocidades do treinamento do GA e da atividade nos grupos C e S nos três meses do experimento	49
Figura 7	Médias das pesagens obtidas no pré-operatório, em cada um dos três testes de esforço máximo e no dia da eutanásia, para os animais dos grupos C, S e A	49
Figura 8	Volume do ventrículo esquerdo dos cinco animais de cada grupo estudado (GC, GS, GA) obtidos pelo método de Scherle (1970).....	51
Figura 9	Cortes histológicos do miocárdio do ventrículo esquerdo mostrando os cardiomiócitos e interstício (setas) e vasos intramiocárdicos (VI) nos três grupos estudados (GC, GS e GA) HE; barra=40µm.....	53
Figura 10	Cortes histológicos do miocárdio do ventrículo esquerdo mostrando a distribuição das fibras colágenas nos três grupos estudados (GC, GS e GA); Picrosirius; barra=40µm.	58

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	23
3	REVISÃO DA LITERATURA	25
3.1	CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DO MIOCÁRDIO.....	25
3.2	EFEITOS DA DEPRIVAÇÃO DE ESTRÓGENOS SOBRE O MIOCÁRDIO	27
3.3	EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NO MIOCÁRDIO	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	MATERIAIS	34
4.2	MÉTODOS.....	34
4.2.1	Procedimento Cirúrgico.....	35
4.2.2	Protocolo Experimental (exercício físico).....	35
4.2.3	Citologia Vaginal e Exame de Sangue	37
4.2.4	Eutanásia dos animais.....	38
4.3	MICROSCOPIA DE LUZ.....	39
4.3.1	Coleta e Preparação do Material para Análise em Microscópio de Luz.....	39
4.3.2	Análise Morfométrica e Estereológica.....	40
4.3.2.1	Densidade de Volume dos Cardiomiócitos, do Tecido Conjuntivo e dos Vasos Intramiocárdicos	40
4.3.2.2	Densidade de Comprimento dos Vasos Intramiocárdicos.....	42
4.3.2.3	Densidade Numérica dos Núcleos dos Cardiomiócitos	42
4.3.2.4	Numero Total de Núcleos dos Cardiomiócitos	45
4.3.2.5	Densidade Numérica do Colágeno	45
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
5	RESULTADOS	47
5.1	ATIVIDADE FÍSICA	47

5.2	PESO CORPÓREO	49
5.3	VOLUME DO VENTRÍCULO ESQUERDO	50
5.4	RESULTADOS DAS ANÁLISES MORFOMÉTRICA E ESTEREOLÓGICA	52
5.4.1	Densidade de Volume dos Cardiomiócitos, do Tecido Conjuntivo e dos Vasos Intramiocárdicos	54
5.4.2	Densidade de Comprimento dos Vasos Intramiocárdicos	55
5.4.3	Densidade Numérica dos Núcleos dos Cardiomiócitos	55
5.4.4	Número Total de Núcleos de Cardiomiócitos	56
5.4.5	Densidade Numérica de Colágeno	57
6	DISCUSSÃO	61
6.1	ATIVIDADE FÍSICA	61
6.2	PESO DOS ANIMAIS	61
6.3	VOLUME DO VENTRÍCULO ESQUERDO	63
6.4	ANÁLISES MORFOMÉTRICA E ESTEREOLÓGICA	63
6.4.1	Densidade de Volume dos Cardiomiócitos, do Tecido Conjuntivo e dos Vasos Intramiocárdicos	63
6.4.2	Densidade de Comprimento dos Vasos Intramiocárdicos	64
6.4.3	Densidade Numérica dos Núcleos dos Cardiomiócitos	65
6.4.4	Número Total de Núcleos de Cardiomiócitos	65
6.4.5	Densidade Numérica de Colágeno	66
7	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

Estudos sobre o músculo cardíaco, cuja forma e função são essenciais para o desempenho adequado de todo o sistema cardiovascular, ganharam grande importância atualmente devido ao aumento das doenças cardíacas afetando um número considerável de pessoas. Além disso, o músculo cardíaco passa a ter um significado essencial, uma vez que, modificações na sua estrutura geram falhas e comprometem outros sistemas até afetar todo o organismo.

Apesar das similaridades anatômicas, existe forte evidência de que o sexo interfere nas diferenças da estrutura e função cardiovascular. O sexo é um modificador potente do sistema cardiovascular porque os machos e as fêmeas diferem em diversos aspectos da biologia e fisiologia do coração. É conhecido que as mulheres apresentam menor incidência de doenças cardíacas que os homens até a idade de menopausa (HAYWARD et al., 2000). As razões para estas diferenças não são completamente compreendidas, mas são atribuídas a diversos fatores. Os hormônios sexuais parecem ser reguladores importantes na fisiologia do coração e influenciam as respostas moleculares e fisiológicas do coração quando submetido ao estresse do exercício (MELINE; NOBLE, 2008).

A menopausa é reconhecida como um período de maior risco de doença coronária. A ocorrência natural da deficiência de estrógeno, característica dessa fase do ciclo da vida leva a uma vulnerabilidade para esta condição. Na verdade, pré-reduções de estrogênios endógenos devido a anormalidades funcionais ou falhas dos ovários são hipóteses de patogenicidade e podem acelerar o desenvolvimento de doenças cardiovasculares prematuras, aumentando assim os efeitos sobre a saúde das mulheres mais idosas. De fato, com a expectativa de vida aumentando, as mulheres estão gastando mais tempo na fase pós-menopausa e ficam naturalmente mais expostas ao risco de doenças mais prevalentes neste momento, como hipertensão, diabetes, infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca. Acreditava-se que a terapêutica hormonal no período de pós-menopausa era ineficaz para a prevenção das doenças coronárias, por conseguinte, outras intervenções farmacológicas e não-farmacológicas deviam ser mais estudadas para amortizar o risco coronariano. De acordo com diversos estudos, o exercício físico pode ser considerado um instrumento para melhorar o estresse oxidativo e o controle da circulação associados à privação de estrógeno, parecendo ser uma alternativa, para

aumentar o controle do risco de desenvolver doenças crônicas nesta condição (IRIGOYEN et al., 2005).

Os estrógenos exercem efeitos no sistema cardiovascular sendo cardioprotetores em mulheres (COLDITZ et al., 1987; STAMPFER et al., 1991; BARRET-CONNOR; GRADY, 1998). Estudos demonstram que após os sessenta anos a prevalência de hipertrofia do ventrículo esquerdo em mulheres aumenta 69% por década de vida comparada com apenas 15% em homens (HAYWARD et al., 2000).

As doenças cardiovasculares são as principais causas de morte no mundo industrializado. Como tal, medidas cardioprotetoras são de grande interesse. Além de ser associado à cessação da vida reprodutiva em mulheres, a menopausa coincide com um aumento de várias doenças, incluindo as cardiovasculares. Parte do aumento da incidência de doenças cardiovasculares nas mulheres pós-menopáusicas, podem ser atribuíveis ao aumento da gordura corporal central. Terapias destinadas à prevenção destas alterações na distribuição do tecido adiposo, como a terapêutica hormonal de substituição, a alimentação e o exercício são susceptíveis de proporcionar em longo prazo benefícios cardiovasculares e metabólicos para a saúde da mulher (TCHERNOF et al., 1998). Apesar de muitos estudos indicarem que o uso de estrógeno tem efeito benéfico no sistema circulatório (COLDITZ et al., 1987; BAR et al., 1993; BARRET-CONNOR; GRADY, 1998) a terapia de reposição hormonal precisa ser melhor estudada para esclarecer seus múltiplos efeitos. Alguns estudos sugerem que a terapia de reposição hormonal em mulheres pós-menopausa reduz os riscos cardiovasculares em geral (COLDITZ et al., 1987; STAMPFER et al., 1991; BARRET-CONNOR; GRADY, 1998), mas aumenta o risco de trombose (THIJS et al., 2002) e doenças cerebrais. Não afeta, porém a incidência de doenças coronárias, demonstrando o risco estimado para os benefícios e prejuízos da terapia hormonal isolada (POCHMANN et al., 2004).

A atividade física nos proporciona benefícios imediatos no organismo como a regularização dos níveis de glicose sanguínea, de adrenalina e noradrenalina e benefícios a longo prazo como a melhoria do condicionamento cardiovascular, resistência e flexibilidade (CARVALHO et al., 1995; GOBBI, 1997).

Em mulheres após a menopausa tem-se observado nos últimos anos uma valorização da prática de atividade física como meio de manutenção da saúde. Na literatura são encontrados numerosos trabalhos mostrando os efeitos benéficos da prática de exercícios sobre os

componentes do aparelho músculo-esquelético após a menopausa, uma vez que o estrogênio possui um efeito protetor no músculo esquelético. Porém, a contribuição da atividade física quando há privação de estrogênio associados com modelos experimentais de hipertensão, diabetes ou infarto do miocárdio, bem como os princípios fisiopatológicos dessas condições precisam ser ainda melhor estudados.

Pouco se sabe sobre os efeitos da atividade física, no período de menopausa sobre determinados tecidos, como o músculo cardíaco. Deste modo, estudos sobre este tema utilizando animais de experimentação, poderiam ajudar a esclarecer estas dúvidas. Assim sendo, o presente estudo visa avaliar as alterações morfoquantitativas da ooforectomia sobre o miocárdio do ventrículo esquerdo, e os efeitos da realização de atividade física sobre estas alterações.

A importância clínica e a inexistência de trabalhos sobre o tema em animais de experimentação justificam a realização do presente estudo. Os resultados poderão servir como base para a realização de trabalhos fisiológicos e em patologias cardíacas.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O presente estudo tem por intuito avaliar os efeitos da deprivação de hormônios estrogênicos sobre o miocárdio do ventrículo esquerdo de ratas Wistar e a influência da realização de atividade física sobre estes efeitos. Os seguintes parâmetros do miocárdio foram analisados:

- Densidade de volume dos cardiomiócitos, do tecido conjuntivo e dos vasos intramiocárdicos;
- Densidade de comprimento dos vasos intramiocárdicos;
- Densidade numérica dos núcleos dos cardiomiócitos;
- Número total de núcleos de cardiomiócitos e
- Densidade de volume do colágeno intersticial do miocárdio.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo será apresentada a revisão da literatura sobre o tema, cujos tópicos serão abordados na seguinte ordem: características estruturais do miocárdio, alterações do miocárdio devido à deprivação de hormônios estrogênicos e efeitos do exercício físico no miocárdio.

3.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DO MIOCÁRDIO

O coração é um órgão muscular central que através de batimentos rítmicos se contrai, atuando como uma bomba, impulsionando o sangue para o interior de um sistema de tubos, os vasos sanguíneos. Possui a forma de um cone embora, com variações de espécie para espécie.

Estruturalmente, o coração é constituído por três túnicas conforme descrito por Banks (1991) e Junqueira e Carneiro (2004), a interna, ou endocárdio, a média, ou miocárdio e a mais externa, ou epicárdio. O músculo cardíaco e as válvulas cardíacas são amparados por um esqueleto de tecido conjuntivo denso constituindo o denominado esqueleto cardíaco. O endocárdio que reveste o coração internamente é constituído por tecido endotelial liso com células pavimentosas poliédricas com grande quantidade de fibras colágenas e poucas elásticas. O miocárdio; a camada mais espessa do coração; é constituído por feixes de fibras musculares cardíacas dispostas em várias direções e separadas por septos de tecido conjuntivo muito vascularizado, e que envolvem as cavidades cardíacas; sua espessura depende do volume de trabalho que ele executa, ou seja, está relacionada à resistência encontrada no bombeamento de sangue pelas diferentes câmaras. O epicárdio corresponde à camada visceral do pericárdio e seu epitélio se apresenta como cúbico cilíndrico e achatado, sendo muito rico em fibras elásticas e fibras colágenas (GARDNER et al., 1971; SPENCE 1991).

Uma espessa parede curva denominada septo interventricular, divide a cavidade cardíaca transversalmente em duas metades, direita e esquerda, originando assim respectivamente o ventrículo direito e o ventrículo esquerdo (DYCE, 1987). Os ventrículos possuem uma parede composta pelas três camadas já descritas: uma, chamada de

subepicardial, uma média e uma subendocardial, contendo fibras que se intrelaçam se deslocando entre uma camada e outra. (NICKEL, 1981).

