**Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Fisiologia**

TESE DE DOUTORADO

Estudo das adaptações morfológicas e funcionais cardíacas em ratas submetidas à privação precoce dos hormônios ovarianos associada ao envelhecimento – efeito do treinamento físico aeróbio e do bloqueio da enzima conversora da angiotensina

Ana Carolina Sanches Felix

Ribeirão Preto – SP

2017

ANA CAROLINA SANCHES FELIX

Estudo das adaptações morfológicas e funcionais cardíacas em ratas submetidas à privação precoce dos hormônios ovarianos associada ao envelhecimento – efeito do treinamento físico aeróbio e do bloqueio da enzima conversora da angiotensina

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Departamento de Fisiologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Hugo Celso Dutra de Souza

Ribeirão Preto – SP

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Felix, Ana Carolina Sanches

Estudo das adaptações morfológicas e funcionais cardíacas em ratas submetidas à privação precoce dos hormônios ovarianos associada ao envelhecimento – efeito do treinamento físico aeróbio e do bloqueio da enzima conversora da angiotensina. Ribeirão Preto, 2017.

128 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Souza, Hugo Celso Dutra.

1. Ovariectomia 2. Treinamento Físico. 3.Morfologia Cardíaca. 4. Função Cardíaca. 5. Sistema renina angiotensina.

Agradecimientos

Agradeço a Deus por iluminar todos os meus passos durante essa trajetória.

*Aos meus queridos pais, **Isabel e Cícero**, razões da minha vida, meus alicerces e meus eternos amores, serei eternamente grata por todo o esforço e apoio de vocês! Enfim chegamos ao final de mais uma etapa juntos, pautados na lealdade e no comprometimento diário! Eu amo muito vocês!*

*Ao meu amore, **André**, pelo carinho e amor, obrigada por me incentivar e tornar os meus dias mais felizes e “leves”! Você é muito especial, espero poder compartilhar muitas conquistas ao seu lado, ao longo de toda a minha vida. Eu amo muito você!*

*Aos queridos amigos de laboratório, **Sabrina, Sueni, Tábata, Stella, Pâmela**, vocês são muito especiais para mim! **Sabrina**, minha amiga companheira científica obrigada por me ajudar desde o início, tanto em questões práticas como teóricas, e por dividir todos os momentos tristes e felizes, não tenho palavras para expressar minha gratidão! **Sueni**, minha amiga de longa data, desde a minha iniciação científica até o doutorado obrigada pelas conversas diárias e momentos de descontração! **Tábata**, minha querida amiga “comps” sempre pronta para me ajudar nas horas de desespero, obrigada pela paciência e pela sua amizade! **Stella**, minha querida amiga obrigada pelo apoio diário e ajuda nos momentos de aperto! **Pâmela**, aluna de científica que me ajudou muito na execução deste trabalho! Enfim, não sei expressar o quanto vocês são especiais! Meu profundo agradecimento por tudo!*

*As minhas amigas-irmãs, **Talita Oliveira de Paula, Simone Ponsoni e Patrícia Silveira** que conquistei durante a graduação e que me apoiaram desde o início na carreira acadêmica. Obrigada pela sincera amizade, mesmo de longe, sei o quanto torceram para que eu obtivesse sucesso neste trabalho!*

*Ao meu orientador, **Prof. Dr. Hugo Celso de Souza**, gostaria de agradecer a oportunidade de participar de seu laboratório durante todos esses anos, bem como pelos momentos de atenção, discussão e apoio para a realização deste trabalho!*

Aos funcionários técnicos Cibele, Franscisco, Terezinha, Rubinho e Orlando, pela disposição em ajudar sempre que precisei, meu sincero agradecimento à vocês!

Aos membros da banca, pela atenção, disponibilidade e contribuição nas discussões científicas;

Aos órgãos de fomento CNPq e FAPESP, pelo auxílio financeiro;

Ás “minhas” ratinhas, pois sem elas não seria possível a realização deste trabalho e a minha Sophie, minha filhinha orelhuda de quatro patas!

*"Tenho consciência de ser autêntica e
procuro superar todos os dias minha
própria personalidade, despedaçando
dentro de mim tudo que é velho e morto,
pois lutar é a palavra vibrante que levanta
os fracos e determina os fortes. O
importante é semear."*

Cora Coralina

Resumo

FELIX, A.C.S. **Estudo das adaptações morfológicas e funcionais cardíacas em ratas submetidas à privação precoce dos hormônios ovarianos associada ao envelhecimento – efeito do treinamento físico aeróbico e do bloqueio da enzima conversora da angiotensina.** 2017, 128f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Introdução: A menopausa fisiológica associada ao envelhecimento aumenta a morbimortalidade por doenças cardiocirculatórias decorrente de alterações vasculares, hemodinâmicas e morfofuncionais cardíacas. Entretanto, a menopausa precoce pode promover prejuízos cardiovasculares ainda mais importantes, os quais podem ser exacerbados quando associados ao envelhecimento. Nesse contexto, há evidências de que o treinamento físico aeróbico e a inibição da enzima conversora de angiotensina promovam efeitos benéficos sobre a hemodinâmica e a morfofuncionalidade cardíaca.

Objetivos: Investigar em ratas velhas (82 semanas) os efeitos da privação precoce dos hormônios ovarianos sobre a morfologia e a funcionalidade cardíaca, bem como os efeitos do treinamento físico aeróbico e da inibição crônica da enzima conversora de angiotensina com Maleato de Enalapril.