As células musculares ou miócitos representam aproximadamente um terço do número de células cardíacas, porém seu volume ocupa dois terços do miocárdio (WEBER, 1989). A musculatura da parede ventricular esquerda é muito mais espessa em comparação com a parede ventricular direita em conformidade com o maior trabalho que deve realizar de impelir o sangue através de vasos que se dirigem para o corpo todo e se dispõem em feixes superficiais e profundos (DYCE, 1987).

Em relação ao tecido conjuntivo do miocárdio muitos estudos mostram que alterações na arquitetura, no arranjo ou na quantidade de tecido conjuntivo, em especial das fibras colágenas, podem alterar o trabalho e modificar a função cardíaca. O tecido conjuntivo é responsável por permitir a contração e relaxamento do músculo cardíaco e está inteiramente ligado ao mecanismo ventricular. De acordo com Ganong (1990), o tecido conjuntivo realiza funções de nutrição, defesa, sustentação e preenchimento. Foram descritas no coração (ROBINSON et al., 1983), três camadas de tecido conjuntivo, o epimísio, perimísio e o endomísio. O epimísio é uma camada de tecido conjuntivo que envolve o músculo cardíaco como um todo. O perimísio é a camada de tecido conjuntivo que envolve feixes de fibras musculares cardíacas, e que une o endomísio ao epimísio. O endomísio é uma delicada porção de tecido conjuntivo situado entre as células musculares cardíacas (SPENCE, 1991).

Os principais tipos de colágeno que estão presentes no interstício do miocárdio são I, III e V, embora acredita-se que pelo menos outros dois tipos de colágeno também estejam presentes no miocárdio: os tipos IV e VI. É mais predominantemente o colágeno tipo I (80% do colágeno miocárdico total) seguido do colágeno tipo III (12%). O interstício tem a função de dar suporte aos miócitos cardíacos, artérias intramiocárdicas, veias, capilares e arteríolas, além de defesa contra invasões por corpos estranhos e facilitar a troca de substâncias entre miócitos e capilares auxiliando assim na nutrição dos miócitos. As fibras elásticas também estão presentes no miocárdio, porém em menor quantidade que as colágenas, estando presentes nas artérias em grande quantidade, promovendo assim a resistência necessária para distensão dos vasos (WEBER, 1989; DEBESSA et al., 2001; LOPES et al., 2002).

3.2 EFEITOS DA DEPRIVAÇÃO DE ESTRÓGENOS SOBRE O MIOCÁRDIO

Diversos estudos têm demonstrado que a menopausa está relacionada com a diminuição da capacidade aeróbica, da força muscular, densidade mineral óssea, aumento do peso corporal, diabetes tipo 2, fraturas osteoporóticas bem como uma maior incidência de doenças cardiovasculares (SOWERS; LA PIETRA, 1995; STAESSEN et al., 1998; RAPPELLI, 2002; FIELDS et al., 2004). A idade avançada e a deprivação de estrógeno provocam alterações morfológicas e funcionais importantes no organismo humano (MORIGUCHI; MORIGUCHI, 1988). A baixa prevalência de doenças coronárias em mulheres antes da menopausa e seu aumento depois da menopausa são bem estabelecidos (IRIGOYEN et al., 2005; POCHMANN et al., 2004). Segundo Gross et al. (2005), a incidência de doenças no coração aumenta dramaticamente depois da menopausa. A mudança na massa do ventrículo esquerdo com a idade em mulheres é significativa (HAYWARD et al., 2000). De acordo com Wenger (1988) e Hayward et al. (2000), a menopausa está associada, além de outras alterações, a um aumento da espessura da parede ventricular esquerda.

As mulheres de um modo geral apresentam menos doenças cardíacas quando comparadas aos homens, até a idade da menopausa, sendo este estado responsável por um marco, ou alteração cardiovascular significativa em termos de fisiologia cardíaca como também patologias (HAYWARD et al., 2000). Paroo et al. (2002), sugeriram em um estudo realizado com ratos machos e fêmeas que o exercício pode ser mais importante para os homens do que para as mulheres antes da menopausa na defesa contra os efeitos de doenças cardíacas e pode oferecer uma nova maneira pela qual o sexo masculino pode reduzir a susceptibilidade a eventos cardíacos adversos.

O papel dos hormônios sexuais para doenças cardiovasculares permanece controverso. São várias as evidências que sugerem que os hormônios sexuais, em especial o estrógeno, têm um papel significativo nas respostas fisiológicas em mulheres no período de menopausa, pois sua ação revela um estímulo cardíaco direto (DUAN et al., 2004). A diminuição da produção de estrógeno está associada com mudanças no sistema cardiovascular, muscular e esquelético (KADI et al., 2002). O estrógeno parece exercer um efeito protetor sobre o miocárdio até a menopausa (HINTZ et al., 2001; MARKS, 2001; XIN et al., 2002; GROSS et al., 2005)

devido à liberação de fatores cardioprotetores e pelo aumento da disponibilidade dos íons Ca^{2+} (JANKOWSKI et al., 2001; VAN EICKELS et al., 2001; ZHU et al., 2002).

Elwood e Sweetnam (1979), sugeriram que os hormônios esteróides podem inibir a agregação plaquetária, reduzindo assim o risco cardiovascular em mulheres pós-menopausa. Outros estudos indicaram que esses hormônios têm um papel na regulação do crescimento cardíaco (GOLDSTEIN et al., 2004), função contrátil cardíaca (HINTZ et al., 2001) e controle de doenças arterosclerótica através das plaquetas (FUSTER et al., 1992; ROSS, 1999), além de uma pequena mais significativa mudança na pressão sangüínea em resposta à menopausa (HAYWARD et al., 2000). Segundo Tiidus (2000), o estrogênio pode atuar diretamente sobre membranas dos músculos para preservar a estabilidade ultraestrutural e a homeostasia intracelular do cálcio.

Receptores de estrógeno e progesterona estão presentes em células do miocárdio (HAYWARD et al., 2000), e de acordo com Tremblay et al. (1997), receptores alfa e beta estão presentes também em células endoteliais vasculares.

Diversos estudos indicam que a terapia de reposição de estrógeno reduz a incidência e progressão de doenças cardiovasculares em mulheres na pós-menopausa (MALHOTRA et al., 1990; SHARKEY et al., 1999; POCHMANN et al., 2004), e segundo Pinotti (1995), níveis adequados de estrogênios atuam profilaticamente contra as doenças cardiovasculares. Terapias de reposição hormonal na pós-menopausa conferem benefícios cardiovasculares podendo atenuar a infiltração de neutrófilos (STUPKA et al., 2001) e também diminuir ferimentos em modelos experimentais de acidente vascular cerebral (SANTIZO et al., 2000; WANG et al., 1999) e infarto do miocárdio (MCNULTY et al., 2000). Porém, em contraste, outros pesquisadores sugerem que a terapia de reposição hormonal está associada com eventos cardíacos (KANNEL et al., 1976; BARRET-CONNOR; BUSH, 1991; HERRINGTON et al., 1999; ROSSOUW et al., 2002).

Hunt et al. (2001), demonstraram que a terapia de reposição de estrógeno a longo prazo, em mulheres na pós-menopausa tem efeitos sobre a regulação cardiovascular; no entanto, a terapêutica hormonal é ainda questionável e que não se aplicam a todas as mulheres pós-menopáusicas.

Estudos mostram que o estrógeno protege o coração da hipertrofia, produzida por distúrbios do metabolismo do cálcio (MARKS, 2001; XIN et al., 2002). O estrógeno pode

inibir a hipertrofia cardíaca neutralizando a hipertensão por afetar diretamente o coração e acionando a liberação de fatores cardioprotetores (JANKOWSKI et al., 2001; VAN-EICKELS et al., 2001; ZHU et al., 2002), e de acordo com Subbiah et al. (1993), o estrógeno tem demonstrado ter propriedades antioxidantes.

A privação de estrogênios induz a disfunção endotelial e o comprometimento autonômico e aumenta o estresse oxidativo nas mulheres ainda férteis (MERCURO et al., 2006) e mulheres pós-menopausadas, (FARAG et al., 2003; LIMA et al., 2005) aumentando assim o risco cardiovascular.

Segundo Tiidus (2000) e Stupka (2001), a suplementação de estrogênio em ratas ovariectomizadas pode atenuar a infiltração de neutrófilos e índices de lesão muscular após injúria. Esses autores também sugerem que a ovariectomia e suas associadas alterações fisiológicas também pode influenciar nos índices de lesão muscular após injúria em ratas fêmeas.

3.3 EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NO MIOCÁRDIO

O tratamento dos distúrbios da menopausa inclui, entre outros, a prática regular de atividade física (TCHERNOF et al., 1998). Os exercícios físicos têm sido indicados como um tratamento não farmacológico para muitas outras doenças. De acordo com Silva (1973), a atividade física regular e moderada realizada até por indivíduos senis tem efeitos benéficos sobre o sistema cardiovascular, pois muitos estudos têm relatado o benefício do exercício físico no sistema cardiovascular, para qualquer idade. No entanto há controvérsia sobre o tipo, frequência e intensidade do treinamento para regular certos parâmetros, tais como a pressão sanguínea e alcançar níveis terapêuticos (CASIGLIA et al., 2000; BROWN et al., 2003; CHRIST et al., 2004).

Tecidos jovens respondem melhor às forças do que tecidos mais envelhecidos (LANE; BUKWALTER, 1993). A microcirculação intramiocárdica é aumentada por vasodilatação durante atividade física via liberação de óxido nítrico (NUMAGUCHI et al., 1995; PEREIRA; MANDARIM-DE-LACERDA, 1999; PESSANHA et al., 1999). De acordo com um estudo realizado com ratas ooforectomizadas submetidas ao exercício físico, constatou-se que o

exercício aumentou significativamente os níveis de progesterona no sangue segundo Yasunori et al. (2001). Entretanto, efeitos morfológicos da atividade física sobre os tecidos de animais de experimentação com privação de estrógenos não estão totalmente esclarecidos.

O treinamento físico prolongado conduz a mudanças compensatórias no sistema cardiovascular. Uma das mais importantes delas é a hipertrofia cardíaca. O conhecimento dos fatores que contribuem para a hipertrofia de cardiomiócitos causada pelo exercício físico é ainda incompleto (KAMINSKI et al., 2007).

Marques et al. (2006), em um estudo realizado com ratas ooforectomizadas com hipertensão espontânea sugeriram que a ooforectomia acelerou a perda de cardiomiócitos, enquanto o exercício físico compensou este processo e mostrou-se benéfico reduzindo a pressão arterial, diminuindo a hipertrofia cardíaca causada pela hipertensão, além de diminuir a remodelação da parede cardíaca e aórtica principalmente pela redução da fibrose miocárdica intersticial, aumentando a vascularização do miocárdio, sustentando o número de cardiomiócitos incluindo hipertrofia dos mesmos.

No estudo de Marques et al. (2006), a ooforectomia e a atividade física mostraram uma interação nos efeitos dos seguintes parâmetros: pressão sanguínea, densidade de volume do tecido conjuntivo miocárdico, área seccional de cardiomiócitos, espessura da aorta e densidade de núcleos de células da musculatura lisa por unidade de área.

O treinamento físico após a ooforectomia diminuiu a remodelação no coração e na aorta. Os efeitos benéficos podem ter sido produzidos pela diminuição da pressão sanguínea devido ao exercício. Portanto esses resultados confirmam que o treinamento e o condicionamento físico têm um efeito protetor indireto nos cardiomiócitos e nos vasos, especialmente na aorta (MARQUES et al., 2006).

Irigoyen et al. (2005) concluíram em seu estudo que o exercício físico em ratas ovariectomizadas melhora o status hemodinâmico e o controle da circulação, provavelmente associado com a redução do estresse oxidativo, sugerindo um papel homeostático para o condicionamento físico na redução do risco cardiovascular em mulheres após a menopausa.

A principal conclusão do estudo de Irigoyen et al. (2005), é que o treinamento físico induz uma redução não só no estresse oxidativo, mas também na pressão arterial associada a um aumento da sensibilidade dos baroreflexos em animais ooforectomizados. Isto sugere que

o estresse oxidativo pode contribuir automaticamente à privação de estrogênio associado à deficiência cardiovascular que tenha sido observada em mulheres pós-menopáusicas.

O treinamento físico é recomendado como uma forma não farmacológica para o tratamento de muitas doenças inclusive da hipertensão e reduz, mesmo que ligeiramente, o risco de morte prematura e doença cardiovascular e está também associado com uma redução na incidência de doenças coronarianas (IRIGOYEN et al., 2005; PINHEIRO et al., 2006). A intensidade de leve a moderada e a duração do exercício diminui a pressão sanguínea (HAGBERG et al., 1995) e regride a massa do ventrículo esquerdo em casos hipertensivos (KOKKINOS et al., 1995).

O exercício físico tem se mostrado capaz de induzir a angiogênese capilar em animais normotensos e normalizar a morfologia das arteríolas e a resistência da microcirculação da musculatura esquelética em indivíduos hipertensivos (AMARAL et al., 2000).

De acordo com Pinheiro et al. (2006), a atividade física diminuiu a pressão sanguínea e a obesidade em animais com dieta induzida e permitiu a atenuação da hipertensão e conseqüente hipertrofia cardíaca. O efeito dessa diminuição após a atividade física melhorou a vascularização do miocárdio e a estrutura das carótidas e aorta, reduzindo a espessura e normalizando o número de células do músculo liso em ratos obesos e não obesos. A atividade física reduziu o aumento da área seccional dos cardiomiócitos em animais obesos sedentários, além de proteger e reduzir a hipertrofia do miocárdio dos animais obesos que foram submetidos ao exercício físico. A atividade física reduziu significativamente a fibrose intersticial do miocárdio, também melhorou a vascularização do mesmo, o que confirma estudos anteriores relatando efeitos benéficos da atividade física no coração de hipertensos (PINHEIRO et al., 2006).

Kaplan et al. (1994), em um estudo realizado com ratos submetidos ao exercício físico crônico por natação, estabeleceu que esses animais foram capazes de desenvolver hipertrofia cardíaca em resposta ao condicionamento físico crônico.

A atividade física permite a atenuação da hipertensão e a conseqüente hipertrofia cardíaca reduz a fibrose do miocárdio e melhora a vascularização miocardial em ratos obesos e não obesos, suportando a noção de que a atividade física é um alvo potencial para tratamento anti-hipertensivo não farmacológico em hipertensos associados com obesidade de dieta induzida (PINHEIRO et al., 2006).

Vários estudos têm sugerido que o exercício racional influencia favoravelmente nos fatores de risco de doenças cardiovasculares associados a situações patológicas. Uma recente revisão sistemática de exercícios controlados randomizada relatou os benefícios do exercício sobre o peso corporal, constituição óssea, força e resistência muscular, flexibilidade, consumo de oxigênio, pressão arterial e do controle metabólico após a menopausa (ASIKAINEN et al., 2004). Jurca et al. (2004), deram indícios de um aumento da taxa de variação do coração após 8 semanas de treinamento físico em mulheres pós-menopáusicas.

Em um estudo realizado com ratos espontaneamente hipertensos submetidos a exercício agudo e crônico, Silva et al. (1997) propõe que o exercício físico atenua significativamente a pressão sanguínea, aumentam a magnitude e frequência do estresse atuando nas células endoteliais, emitindo alguns fatores endoteliais que podem melhorar a sensibilidade do baroreceptor em exercícios balanceados. Outro estudo demonstrou que a redução da pressão arterial, observada após atividades físicas nos ratos espontaneamente hipertensos, estava relacionada com a redução do coração e produção cardíaca (VÉRAS-SILVA et al., 1996).

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Para a realização deste estudo foram utilizados 15 ratas (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, com seis meses de idade, com massa corporal variando de 185g a 260g, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP). Estes animais foram distribuídos em três grupos com 5 ratas cada:

Grupo Controle (GC): Ratas com seis meses de idade sem ooforectomia e sem atividade física que foram eutanasiadas com nove meses de idade;

Grupo Sedentário (GS): Ratas com seis meses de idade com ooforectomia bilateral sem atividade física que foram eutanasiadas com nove meses de idade;

Grupo Atleta (GA): Ratas com seis meses de idade com ooforectomia bilateral submetidas à atividade física durante três meses, que foram eutanasiadas com nove meses de idade.

Em cada grupo foi coletado e analisado o ventrículo esquerdo de cada animal (cinco animais de cada grupo) o qual foi submetido às técnicas de microscopia de luz.

4.2 MÉTODOS

Os métodos realizados neste trabalho serão descritos de acordo com as seguintes etapas: procedimento cirúrgico, protocolo experimental (exercício físico), eutanásia dos animais, coleta e processamento do material para análise à microscopia de luz e análise morfométrica e estereológica.

4.2.1 Procedimento Cirúrgico

As ratas dos grupos GS e GA foram pesadas e submetidas à ooforectomia bilateral sob anestesia geral com injeção intraperitoneal de Ketamina (75 mg/kg de peso corpóreo) e Diazepam (5 mg/kg de peso corpóreo) (TUFFERY, 1995).

Com o animal em decúbito dorsal, foi realizada uma pequena incisão na região pré-umbilical, mais precisamente, no centro do abdome, com a finalidade de expor as vísceras pélvicas e abdominais. Através desta abertura os ovários e as tubas uterinas foram tracionados para fora da cavidade abdominal com uma pinça. As tubas foram então suturadas bilateralmente para em seguida fazer a remoção dos ovários. Ao término do procedimento cirúrgico, a camada muscular, o subcutâneo e a pele foram suturados com pontos simples separados.

Após o procedimento cirúrgico, foi administrado por via subcutânea o analgésico e antiinflamatório Flunixinina Meglumina (Banamine®) uma vez ao dia durante três dias consecutivos, a uma dosagem de 2,5 mg/kg (FLECKNELL, 1999). Os animais ficaram em observação por uma semana, permanecendo alojados em caixas de polipropileno providas de bebedouro e comedouro, e mantidos em condições ambientais controladas de temperatura ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$) e iluminação (ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro) onde permaneceram durante todo o experimento. Passado o período de observação, iniciou-se a atividade física em esteira (YASUNORI et al., 2001). Para todos os grupos foi fornecida ração comercial referência para ratos (Nuvital®) e água *ad libitum*.

Os animais do GA realizaram atividade física, constando de corrida em esteira, cinco vezes por semana conforme protocolo descrito no item seguinte.

4.2.2 Protocolo Experimental (exercício físico)

Uma semana após a cirurgia os animais foram pesados e submetidos à adaptação ao exercício físico e foram separados de forma homogênea (DISHMAN et al., 1988). Após esse

período os animais realizaram os testes de esforço máximo (TEMs) para determinar a velocidade a ser empregada no treinamento. Um TEM foi realizado no início do experimento em uma esteira elétrica da marca INBRASPORT, totalmente adaptada aos animais, a uma velocidade de 0,3 Km/h (5m/min). A cada quatro minutos a velocidade da esteira foi aumentada na mesma proporção de 0,3 Km/h (5m/min). O valor do TEM foi obtido quando o animal demonstrou sinais de fadiga, ou seja, quando ele perdeu a habilidade de acompanhar a velocidade estabelecida na esteira (SILVA et al., 1997). A cada quatro semanas os animais foram pesados e realizados novos TEMs, para que a velocidade do treinamento fosse ajustada para as próximas quatro semanas, caso os animais apresentassem variações nos seus desempenhos. Dez dias após a cirurgia foram iniciados os treinamentos regulares. O protocolo do treinamento físico foi assim determinado:

- Os animais do GC e GS foram submetidos à atividade física apenas uma vez por semana durante dez minutos com velocidade igual a 30% do respectivo teste de esforço máximo, apenas para manterem a habilidade de correr na esteira. A cada quatro semanas os animais do GC e GS foram também, submetidos a novos testes de esforço máximo.
- Os animais do GA foram submetidos a exercício físico regular cinco vezes por semana (de segunda-feira à sexta-feira) em esteira ergométrica por um período de doze semanas. Na primeira semana correram trinta minutos com velocidade progressiva até 60% daquela conseguida no teste de esforço máximo. A partir da segunda semana o tempo de treinamento foi gradativamente aumentado, sendo que a cada semana foram aumentados dez minutos, até atingirem o tempo de 60 minutos na quarta semana de treinamento, onde ao final da mesma, outro TEM foi realizado para ajustar a intensidade do exercício para as próximas quatro semanas.

Os animais dos três grupos (GC, GS, GA) foram pesados antes de realizarem atividade física, nos dias de aplicação do TEM e antes da eutanásia. As médias dos pesos foram calculadas, os dados tabulados e comparados estatisticamente. Os dados obtidos para as velocidades dos três grupos (GC, GS, GA) de animais foram também tabulados, as médias calculadas e comparadas estatisticamente.

4.2.3 Citologia Vaginal e Exame de Sangue

A duração do ciclo estrogênico de ratas ocorre em torno de quatro dias sendo caracterizada por quatro fases: diestro, próestro, estro e metaestro (MARCONDES et al., 2002; MARTINS et al., 2005). A máxima estimulação estrogênica no tecido corresponde à fase estro.

Foram realizadas oito citologias vaginais, nos animais dos GS e GA, divididas em dois períodos, sendo quatro citologias vaginais (uma por dia) e após um mês, mais quatro citologias vaginais (uma por dia) (MARQUES et al., 2006) (Figura 1). Utilizamos para coloração das lâminas o New Prov[®] (Instant – Prov: conjunto de corantes para coloração diferencial rápida em hematologia).

Após a anestesia, no momento da eutanásia, os corações foram evidenciados por meio de toracotomia e antes da lavagem do sistema, retiramos uma pequena amostra de sangue dos animais dos GC, GS e GA, as quais foram enviadas para o laboratório Rhesus Veterinário para análise e dosagem do estradiol através do método de Radioimunoensaio.

Tanto a citologia vaginal, quanto o exame de sangue dos animais dos grupos GS e GA, mostraram resultados compatíveis com fêmeas castradas.

Figura 1 – Fotografia mostrando o procedimento da citologia vaginal realizada nos animais dos grupos Sedentário e Atleta

4.2.4 Eutanásia dos Animais

O protocolo de eutanásia dos animais foi submetido à Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (Protocolo nº. 1262/2007).

Ao término do período de doze semanas de treinamento físico, após 12 horas de jejum, os animais dos GC, GS, GA, já com 9 meses de idade foram pesados novamente e eutanasiados com dose excessiva do anestésico Tiopental sódico (Sigma[®], USA- 40 mg/Kg de peso corpóreo) por injeção letal via intraperitoneal.

4.3 MICROSCOPIA DE LUZ

Após a anestesia, os animais foram então manipulados em prancha de resina. Depois da toracotomia, por meio de uma incisão mediana na parede torácica, os corações de 5 animais de cada grupo foram então perfundidos através do ventrículo esquerdo com solução salina tamponada fosfatada (PBS, Sigma[®], USA) a 0,1M e pH 7,4 e heparina a 2% (Roche[®], BRA) para a lavagem do sistema arterial e venoso para manter os espécimes livres de resíduos. A seguir, as peças foram pré-fixadas em solução fixadora de paraformaldeído a 40% e posterior fixação na mesma solução por 42 horas.

4.3.1 Coleta e Preparação do Material Para Análise em Microscópio de Luz

Os corações foram retirados, seccionando-se os vasos da base próximos ao órgão, e posteriormente fez-se a separação dos átrios dos ventrículos e separação do ventrículo esquerdo do direito. Os ventrículos esquerdos foram então pesados em balança analítica digital de acurácia de 0,001g, utilizando o método de Scherle (1970), por imersão em solução salina fisiológica dentro de um Becher, suspensos por um fio sem tocar as paredes do recipiente. Esse procedimento foi utilizado para obter o volume do ventrículo esquerdo pois como é conhecido $V_{[ve]} = P_{[ve]} / P_{(especifico)}$. Como $P_{(especifico)}$ da solução salina utilizada é aproximadamente igual a 1,0048, então podemos considerar: $V_{[ve]} = P_{[ve]}$.

Da camada compacta da parede livre de cada ventrículo foram retirados fragmentos do miocárdio. Para tal, usou-se o método *ortotrip* (WEIBEL, 1979). Assim, foram obtidos cortes aleatórios e uniformemente isotrópicos. Esses fragmentos foram lavados em água destilada, desidratados em etanol 70%, 95% e 100%, diafanizados em xilol e incluídos em Paraplast formando blocos. Destes blocos foram obtidos 10 pares de cortes histológicos com 3 µm de espessura, que foram coletados em lâminas histológicas e corados através dos seguintes métodos:

- Hematoxilina-Eosina (HE), para análise da quantificação dos cardiomiócitos, ou seja, análise da densidade de volume dos cardiomiócitos, do tecido

conjuntivo e dos vasos intramiocárdicos, determinação do comprimento dos vasos intramiocárdicos e determinação da densidade numérica dos núcleos dos cardiomiócitos.

- Picrosirius F3BA (JUNQUEIRA et al., 1979) para quantificação de colágeno. As fibras colágenas foram examinadas por meio de microscópio dotado de luz polarizada, processo no qual as fibras colágenas são visíveis por sua coloração e birrefringência intensa.

4.3.2 Análise Morfométrica e Estereológica

De cada ventrículo esquerdo, foram isolados dois fragmentos de aproximadamente 0,5cm os quais foram submetidos ao tratamento rotineiro para inclusão em Paraplast e obtenção de cortes histológicos. Foi realizado estudo morfométrico e estereológico utilizando-se um sistema digital de processamento e análise de imagens em computador, do Laboratório de Anatomia da FMVZ. O sistema consiste de microscópio Leica DMR[®], ao qual está acoplada uma microcâmera de vídeo Sony que capta as imagens das lâminas histológicas e as transmite para um computador equipado com processador Pentium IV e placa digitalizadora. A análise foi realizada em imagens digitalizadas, de maneira semi-automática, com programa de análise Leica. Foram utilizados 15 campos aleatórios por animal no qual os seguintes parâmetros foram analisados:

4.3.2.1 Densidade de Volume dos Cardiomiócitos, do Tecido Conjuntivo e dos Vasos Intramiocárdicos

A fração do volume ocupado pela estrutura de interesse em relação ao volume total (volume referência) é expressa pela densidade de volume. Para estimar a densidade de volume (V_v) dos cardiomiócitos, do tecido conjuntivo e dos vasos intramiocárdicos, um sistema teste composto por pontos equidistantes, sistemática e uniformemente alocados, foi sobreposto

aleatoriamente sobre as fotomicrografias das secções de referência usadas para estimar a densidade numérica, utilizando a objetiva de 40 vezes (Figura 2). Após esse procedimento, o número total de pontos que sobrepuseram o espaço referência – cardiomiócitos (V_v [cardiomiócito]), interstício (V_v [interstício]) e vasos intramiocárdicos (V_v [vasos]), foram contados (Equação 1). A equação utilizada para estimar a densidade de volume é dada por:

$$V_v \text{ [estrutura]} = Pp \text{ [estrutura]} / P_T$$

Equação 1

Sendo V_v (c, i, v) a densidade de volume; Pp (c, i, v) o número de pontos sobre as estruturas (cardiomiócitos, interstício ou vasos intramiocárdicos) e P_T o número total de pontos do sistema teste que tocam as estruturas.

Figura 2 – Fotomicrografia representando a estimativa da densidade de volume do miocárdio do ventrículo esquerdo, com sobreposição de um sistema teste composto por pontos equidistantes entre si. Neste exemplo 92 pontos tocam as cardiomiócitos, 8 pontos tocam o interstício e 4 pontos tocam vasos intramiocárdicos

4.3.2.2 Densidade de Comprimento dos Vasos Intramiocárdicos

Para estimar a densidade de comprimento dos vasos intramiocárdicos utilizou-se um frame, que foi sobreposto as fotomicrografias das secções de referência, utilizando objetiva de 40 vezes. Após esse procedimento, o número de vasos intramiocárdicos encontrados na área do frame foram contados (Equação 2). A densidade de comprimento dos vasos intramiocárdicos foi estimada por:

$$L_v = 2 Q_A$$

Equação 2

Sendo L_v a densidade de comprimento dos vasos intramiocárdicos e Q_A o número de vasos por área.

4.3.2.3 Densidade Numérica dos Núcleos dos Cardiomiócitos

A densidade numérica dos núcleos dos cardiomiócitos foi estimada pelo método *disector* (STERIO, 1984), utilizando 30 pares de *disectors*, por animal, tomados ao acaso. Este método tem sido utilizado por muitos pesquisadores em quantificações estereológicas do miocárdio (ÁQUILA et al., 1998). O *disector* óptico foi construído por duas secções paralelas e sequenciais de 3µm de espessura, utilizando objetiva de 40 vezes para captação das fotomicrografias. Os planos look up e look down foram determinados sobre um sistema teste com 2.500µm² e somente os cardiomiócitos identificados em foco no plano look up e não no look down, respeitando um sistema de inclusão e exclusão, segundo Gundersen (1977) como “unbiased counting frame”, foram contados (Figuras 3 e 4).

A densidade numérica (N_v [cardiomiócito]) foi obtida através da soma dos núcleos dos cardiomiócitos na área teste, vistos no plano superior do corte (ΣQ^-) obtido pela somatória dos volumes do *disector* ($V_{(dis)}$) (Equação 3).

O volume de cada *disector* representa a área do frame ($A_t = 15.625 \mu m^2$) pela espessura de microtomia ($3 \mu m$) (Equação 4).

$$N_v = \Sigma Q^- / \Sigma V$$

Equação 3

$$V_{(dis)} = A_t \times t$$

Equação 4

N_v [cardiomiócito] = $Q^-/\text{disector}$, sendo Q^- o número de núcleos no plano look up e *disector* como já explicado, é o volume do *disector* calculado pelo produto da área do frame ($A_t = 15.625 \mu m^2$) pela espessura do corte ($3 \mu m$).

Figura 3(A-B) – Esquema mostrando a estimativa de células, e aplicação de um sistema teste, com método disector. Em A: secção "look up", as células contidas dentro de um sistema teste, com linhas de inclusão (pontilhadas) e exclusão (contínuas), B: secção "look down", células contidas na mesma área da A. Na comparação de A e B (disector), é possível observar células que desaparecem (representadas em vermelho), em número de quatro

Figura 4 (A-F) – Fotomicrografia da secção "look up" e "look dow" do miocárdio do ventrículo esquerdo (A-B) do animal do GC; (C-D) do animal do GS; (E-F) do animal do GA. As setas indicam os núcleos dos cardiomiócitos presentes na secção "look up" e ausentes na secção "look dow", HE, aumento 40x

4.3.2.4 Número Total de Núcleos de Cardiomiócitos

O número total de núcleos de cardiomiócitos foi estimado pelo produto de N_v [cardiomiócito] pelo volume do ventrículo esquerdo ($V_{[ve]}$) obtido pelo método de Scherle (1970).

$$N_t = N_v \text{ [cardiomiócito]} \times V_{[ve]}$$

Equação 5

4.3.2.5 Densidade Numérica do Colágeno

A densidade numérica do colágeno expressa a fração da área ocupada pela estrutura de interesse (colágeno) pela área total do campo. Utilizando um sistema de análise de imagem dotado de um programa para quantificação de estruturas (KS400 Zeiss) foram obtidas, sob luz polarizada, a densidade numérica do colágeno em cada um dos quinze campos analisados, para cada corte, e cada animal. As médias e os desvios-padrões foram calculados para cada grupo e comparados estatisticamente.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram calculadas as médias de cada variável para cada unidade experimental (rato). As comparações estatísticas foram feitas com estas médias através do ANOVA para a análise de variância e em casos de identificação de efeitos significativos ($P < 0,05$), utilizou-se o teste de Tukey. Foram testados os efeitos das variáveis: exercício (corrida e sedentarismo), deprivação de hormônios e a interação exercício x deprivação sobre as medidas já citadas.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho encontram-se apresentados e sistematizados nas seguintes etapas: atividade física, peso dos animais, resultados das análises morfométricas e estereológicas.

5.1 ATIVIDADE FÍSICA

Os resultados obtidos pelos animais nos TEMs encontram-se apresentados na tabela 1. A comparação entre as médias da velocidade máxima alcançada no teste de esforço dos animais dos grupos GC, GS e GA, foram calculadas a partir dos TEMs (Figura 5).

Figura 5 - Os dados da figura mostram a velocidade máxima média obtida nos GC, GS e GA

No GC, a comparação estatística das médias das velocidades nos TEMs realizados pelos animais deste grupo, mostrou diferença significativa ($P < 0.05$), ou seja, as velocidades médias do 1TEM e 2TEM foram maiores do que do 3TEM, (Tabela 1).

Para os animais do GS, a comparação estatística das médias das velocidades nos TEMs

realizados, não mostrou diferença significativa ($P>0.05$) (Tabela 1).

Quanto aos valores referentes à velocidade média dos animais do GA, a comparação estatística das médias das velocidades nos TEMs realizados, neste grupo mostrou significância ($P<0,01$). Os valores das médias das velocidades do 2TEM foram significativamente maiores que do 1TEM (Tabela 1).

A comparação entre os valores das médias do 1TEM entre os grupos, não mostrou significância ($P>0.05$) (Tabela 1).

Os valores das médias comparadas entre os grupos no 2TEM, mostraram diferenças significantes ($P<0,01$). As médias das velocidades do 2TEM do GC e GS foram menores do que do GA (Tabela 1).

A comparação entre os valores das médias no 3TEM entre os grupos, mostrou significância ($P<0,05$). As velocidades médias do 3TEM no grupo GA foram significativamente maiores que no GC (Tabela 1).

Tabela 1 - Demonstrativo das velocidades médias em cada TEM, seguidos pelo desvio padrão e significância estatística - São Paulo – 2008

TEM	GC	GS	GA
1TEM	0,93 $\pm$ 0,25 ^a	0,63 $\pm$ 0,25	0,82 $\pm$ 0,21
2TEM	0,9 $\pm$ 0,22 ^{***a}	0,78 $\pm$ 0,22 [#]	1,38 $\pm$ 0,31 ^{**}
3TEM	0,67 $\pm$ 0,13 ^b	0,95 $\pm$ 0,36	1,08 $\pm$ 0,31 [*]

** Significante em relação ao 1TEM no grupo GA ($P<0,01$); *** Significante em relação ao grupo GA no 2TEM ($P<0,01$); # Significante em relação ao grupo A no 2TEM ($P<0,001$); *Significante em relação ao grupo GC no 3TEM($P<0,05$). Letras diferentes em uma mesma coluna mostram diferença significativa ($P<0,05$).

As médias das velocidades de treinamento para o GA com 60% da velocidade máxima, e da atividade física realizada para o GC e GS com 30% da velocidade média, para os três meses de treinamento estão mostrados na figura 6.

Figura 6 - Os dados da figura mostram a média das velocidades do treinamento do GA e da atividade nos grupos C e S nos três meses do experimento

5.2 PESO CORPÓREO

No pré-operatório, ou seja, antes dos testes de esforço máximo (1TEM, 2TEM, 3TEM) e antes da eutanásia, como já citado, os animais foram pesados. Sendo assim, foram cinco medições para cada um dos grupos GC, GS, GA. As médias dos pesos dos animais dos GC, GS e GA estão apresentados na figura 7 e na tabela 2.

Figura 7 - Médias das pesagens obtidas no pré-operatório, em cada um dos três testes de esforço máximo e no dia da eutanásia, para os animais dos grupos C, S e A.

No GC, a comparação estatística das médias do pré-operatório e no dia da eutanásia não mostrou diferença significativa ($P>0,05$) (Tabela 2).

No GS, a comparação estatística das médias do pré-operatório e no dia da eutanásia para este grupo, mostrou diferença significativa ($P<0,05$). Ou seja, os pesos dos animais ao final do experimento foram significativamente maiores do que no início (Tabela 2).

Nos animais do GA, a comparação estatística das médias do pré-operatório e no dia da eutanásia mostrou diferença significativa ($P<0,01$). Ou seja, do início ao final do experimento, ganharam peso significativamente (Tabela 2).

A comparação entre os valores das médias dos pesos entre os grupos tanto no pré-operatório como ao final do experimento, não mostrou diferença significativa entre eles ($P>0,05$), (Tabela 2).

Tabela 2 - Demonstrativo das médias das pesagens dos animais dos diferentes grupos estudados, seguidas pelo desvio padrão e significância estatística - São Paulo – 2008

Pesagens	GC	GS	GA
Pré-operatório	234,37 ± 22,07	229,75 ± 29,12	228,75 ± 22,97
1TEM	235 ± 22,03	231,75 ± 23,16	232 ± 25,47
2TEM	235,5 ± 19,61	250,75 ± 31,90	252,75 ± 20,36
3TEM	252,75 ± 49,98	262,75 ± 34,32	249,25 ± 22,72
Eutanásia	237 ± 29,45	273,75 ± 36,58*	263,5 ± 23,12**

*Significante em relação ao pré-operatório no GS; **Significante em relação ao pré-operatório no GA.

5.3 Volume do Ventrículo Esquerdo

Após a retirada dos corações da cavidade torácica, como já citado, foi feito a separação dos ventrículos de cada animal dos GC, GS e GA e o ventrículo esquerdo foi pesado pelo método de Scherle (1970). As médias dos volumes do ventrículo esquerdo, que correspondem aos volumes como explicado, dos animais dos grupos citados estão apresentados na figura 8 e na tabela 3.

Figura 8 – Volume do ventrículo esquerdo dos cinco animais de cada grupo estudado (GC, GS, GA) obtidos pelo método de Scherle (1970).

A comparação estatística dos valores das médias do volume do ventrículo esquerdo nos grupos GC, GS e GA não mostrou significância ($P>0,05$) (Tabela 3).

A ooforectomia causou uma diminuição embora não significante, no volume do ventrículo esquerdo dos animais do GS e GA. A atividade física parece não ter alterado este resultado.

Tabela 3 - Demonstrativo das médias do volume do ventrículo esquerdo nos diferentes grupos estudados, seguido pelo Erro Padrão da Média (EPM) e significância estatística - São Paulo - 2008

Volume do Ventrículo Esquerdo						
Animal						
Grupo	1	2	3	4	5	Média±EPM
Controle	1,272	1,111	0,870	0,877	0,838	0,994±0,085
Sedentário	0,733	0,885	0,885	0,906	0,848	0,851±0,031
Atleta	0,887	0,762	0,811	0,864	0,767	0,818±0,025

5.4 RESULTADOS DAS ANÁLISES MORFOMÉTRICA E ESTEREOLÓGICA

A figura 9 mostra o aspecto do miocárdio nos cortes histológicos do ventrículo esquerdo dos animais dos 3 grupos estudados, corados pela HE. Nestas figuras pode ser observada a distribuição dos cardiomiócitos no miocárdio.

Figura 9 – Cortes histológicos do miocárdio do ventrículo esquerdo mostrando os cardiomiócitos e interstício (setas) e vasos intramiocárdicos (VI) nos três grupos estudados (GC, GS e GA) HE; barra=40 μ m

5.4.1 Densidade de Volume dos Cardiomiócitos, do Tecido Conjuntivo e dos Vasos Intramiocárdicos

A tabela 4 mostra o resultado da análise da densidade de volume dos cardiomiócitos, do tecido conjuntivo e dos vasos intramiocárdicos, bem como a média da densidade de volume total das estruturas no GC, GS, GA.

A comparação estatística dos valores das médias da densidade de volume dos cardiomiócitos no miocárdio do ventrículo esquerdo, para o GC, GS e GA não mostrou diferença significativa ($P>0,05$), (Tabela 4).

A densidade de volume do tecido conjuntivo para o GC, GS e GA também não mostrou diferença significativa ($P>0,05$), (Tabela 4).

As médias da densidade de volume dos vasos intramiocárdicos no ventrículo esquerdo do grupo GC foi significativamente maior que do GS e GA, (Tabela 4). A ooforectomia causou uma diminuição na densidade de volume dos vasos intramiocárdicos. A atividade física parece não ter influenciado neste resultado.

Tabela 4 – Demonstrativo das médias (%) da densidade de volume de cardiomiócitos, interstício e vasos intramiocárdicos nos diferentes grupos estudados, seguidos pelo Erro Padrão de Média (EPM) e significância estatística - São Paulo - 2008

Densidade de Volume							
Animal							
Grupo	DV	1	2	3	4	5	Média±EPM
Controle	Vvc	75,97	76,6	76,64	81,03	78,14	77,67 ± 0,91
	Vvi	21,08	20,85	21,25	16,35	19,09	19,72± 0,92
	Vvv	2,74	2,48	1,96	2,49	2,16	2,36± 0,13*
Sedentário	Vvc	75,72	73,89	75,39	64,83	78,58	73,68 ±2,34
	Vvi	22,49	24,2	23,4	30,4	20,47	24,19±1,67
	Vvv	1,67	1,78	1,02	1,75	0,85	1,41±0,20
Atleta	Vvc	75,36	73,64	80,79	80,58	77,24	77,52±1,41
	Vvi	23,41	21,83	18,4	18,41	18,66	20,14± 1,04
	Vvv	1,1	2,09	0,69	0,92	0,67	1,09±0,26**

* Significante em relação ao GS ($P<0,05$); ** Significante em relação ao GC ($P<0,01$).

5.4.2 Densidade de Comprimento dos Vasos Intramiocárdicos

A tabela 5 mostra o resultado da análise da densidade de comprimento dos vasos intramiocárdicos, bem como a média da densidade de comprimento total dos vasos no GC, GS, GA.

A comparação estatística dos valores das médias da densidade de comprimento dos vasos intramiocárdicos do ventrículo esquerdo, para o GC, GS e GA não mostrou diferença significativa ($P>0,05$), (Tabela 5).

A atividade física parece ter causado uma discreta diminuição na densidade de comprimento dos vasos intramiocárdicos, porém não significativa. A ooforectomia parece não ter influenciado neste resultado.

Tabela 5 - Demonstrativo das médias da densidade de comprimento (L_v) dos vasos intramiocárdicos dos diferentes grupos estudados, seguidos pelo Erro Padrão da Média (EPM) e significância estatística – São Paulo – 2008

Densidade de Comprimento dos Vasos Intramiocárdicos						
	Animal					
Grupo	1	2	3	4	5	Média±EPM
Controle	3,52	3,2	4,6	3,32	4	3,73± 0,26
Sedentário	2,92	4,2	4,2	4,26	3,8	3,87± 0,25
Atleta	3,86	5,34	2,4	3,0	2,6	3,44± 0,54

5.4.3 Densidade Numérica dos Núcleos dos Cardiomiócitos

A tabela 6 mostra o resultado da análise da densidade numérica dos núcleos dos cardiomiócitos bem como as médias das densidades de comprimento total dos cardiomiócitos no GC, GS, GA.

A comparação estatística dos valores das médias da densidade numérica dos núcleos dos cardiomiócitos nos GC, GS e GA não mostrou diferença significativa ($P>0,05$), (Tabela 6).

É possível que o aumento da densidade numérica dos núcleos dos cardiomiócitos, embora não significativa, nos animais dos grupos GS e GA ocorreu devido à presença de células binucleadas ou por variações que ocorreram ao acaso.

Tabela 6 - Demonstrativo das médias da densidade numérica dos núcleos dos cardiomiócitos nos diferentes grupos estudados, seguidos pelo Erro Padrão da Média (EPM) e significância estatística – São Paulo – 2008

Densidade Numérica dos Núcleos dos Cardiomiócitos						
	Animal					
Grupo	1	2	3	4	5	Média±EPM
Controle	3,47x10 ⁻³	2,92 x10 ⁻³	3,90 x10 ⁻³	3,66 x10 ⁻³	3,49 x10 ⁻³	3,48x10 ⁻³ ± 0,16
Sedentário	3,73 x10 ⁻³	4,13 x10 ⁻³	4,77 x10 ⁻³	4,05 x10 ⁻³	3,86 x10 ⁻³	4,11x10 ⁻³ ±0,18
Atleta	4,05 x10 ⁻³	2,38 x10 ⁻³	3,92 x10 ⁻³	4,03 x10 ⁻³	5,05 x10 ⁻³	3,88x10 ⁻³ ±0,43

5.4.4 Número Total de Núcleos de Cardiomiócitos

A tabela 7 mostra o resultado da análise do número total dos núcleos dos cardiomiócitos bem como a média do número total dos núcleos de cardiomiócitos no GC, GS, GA.

A comparação estatística dos valores das médias do número total de núcleos de cardiomiócitos nos três grupos estudados não mostrou significância ($P>0,05$) (Tabela 7).

A atividade física parece não ter influenciado no número total de núcleos de cardiomiócitos e, da mesma forma, a ooforectomia parece não ter influenciado neste resultado.

Tabela 7 - Demonstrativo das médias do número total de núcleos dos cardiomiócitos nos diferentes grupos estudados, seguidos pelo Erro Padrão da Média (EPM) e significância estatística – São Paulo – 2008

Número Total de Núcleos de Cardiomiócitos						
Animal						
Grupo	1	2	3	4	5	Média±EPM
Controle	4,41 x10 ⁻³	3,24 x10 ⁻³	3,39 x10 ⁻³	3,21 x10 ⁻³	2,92 x10 ⁻³	3,43x10 ⁻³ ±0,26
Sedentário	2,73 x10 ⁻³	3,65 x10 ⁻³	4,22 x10 ⁻³	3,67 x10 ⁻³	3,27 x10 ⁻³	3,51x10 ⁻³ ±0,25
Atleta	3,59 x10 ⁻³	1,81 x10 ⁻³	3,18 x10 ⁻³	3,48 x10 ⁻³	3,87 x10 ⁻³	3,19x10 ⁻³ ±0,36

5.4.5 Densidade Numérica de Colágeno

A figura 10 mostra o aspecto das fibras colágenas em cortes histológicos do miocárdio do ventrículo esquerdo, corados pelo Picrossirius e examinados à luz polarizada, nos três grupos estudados.

Figura 10 – Cortes histológicos do miocárdio do ventrículo esquerdo mostrando a distribuição das fibras colágenas nos três grupos estudados (GC, GS e GA); Picrosirius; barra= 40μm

A tabela 8 mostra o resultado da análise da densidade numérica de colágeno nos GC, GS e GA.

A comparação estatística dos valores das médias da densidade numérica de colágeno, para o GC, GS e GA não mostrou significância ($P>0,05$), (Tabela 8).

A ooforectomia parece ter causado um aumento na densidade numérica do colágeno. A atividade física parece não ter influenciado neste resultado.

Tabela 8 - Demonstrativo das médias da densidade numérica (nº/área) de colágeno no interstício do miocárdio dos diferentes grupos estudados, seguidos pelo Erro Padrão da Média (EPM) e significância estatística – São Paulo – 2008

Densidade de Numérica de Colágeno						
Animal						
Grupo	1	2	3	4	5	Média±EPM
Controle	14.017	9.036	7.300	13.250	12.257	11,3±1,22
Sedentário	14.881	10.405	12.111	14.141	6.830	11,6± 1,44
Atleta	9.803	8.907	15.253	17.1067	8.248	11,8± 1,80

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Para melhor compreensão, os resultados da discussão serão apresentados segundo os mesmos itens utilizados no capítulo de resultados: atividade física, peso dos animais, volume do ventrículo esquerdo e análise morfométrica e estereológica.

6.1 ATIVIDADE FÍSICA

Os dados que obtivemos demonstram que os resultados dos animais do GA no 3TEM foram significativamente maiores do que do GC (61%). Nesse 3TEM houve uma pequena queda no rendimento do GA, e, portanto, não houve significância em relação ao GS. Os resultados mostram uma diminuição no desempenho dos animais do GC ao final do 3TEM (39%), enquanto que em relação ao 2TEM, o GA obteve o seu melhor rendimento (68%), confirmado quando realizada a comparação com os animais dos outros dois grupos, que mostrou um melhor resultado para o GA em relação ao GC e GS (53% e 77% respectivamente).

Notamos então, de acordo com os resultados que obtivemos que o treinamento fez com que houvesse um condicionamento físico no GA em relação ao GC e GS. De acordo com Irigoyen et al. (2005), também demonstraram que o treinamento em que ratas ooforectomizadas foram submetidas produziu um eficaz condicionamento físico e aumento da capacidade aeróbica fisiológica. Estes resultados contradizem alguns autores quando relatam que a menopausa pode representar uma importante causa para a depreciação da capacidade de realização de exercício (MERCURO et al., 2006).

6.2 PESO DOS ANIMAIS

Os dados obtidos no decorrer do experimento, quanto ao peso dos animais estudados, mostram que a ooforectomia nas ratas do GS e GA contribuiu para o ganho de peso. O ganho

de peso do GS foi de 19% e do GA de 15%. Não houve diferença entre estes dois últimos grupos quanto a este aspecto. O ganho de peso dos animais de ambos os grupos pode ser explicado pela deficiência do estrógeno devido à ooforectomia. Christgau et al. (2004), e Irigoyen et al. (2005), também demonstraram aumento de peso em ratas após a ooforectomia. Estudos recentes comparando mulheres na pré-menopausa, na peri-menopausa e na pós-menopausa e os efeitos do climatério no peso corporal e na distribuição de gordura, mostrou que o peso corporal e a massa corpórea foram significativamente maiores em mulheres na peri-menopausa e na pós-menopausa do que na pré-menopausa. A média total de gordura corporal dos tecidos moles foi significativamente maior na peri-menopausa e na pós-menopausa do que na pré-menopausa (GENAZZANI; GAMBACCIANI, 2006).

É provável que o valor um pouco menor do ganho de peso dos animais do GA seja devido ao efeito da atividade física, onde as fontes de energia são mobilizadas e tendem a liberar glucagon, cortisol, testosterona e hormônio de crescimento que é benéfico para a manutenção e aquisição da massa muscular (BRACCO, 2002). Segundo a OMS (2003) os exercícios físicos possuem a função de aumentar o gasto energético levando ao desequilíbrio calórico negativo ou a manutenção do metabolismo basal o que contribui para a perda de peso corporal. Para se preservar o peso corpóreo é necessário um treinamento adequado, dentro dos padrões e limites estabelecidos pelo próprio indivíduo (ASIKAINEN et al., 2004). Para pessoas sedentárias e com sobrepeso, mesmo na menopausa, um programa de exercícios de carga moderada, mostrou ser significativo para a redução da gordura corporal total e peso corporal (IRWIN et al., 2003).

Os dados obtidos dão a entender que a ooforectomia induziu a um aumento de peso e que o exercício físico não interferiu de maneira significativa nesses resultados. É possível também que o tipo e a intensidade do exercício não tenham sido suficientes para alterar os resultados obtidos nesta pesquisa.

Em contrapartida, Irigoyen et al. (2005), demonstraram que houve uma redução de peso corporal em ratas treinadas ooforectomizadas e Asikainen et al. (2004), demonstraram em 9 estudos realizados com mulheres pós-menopausa, melhora no peso corporal após treinamento físico. Fisher et al. (1998, 2000), relataram que a ooforectomia aumenta a liberação do hormônio do crescimento e a ingestão alimentar, mas irá provocar uma diminuição da atividade espontânea na gaiola, o que faz com que aumente o peso corporal em animais operados.

6.3 VOLUME DO VENTRÍCULO ESQUERDO

O efeito da ooforectomia no volume do ventrículo esquerdo de acordo com os dados que obtivemos demonstram que as ratas dos GS e GA tiveram uma diminuição deste volume após a ooforectomia. A perda de volume do ventrículo esquerdo do GS foi de 16% e do GA de 8%. Não houve diferença entre estes dois últimos grupos quanto a este aspecto. A diminuição do volume do ventrículo esquerdo dos animais de ambos os grupos pode ser explicada pela deficiência do estrógeno devido a ooforectomia realizada nestes dois grupos, e a atividade física parece ter também contribuído para otimizar o resultado. Em contrapartida, Kaminski et al. (2007), em um estudo realizado com ratos submetidos ao exercício físico sugeriram haver uma influência significativa no volume dos corações dos animais treinados em relação aos animais sedentários. Hayward et al. (2000), em um estudo com ratos machos e fêmeas gonadectomizados demonstrou que a gonadectomia induziu um aumento do tamanho ventricular por grama de peso corpóreo e que a terapia de reposição hormonal aumenta o volume do coração.

6.4 ANÁLISES MORFOMÉTRICA E ESTEREOLÓGICA

6.4.1 Densidade de Volume dos Cardiomiócitos, do Tecido Conjuntivo e dos Vasos Intramiocárdicos

Os resultados obtidos sobre o efeito da ooforectomia na densidade de volume dos vasos intramiocárdicos demonstram que as ratas dos GS e GA tiveram uma diminuição na densidade de volume desses vasos quando comparadas ao GC. A perda da densidade de volume dos vasos do GS foi de 40% e do GA de 54% em relação ao GC. Não houve diferença entre estes dois últimos grupos quanto a este aspecto. Marques et al. (2006), em um estudo realizado com ratas ooforectomizadas e submetidas à atividade física mostrou que a ooforectomia induziu a um aumento de cardiomiócitos e de tecido conjuntivo e causou uma diminuição da vascularização, sendo que a densidade de volume do tecido conjuntivo era

significativamente menor no grupo treinado e ooforectomizado comparado com o grupo sedentário ooforectomizado. Hayward et al. (2000), ainda sugeriram em um estudo com animais machos e fêmeas gonadectomizados que a reposição hormonal (pogesterona/estrógeno) reduz o suprimento capilar e aumenta a área intersticial. Weber (1989) e Weber e Brilla (1991), atestam que o volume ocupado pelos cardiomiócitos é cerca de $\frac{2}{3}$ do miocárdio e o tecido intersticial ocupa $\frac{1}{3}$ do miocárdio.

Pinheiro et al. (2006), revela que o exercício e as contrações musculares criam um estímulo poderoso para a remodelação da estrutura vascular e, o aumento do estresse é um dos principais estímulos para o alargamento do lúmen dos vasos.

6.4.2 Densidade de Comprimento dos Vasos Intramiocárdicos

Os resultados que obtivemos sobre o efeito da atividade física na densidade de comprimento dos vasos intramiocárdicos demonstram que as ratas dos GA tiveram uma diminuição na densidade de comprimento dos vasos intramiocárdicos quando comparadas ao GC e GS. A perda da densidade de comprimento dos vasos do GA foi de 8% , em relação ao GC e 11% em relação ao GS. A diminuição da densidade de comprimento dos vasos dos animais do GA pode ser explicada pela atividade física a que foram submetidas. Nosso resultado contradiz alguns autores que sugerem que a densidade de comprimento das artérias intramiocárdicas era significativamente maior nas ratas treinadas do que nas sedentárias (MARQUES et al., 2006).

Pinheiro et al. (2006), em um estudo realizado com ratos obesos hipertensos submetidos a atividade física, sugerem que a atividade física influencia a densidade de volume do tecido conjuntivo e a densidade de comprimento das artérias intramiocárdicas mais intensamente que a obesidade.

6.4.3 Densidade Numérica dos Núcleos dos Cardiomiócitos

Segundo Marques et al. (2006), a maior consequência da ooforectomia foi a grande perda de cardiomiócitos em ratas com hipertensão espontânea sendo que o exercício diminuiu esse processo.

Pinheiro et al. (2006), demonstram em seu estudo que na hipertensão com obesidade induzida houve uma remodelação adversa do miocárdio, reduzindo o número de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo devido a atividade física

Em nosso estudo não encontramos diferença significativa entre os valores do número de cardiomiócitos dos 3 grupos (GC, GS, e GA). Portanto, nem a ooforectomia, nem a realização de exercício físico, tiveram algum efeito sobre o número de cardiomiócitos do miocárdio.

6.4.4 Número Total de Núcleos de Cardiomiócitos

Um trabalho realizado em animais hipertensos mostrou que o número da área seccional de cardiomiócitos era maior nos animais do grupo sedentário ooforectomizados quando comparado com o grupo treinado ooforectomizado. O protocolo de treinamento induziu um aumento significativo de número de núcleos de cardiomiócitos em ratas com atividade física. No entanto esse número era significativamente menor que os correspondentes valores nos animais sedentários ooforectomizados (MARQUES et al., 2006).

No presente estudo, o número total de núcleos dos cardiomiócitos nos animais do GA foi 9% menor quando comparado com os animais do GS.

Marques et al. (2006), ainda relataram que o número de núcleos de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo em ratas sedentárias era significativamente menor do que nos treinados e era significativamente menor nas ratas ooforectomizadas do que nas ratas não operadas. Em contrapartida, nosso estudo demonstrou que a atividade física parece ter causado uma diminuição no número total de núcleos de cardiomiócitos nos animais submetidos a exercício. A ooforectomia parece não ter influenciado neste resultado.

6.4.5 Densidade Numérica de Colágeno

Segundo Sanches-Quintana et al. (1996), o colágeno é o maior componente da matriz do tecido conjuntivo intramiocárdico, e seu aumento pode ser observado em corações não normais. De acordo com Sommer et al.¹ (1987 apud FONTINELE, 2008, p. 73), as propriedades físicas, bioquímicas, biomecânicas e fisiológicas do colágeno são modificadas pelo exercício.

Os resultados do efeito da ooforectomia na determinação da densidade numérica de colágeno que obtivemos demonstram que as ratas do GA tiveram um discreto aumento (não significativo), na densidade numérica do colágeno quando comparado com os animais do GC. O aumento da densidade numérica do colágeno do GA foi de 5% em relação ao GC e apenas 2% em relação ao GS. O aumento da densidade numérica do colágeno dos animais do GA pode ser explicado pela ooforectomia a qual foram submetidas. A atividade física parece não ter influenciado neste resultado.

A análise da densidade de colágeno mostrou um discreto aumento (não significativo) na densidade numérica de colágeno nos animais ooforectomizados, pois houve aumento no GS (4%) em relação ao GC.

A presença do estrógeno parece ser fundamental para o equilíbrio estrutural cardíaco; portanto, quando há diminuição na produção de estrógeno, ocorre maior produção do colágeno. Christgau et al. (2004), apontaram um aumento significativo nos níveis de marcadores de degradação dos colágenos tipo I e II em ratas ooforectomizadas, mostrando uma alta remodelação do colágeno.

Medugorac (1983), mostrou que o tecido intersticial do ventrículo esquerdo dos ratos contém normalmente cerca de 2,2% de colágeno. Weber (1991), relatou que a concentração de colágeno do ventrículo direito é 30% maior que no ventrículo esquerdo devido ao menor tamanho dos cardiomiócitos. Porém, o conteúdo de colágeno miocárdico pode ser substancialmente alterado em certas doenças miocárdicas. Acredita-se que alterações na

¹ SOMMER, H. M. The biochemical and metabolic effect of a running regime on the Achilles tendon in the rat. *Orthopaedics*, v. 11, p. 71-75, 1987.

distribuição ou quantidade das fibras de colágeno podem afetar as propriedades mecânicas do músculo cardíaco.

Debessa et al. (2001), e Werzár (1969), notaram em humanos, aumento do colágeno miocárdico com a idade e sugerem que este aumento pode contribuir para a diminuição da elasticidade ventricular. A perda de miócitos poderia ser uma causa da acumulação de colágeno, pois células perdidas são substituídas por colágeno.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Após análise dos resultados que obtivemos no presente estudo, sobre os efeitos da ooforectomia e do exercício físico no miocárdio de rato Wistar, podemos concluir que:

- ✓ A ooforectomia contribui para um aumento de peso em ratas de laboratório mesmo com um treinamento físico com intensidade submáxima de 60%, com duração de 3 meses.
- ✓ O treinamento físico com duração de 3 meses, com intensidade submáxima de 60% é capaz de melhorar o desempenho físico de ratas ooforectomizadas.
- ✓ A deprivação de estrógeno provocou uma diminuição no volume do ventrículo esquerdo. A atividade física não influenciou esse resultado.
- ✓ A ooforectomia ocasionou uma diminuição relativa significativa da densidade de volume dos vasos intramiocárdicos. O exercício associado à ooforectomia não produziu este efeito.
- ✓ A atividade física provocou uma diminuição não significativa da densidade de comprimento dos vasos intramiocárdicos. A ooforectomia associada ao exercício não produziu este efeito.
- ✓ Tanto a atividade física como a ooforectomia não influenciaram no número total de núcleos de cardiomiócitos.
- ✓ A ooforectomia parece ter causado um discreto aumento na densidade numérica do colágeno. A atividade física parece não ter influenciado neste resultado.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, S. L.; ZORN, T. M.; MICHELINI, L. C. Exercise training normalizes wall-to-lumen ratio of the gracilis muscle arterioles and reduces pressure in spontaneously hypertensive rats. **J. Hypertens.**, v. 18, p. 1563-1572, 2000.
- ÁQUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; APFEL, M. I. R. Estereologia do miocárdio de ratos jovens e idosos. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 70, n. 2, p. 105-109, 1998.
- ASIKAINEN, T. M.; KUKKONEN-HARJULA, K.; MIILUNPALO, S. Exercise for health for early postmenopausal women: a systematic review of randomized controlled trials. **Sports Med.**, v. 34, n. 11, p. 753-778, 2004.
- BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2ª ed., São Paulo, Manole, p.362-364, 1991.
- BAR, J.; TEPPER, R.; FUCHS, M.; PARDO, J.; OVADIA, J. The effect of replacement therapy on platelet aggregation and ATP release in postmenopausal women. **Obstet. Gynecol.**, v. 81, p. 261-264, 1993.
- BARRET-CONNOR, E.; GRADY, D. Hormone replacement therapy, heart disease, and other considerations. **Annu. Rev. Public. Health**; v. 19, p. 55-72, 1998.
- BARRET-CONNOR, E.; BUSH, T. L. Estrogen and coronary heart disease in women. **JAMA**, v. 265, p. 1861-1867, 1991.
- BRACCO, M. M.; FERREIRA, M. B. R. MORCILLO, A. M.; COLUGNATI, F. J. J. Gasto energético entre crianças de escola pública obesas e não obesas. **Rev. Bras. Cienc. do Movimento**, v.10, n.3, p.29-35, 2002.
- BROWN, D. A.; JEW, K. N.; SPARAGNA, G. C.; MUSCH, T. I.; MOORE, R. L. Exercise training preserves coronary flow and reduces infarct size after ischemia-reperfusion in rat heart. **J. Appl. Physiol.**, v. 95, p. 2510-2518, 2003.
- CASIGLIA, E.; PALATINI, P.; DA ROS, S.; PAGLIARA, V.; PUATO, M.; DORIGATTI, F.; PAULETTO, P. Effects of blood pressure and physical activity on carotid artery intima-media thickness in stage 1 hypertensives and controls. **Am. J. Hypertens.**, v. 13, p. 1256-1262, 2000.
- CHRIST, M.; IANNELLO, C.; IANNELLO, P. G.; GRIMM, W. Effects of a weight reduction program with a without aerobic exercise in the metabolic syndrome. **Int. J. Cardiol.**, v. 97, p. 115-122, 2004.
- CHRISTGAU, S.; TANKÓ, L.; CLOOS, P.; MOURITZEN, U.; CHRISTIANSEN, C. M. D.; DELAISSÉ, J. M.; HOEGH, A. P. Suppression of elevated cartilage turnover in

postmenopausal women and ovariectomized rats by estrogen and selective estrogen receptor modulator (SERM). **Menopause**, v. 11, n. 5, p. 508-518, 2004.

COLDITZ, G. A.; WILLETT, W. C.; STAMPFER, M. J.; ROSNER, B.; SPEIZER, F. E.; HENNEKENS, C. H. Menopause and the risk of coronary heart disease in women. **N. Engl. J. Med.**, v. 316, p. 1105-1110, 1987.

DEBESSA, C. R. G.; MAIFRINO, L. B. M.; SOUZA, R. R.; Age related changes o the collagen network of the human heart. **Mech. Ageing Dev.**, v. 122, p. 1049-1058, 2001.

DISHMAN, R. K.; ARMSTRONG, R. B.; DELP, M. D.; GRAHAM, R. E.; DUNN, A. L. Open-field behavior is not related to treadmill performance in exercising rats. **Physiol. Behav.**, v. 43, p. 541-546, 1988.

DUAN, J.; ESBERG, L. B.; DAÍ, S.; ABERLE, N. S.; LOPEZ, F. L.; REN, J. Comparison of cardiac contractile and intracellular Ca²⁺ response between estrogen and phytoestrogen alpha- zearalanol in ventricular myocytes. **Endocrine**, v. 24, n. 1, p. 33-38, 2004.

ELWOOD, P. C.; SWEETNAM, P. M. Aspirin and secondary mortality after myocardial infarction. **Lancet**, v. 11, p. 1313-1315, 1979.

FARAG, N. H.; BARDWELL, W. A.; NELESEN, R. A.; DIMSDALE, J. E.; MILLS, P. J. Autonomic responses to psychological stress: the influence of menopausal status. **Ann. Behav. Med.**, v. 26, p. 134-138, 2003.

FIELDS, L. E.; BURT, V. L.; CUTLER, J. A.; HUGHES, J.; ROCCELA, E. J.; SORLIE, P. The burden of adult hypertension in the United States 1999 to 2000: a rising tide. **Hypertension**, v. 44, p. 398-404, 2004.

FISHER, J. S.; KOHRT, W. M.; BROWN, M. Food restriction suppresses muscle growth and augments osteopenia in ovariectomized rats. **J. Appl. Physiol.**, v. 88, p. 265-271, 2000.

FISHER, J. S.; HASSER, E. M.; BROWN, M. Effects of ovariectomy and hind limb unloading on skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.**, v. 85, p. 1316-1321, 1998.

FLECKNELL, P. Pain - assessment, alleviation and avoidance in laboratory animals. **ANZCCART News**, v. 12, n. 4, p. 1-10, 1999.

FONTINELE, R. G. **Efeitos da atividade física na estrutura da cartilagem articular do joelho de ratas ooforectomizadas**. 2008 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

FUSTER, V.; BADIMON, L.; BADIMON, J. J.; CHESEBRO, J. H. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. **N. Engl. J. Med.**, v. 326, p. 310-318, 1992.

GANONG, W. F. **Fisiologia médica**, 5. ed. São Paulo: Atheneu, 1989. p. 238.

GENAZZANI, A. R.; GAMBACCIANI, M. Effect of climacteric transition and hormone replacement therapy on body weight and body fat distribution. **Gynecol. Endocrinol.**, v. 22, n. 3, p. 145-150, 2006.

GARDNER, E.; GRAY, D. J.; O'RAHILLY, R. **Anatomia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1971. p. 325-345.

GOBBI, S. Atividade física para pessoas idosas e recomendações da Organização Mundial de Saúde de 1996. **Rev. Brás. de Atividade Física**, v. 2, n. 2, p. 41-49, 1997.

GOLDSTEIN, J.; LOCAIS, C. K.; TOTH, M. J. Progesterone stimulates cardiac muscle protein synthesis via receptor-dependent pathway. **Fertil. Steril.**, v. 82, n. 2, p. 430-436, 2004.

GROSS, M. L.; RITZ, E.; KORSCH, M.; ADAMCZAK, M.; WECKBACH, M.; MALL, G.; BERGER, A. I.; HANSEN, A.; AMANN, K.. Effects of estrogens on cardiovascular structure in uninephrectomized SHRsp rats. **Kidney Int.**, v. 67, n. 3, p. 849-857, 2005.

GUNDERSEN, H. J. G. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. **J. Microsc.**, v. 111, p. 219-223, 1977.

HAGBERG, J. M.; BROWN, M. D. Does exercise training play a role in the treatment of essential hypertension? **J. Cardiovasc. Risk**, v. 2, p. 296-302, 1995.

HAYWARD, C. S.; KELLY, R. P.; COLLINS, P. The roles of gender, the menopause and hormone replacement on cardiovascular function. **Cardiovasc. Res.**, v. 46, p. 28-49, 2000.

HERRINGTON, D. M. The HERS trial results: paradigms lost: heart and estrogen/progestin replacement study. **Ann. Intern. Med.**, v. 131, p. 463-466, 1999.

HINTZ, K. K.; WOLD, L. E.; COLLIGAN, P. B.; SCOTT, G. L.; LEE, K. J.; SOWERS, J. R.; REN, J. Influence of ovariectomy on ventricular myocyte contraction in simulated diabetes. **J. Biomed. Sci.**, v. 8, n. 4, p. 307-313, 2001.

HUNT, B. E.; TAYLOR, J. A.; HAMNER, J. W.; GAGNON, M.; LIPSITZ, L. Estrogen replacement therapy improves baroreflex regulation of vascular sympathetic outflow in postmenopausal women. **Circulation**, v. 103, p. 2909-2914, 2001.

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

IRWIN, M. L.; YASUI, Y.; ULRICH, C. M.; BOWEN, D.; RUDOLPH, R. E.; SCHWARTZ, R. S.; YUKAWA, M.; AIELLO, E.; POTTER, J. D.; MCTIERNAN, A. Effect of exercise on total and intra-abdominal body fat in postmenopausal women: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 289, n. 3, p. 323-330, 2003.

JANKOWSKI, M.; RACHELSKA, G.; DONGHAO, W.; MCCANN, S. M.; GUTKOWSKA, J. Estrogen receptors activate atrial natriuretic peptide in the rat heart. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 11765-11770, 2001.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. O. Músculo cardíaco. In: _____. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 159-177.

JURCA, R.; CHURCH, T. S.; MORSS, G. M.; JORDAN, A. N.; EARNEST, C. P. Eight weeks of moderate-intensity exercise training increases heart rate variability in sedentary postmenopausal women. **Am. Heart. J.**, v. 147, p. 21, 2004.

KADI, F.; KARLSSON, C.; LARSSON, B.; ERIKSSON, J.; LARVAL, M.; BILLIG, H.; JONSDOTTIR, I. H. The effects of physical activity and estrogen treatment on rat fast and slow skeletal muscles following ovariectomy. **J. Muscle Res. Cell. Motil.**, v. 23, n. 4, p. 335-339, 2002.

KAMIŃSKI, K. A.; OLEDZKA, E.; BIATOBRZEWSKA, K.; KOZUCH, M.; MUSIAT, W. J.; WINNICKA, M. M. The effects of moderate physical exercise on cardiac hypertrophy in interleukin 6 deficient mice. In: **Adv. Med. Sci.**, v. 52, p. 164-168, 2007.

KANNEL, W. B.; HJORTLAND, M. C.; MCNMARA, P. M.; GORDON, T. Menopause and risk of cardiovascular disease: The Framingham study. **Ann. Intern. Med.**, v. 85, p. 447-452, 1976.

KAPLAN, M. L.; CHESLOW, Y.; VIKSTROM, K.; MALHOTRA, A.; GEENEN, D. L.; NAKOUZI, A.; LEINWAND, L. A.; BUTTRICK, P. M. Cardiac adaptations to chronic exercise in mice. **Am. J. Physiol.**, v. 267, n. 4, p. 1167-1173, 1994.

KOKKINOS, P. F.; NARAYAN, P.; COLLERAN, J. A.; PITTARAS, A.; NOTARGIACOMO, A.; REDA, D.; PAPADEMETRIOU, V. Effects of regular exercise on blood pressure and left ventricular hypertrophy in African-American men with severe hypertension. **J. Med.**, v. 333, p. 1462-1467, 1995.

LANE, N. E.; BUCKWALTER, J. A. Exercise: a cause of osteoarthritis? **Rheum Dis. Clin. North AM.**, v. 19, n. 3, p. 617-633, 1993.

LIMA, S. M.; ALDRIGHI, J. M.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M.; MANSUR ADE, P.; RUBIRA, M. C.; KRIEGER, E. M.; RAMIRES, J. A. Acute administration of 17 β -estradiol improves endothelium-dependent vasodilation in postmenopausal women. **Maturitas**, v. 50, p. 266-274, 2005.

- LOPES, J. D. M.; GOMES, R. A. S. G.; HIAL, V.; LOPES, I. C. R.; REIS, M. A.; TEIXEIRA, V. P. A. Correlações entre o teor de colágeno no miocárdio ventricular esquerdo humano medido através de métodos bioquímico e morfométrico. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 79, n. 1, p. 10-14, 2002.
- MALHOTRA, A.; BUTTRICK, P.; SCHEUER, J. Effects of sex hormones on development of physiological and pathological cardiac hypertrophy in male and female rats. **Am. Physics. Society.**, v. 259, n. 3, p. H866-871, 1990.
- MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz. J. Biol.**, v. 62, n. 4A, p. 609-614, 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.
- MARKS, A. R. Ryanodine receptors/calcium release channels in heart failure and sudden cardiac death. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 33, p. 615-624, 2001.
- MARTIS, R. R.; PEREIRA, N. M. L.; SILVA, T. M. A. Liquid-base cytology: a new method for estral cycle study in wistar's rats. **Acta Cir. Brás.**, v. 20, n. 1, p. 46-49, 2005.
- McNULTY, P. H.; JAGASIA, D.; WHITTING, J. M.; CAULIN-GLASER, T. Effect of 6-wk estrogen withdrawal or replacement on myocardial ischemic tolerance in rats. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 278, p. H1030-H1034, 2000.
- MELINE, K. J.; NOBLE, E. G. Response of the myocardium to exercise: sex- specific Regulation of HSp 70. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 40, n. 4, p. 655-663, 2008.
- MENDONÇA, L. S.; FERNANDES-SANTOS, C.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Cardiac and aortic structural alterations due to surgically-induced menopause associated with renovascular hypertension in rats. **J. Exp. Pathol.**, v. 88, n. 4, p. 301-309, 2007.
- MERCURO, G.; SAIU, F.; DEIDDA, M.; MERCURO, S.; VITALE, C.; ROSANO, G. M. Impairment of physical exercise capacity in healthy postmenopausal women. **Am. Heart J.**, v. 151, n. 4, p. 923-927, 2006.
- MERCURO, G.; PODDA, A.; PITZALIS, L. ZONCU, S.; MASCIA, M.; MELIS, G. B.; ROSANO, G. M. Evidence of a role of endogenous estrogen in the modulation of autonomic nervous system. **Am. J. Cardiol.**, v. 85, p. 787-789, 2000.
- MEDUGORAC, I.; JACOB, R. Characterization of left ventricular collagen in the rat. **Cardiovasc. Res.**, v. 17, p. 15-21, 1983.
- MORIGUCHI, Y.; MORIGUCHI, E. H. **Biologia geriátrica ilustrada**. São Paulo: Fundo Editorial BYK, 1988.

NICKEL, R.; SCHUMMER, A.; SEIFELERLE, E. **The anatomy of the domestic animals**. Berlin: Verlag Paul Parey, 1981. v. 3, p. 15-38.

NUMAGUCHI, K.; EGASHIRA, K.; TAKEMOTO, M.; KADOKAMI, T.; SHIMOKAWA, H.; SUEISHI, K.; TAKESHITA, A. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis causes coronary microvascular remodeling in rats. **Hypertension**, v. 26, p. 957-962, 1995.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Doenças crônico-degenerativas e obesidade: estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde**. 2003. Disponível em: http://www.opas.org.br/sistema/arquivos/d_cronic.pdf. Acesso em: 04 fev. 2007.

PAROO, Z.; HAIST, J. V.; KARMAZYN, M.; NOBLE, E. G. Exercise improves postischemic cardiac function in males but not females: consequences of a novel sex-specific heat shock protein 70 response. **Circ. Res.**, v. 90, p. 911-917, 2002.

PEREIRA, L. M.; MANDARIN-DE-LACERDA, C. A. Myocardial microcirculation stereological changes in rats subjected to nitric oxide synthesis inhibition. **Pathol. Res. Pract.**, v. 195, p. 177-181, 1999.

PESSANHA, M. G.; MANDARIN-DE-LACERDA, C. A.; HAHN, M. D. Stereology and immunohistochemistry of the myocardium in experimental hypertension: long-term and low-dosage administration of inhibitor of the nitric oxide synthesis. **Pathobiology**, v. 67, p. 26-33, 1999.

PINHEIRO, A. R.; CUNHA, A. R.; AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Beneficial effects of physical exercise on hypertension and cardiovascular adverse remodeling of diet induced obese rats. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, v. 16, p.1-11, 2006.

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

POCHMANN, D.; RÜCHER, B.; BATTASTINI, A. M. O.; SARKIS, J. J. F. Ovariectomy and estradiol replacement therapy alters the adenine nucleotide hydrolysis in rat blood serum. **Thromb. Res.**, v. 114, p. 275-281, 2004.

RAPPELLI, A. Hypertension and obesity after the menopause. **J. Hypertens.**, v. 20, p. S26-S28, 2002.

ROBINSON, T. H.; COHEN-GOULD, L.; FACTOR, S. M. Skeletal framework of mammalian heart muscle. **Lab. Invest.**, v. 49, n. 4, p. 482-498, 1983.

ROSS, R. Atherosclerosis- an inflammatory disease. **J. Med.**, v. 340, p. 115-126, 1999.

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.; OCKONE, J. Risks and benefits of

estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: Principal results from the Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial. **JAMA**, v. 288, p. 321-333, 2002.

SÁNCHEZ-QUINTANA, D.; GÁRCIA-MARTINEZ, V.; CLIMENT, V.; HURLÉ, J. M. Myocardial fiber and connective tissue architecture in the fish heart ventricle. **J. Exp. Zool.**, v. 275, p. 112-124, 1996.

SANTIZO, R.; ANDERSON, S.; YE, S.; KOENIG, H. M.; PELLIGRINO, D. A. Effects of estrogen on leukocyte adhesion after transient forebrain ischemia. **Stroke**, v. 31, p. 2231-2235, 2000.

SCHERLE, W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. **Mikroskopie**, v. 26, p. 57-63, 1970.

SHARKEY, L. C.; HOLYCROSS, B. J.; PARK, S.; SHIRY, L. J.; HOEPF, T. M.; MCCUNE, S. A.; RADIN, M. J. Effect of ovariectomy and estrogen replacement on cardiovascular disease in heart failure-prone SHHF/Mcc- fac cp rats. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 31, n. 8, p. 1527-1537, 1999.

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

SILVA, N. W. **Temas de clínica geriátrica**. São Paulo: Fundo Editorial BIK-PROCIENX, 1973.

SOWERS, M. R.; LA PIETRA, M. Menopause: its epidemiology and potential association with chronic diseases. **Epidemiol. Rev.**, v. 17, p. 287-302, 1995.

SPENCE, A. P. Sistema circulatório: o coração. **Anatomia Humana Básica**. 2. ed. São Paulo: Manole, p. 290-339, 1991.

STAESSEN. J. A.; CELIS, H.; FAGARD, R. The epidemiology of the association between hypertension and menopause. **J. Hum. Hypertens.**, v. 12, p.587-592, 1998.

STAMPFER, M. J.; COLDITZ, G. A.; WILLET, W. C.; MANSON, J. E.; ROSNER, B.; SPEIZER, F. E.;HENNEKENS, C. H. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the Nurses' Health Study. **N. Engl. J. Med.**, v. 325, p. 756-762, 1991.

STERIO, D. C. The unbiased estimation of number sizes of arbitrary particles using the disector. **J. Microsc.**, v. 134, p. 127-136, 1984.

STUPKA, N.; TIIDUS, P. M. Effects of ovariectomy and estrogen on ischemia-reperfusion injury in hindlimbs of female rats. **J. Appl. Physiol.**, v. 91, n. 4, p. 1828-1835, 2001.

SUBBIAH, R. M. T.; KESSEL, B.; AGRAWAL, M.; RAGHUNANDAN, R.; ABPLANALP, W.; RYMASZEWSKI, Z. Antioxidant potential of specific estrogens on lipid peroxidation. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 77, p. 1095-1097, 1993.

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

THIDUS, P. M. Estrogen and gender effects on muscle damage, inflammation and oxidative stress. **J. Appl. Physiol.**, v. 25, p. 274-387, 2000.

THIJS, A.; VAN BAAL, W. N.; VAN DER MOREN, M. J.; KENEMANS, P.; DRAGER, A. M.; HUIJGENS, P. C.; et al. Effects of hormona replacement therapy on blood platelets. **Eur J. Clin. Investig.**, v. 32, p. 613-618, 2002.

TREMBLAY, G. B.; TREMBLAY, A.; COPELAND, N. G.; GILBERT, D. J.; JENKINS, N. A.; LABRIE, F.; GIGUERE, V. Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. **Mol. Endocrinol.**, v. 11, p. 353-365, 1997

TUFFERY, A. A. **Laboratory animals. An introduction for experiments**. 2. ed. England: John Wiley & Sons Ltd, 1995.

VAN EIKELS, M.; GROHE, C.; CLEUTJENS, J. P.; JANSSEN, B. J.; WELLENS, H. J.; DOEVENDANS, P. A.. 17 beta-estradiol athenuates the development of pressure-overload hypertrophy. **Circulation**, v. 104, p. 1419-1423, 2001.

VÉRAS-SILVA, A. S.; MATTOS, K. C.; NEGRÃO, C. E.; KRIEGER, E. M. Exercise intensity affects differently resting hemodynamics in spontaneously hypertensive rats. **J. Hypertens.**, v. 14, p. S103, 1996. Supplement, 1.

VOKONAS, P. S.; KANNEL, W. B.; CUPPLES, L. A. Epidemiology and risk of hypertension in the elderly: the Framingham Study. **J. Hypertens.**, v. 6, p. S3-S9, 1988.

WANG, Q.; SANTIZO, R.; BAUGHMAN, V.; PELLIGRINO, D. A. Estrogen provides neuroprotection in transient forebrain ischemia through perfusion-independent mechanisms in rats. **Stroke**, v. 30, p. 630-637, 1999

WEBER, K. T. Cardiac interstitium in health and diseases: the fibrillar collagen network. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 13, n. 7, p. 1637-1652, 1989.

WEBER, K. T.; BRILLA, C. G. Pathological hypertrophy and carric interstitium. **Cardiology**, v. 83, n. 6, p. 1849-1865, 1991.

WEIBEL, E. R. **Stereological methods. Pratical methods for biological morphometry**. London: Academic Press., 1979. v. 1, p. 415.

WENGER, N. K.; O'ROURKE, R. A.; MARCUS, F. I. The care of elderly patients with cardiovascular diseases. **Ann. Intern. Med.**, v. 109, p. 425-428, 1988.

WEZÁR, F. The stages and consequences of ageing of collagen. **Gerontologia** (Basel), v. 9, p. 209-221, 1969.

YASUNORI S.; NORIYUKI, S.; EICHI, T.; TOSHIHIKO, Y. Effects of running exercise on the mandible and tibia of ovariectomized rats. **J. Bone Miner. Metab.**, v. 19, p. 159-167, 2001.

XIN, H. B.; SEMBONMATSU, T.; CHENG, D. S., Wang, Y. X.; COPELLO, J. A.; JI, G. J.; COLLIER, M. L.; DENG, K. Y.; JEYAKUMAR, L. H.; MAGNUSON, M. A.; INAGAMI, T.; KOTLIKOFF, M. I.; FLEISCHER, S. Oestrogen protects FKBP12.6 null mice from cardiac hypertrophy. **Nature**, v. 416, p. 334-338, 2002.

ZHU, Y.; BIAN, Z., LU, P. KARAS, R. H.; BAO, L.; COX, D.; HODGIN, J.; SHAUL, P. W.; THOREN, P.; SMITHIES, O.; GUSTAFSSON, J. A.; MENDELSON, M. E. Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor beta. **Science**, v. 295, p. 505-508, 2002.