Métodos: Ratas Wistar (N=96) foram divididas em dois grandes grupos; grupo submetido à ovariectomia (N=72) e grupo submetido à cirurgia sham (N=24), ambos na 10ª semana de idade. O grupo ovariectomizado foi dividido em seis subgrupos (N=12); grupo sedentário (OVX); grupo submetido ao treinamento físico aeróbico (OVX-T); grupo tratado com 10mg.kg⁻¹.d⁻¹ de Maleato de Enalapril (OVX-ME); e grupo treinado e tratado com Maleato de Enalapril (OVX-MET). O treinamento físico aeróbico e o tratamento com ME foram realizados durante a 62ª a 82ª semanas de idade. Por sua vez, o grupo submetido à cirurgia sham foi dividido em dois subgrupos (N=12); grupo sedentário (SHAM) e grupo treinado (SHAM-T). Ao final da 82ª semana, os animais foram submetidos ao exame ecocardiográfico, avaliação da função cardíaca isolada por meio da técnica de Langendorff e à quantificação da expressão de receptores β -adrenérgicos cardíacos pela técnica de Western Blot.

Resultados: O grupo OVX apresentou maiores valores da espessura da parede do septo interventricular e da pressão intraventricular esquerda máxima à administração de dobutamina quando comparado ao grupo SHAM. Contudo, ambos os grupos treinados, OVX-T e SHAM-T apresentaram redução da pressão intraventricular à administração de dobutamina, bem como da expressão dos receptores β 1-adrenérgicos, em relação aos seus respectivos grupos sedentários. Quando comparado ao grupo OVX, os grupos OVX-ME e OVX-T apresentaram menores valores da espessura das paredes do VE, pressão intraventricular esquerda máxima à administração de dobutamina, bem como redução da expressão dos receptores β 1-adrenérgicos.

Conclusão: A privação precoce dos hormônios ovarianos associada ao envelhecimento promoveu discretas alterações na morfologia cardíaca, porém um importante aumento da contratilidade. Por sua vez, o treinamento físico aeróbico e o tratamento com Maleato de Enalapril promoveram efeitos semelhantes na morfologia cardíaca. Também reduziram a contratilidade cardíaca e a expressão de receptores β 1-adrenérgicos. Contudo, a combinação dos dois tratamentos não potencializou os efeitos observados.

Palavras-chave: ovariectomia; treinamento físico; morfologia cardíaca; função cardíaca; sistema renina angiotensina.

Abstract

FELIX, A.C.S. **Study of cardiac morphological and functional adaptations in rats submitted to early deprivation of ovarian hormones associated with aging - effect of aerobic physical training and angiotensin converting enzyme blockade.** 2017, 128 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Introduction: Physiological menopause associated with aging increases the incidence of cardiovascular morbidity and mortality due to cardiac morphofunctional, hemodynamic and vascular changes. However, early menopause may lead to increased cardiovascular damage, which may be exacerbated when associated with aging. On the other hand, aerobic physical training and inhibition of the angiotensin-converting enzyme may promote beneficial effects on hemodynamics and cardiac morphofunctionality.

Objective: To investigate the effects of early ovarian hormone privation (ovariectomy at the 10th week of age) on the morphology and cardiac function in old rats (82 weeks), as well as the implications of these parameters after aerobic physical training and the angiotensin converting enzyme inhibition with Enalapril Maleate (EM).

Methods: Wistar rats (N=96) were divided into two large groups; group submitted to ovariectomy (N=72) and sham group (N=24), both at the 10th week of age. The ovariectomized group was divided into six subgroups (N=12); sedentary group (OVX), a group submitted to aerobic physical training between 62 and 82 weeks of age (OVX-T), a group treated with 10mg.kg⁻¹.d⁻¹ of Enalapril Maleate (OVX-ME) between 62 and 82 weeks of age and group trained and treated with Enalapril Maleate (OVX-MET). The group undergoing sham surgery was divided into two subgroups (N=12); sedentary group (SHAM) and trained group (SHAM-T). At the end of the 82nd week, the animals were submitted to echocardiographic examination, evaluation of cardiac function isolated by the Langendorff technique and quantification of cardiac β -adrenergic receptor expression by the Western Blot technique.

Results: The OVX group presented higher values of the interventricular septum wall thickness and the maximum left intraventricular pressure to dobutamine administration when compared to the SHAM group. However, both trained groups, OVX-T and SHAM-T, had reduced intraventricular pressure to dobutamine administration, as well as expression of β 1-adrenergic receptors compared to their respective sedentary groups. When compared to the OVX group, the OVX-ME and OVX-T groups presented lower values of LV wall thickness, maximal left intraventricular pressure to dobutamine administration, as well as reduced β 1-adrenergic receptor expression.

Conclusion: Early aging associated with ovarian hormones promoted few alterations in cardiac morphology, but an important increase in cardiac contractility. In turn, aerobic physical training and treatment with Enalapril Maleate promoted similar effects on cardiac morphology. They also reduced cardiac contractility and β 1-adrenergic receptor expression. However, the combination of the two treatments did not potentiate the observed effects.

Key-words: ovariectomy; physical training; cardiac morphology; cardiac function; renin angiotensin system.

Lista de Abreviaturas

Ang-II	Angiotensina II
AT1	Receptor de angiotensina tipo 1
AT2	Receptor de angiotensina tipo 2
$\beta 1$	Receptor beta-adrenérgico tipo 1
$\beta 2$	Receptor beta-adrenérgico tipo 2
Bpm	Batimento por minuto
DCVS	Doença cardiovasculares
DDFVE	Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo
DSFVE	Diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo
dP/dT_{máx}	Velocidade máxima de contração do ventrículo esquerdo
dP/dT_{min}	Velocidade máxima de relaxamento do ventrículo esquerdo
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EPM	Erro padrão da média
EPP	Espessura da parede posterior
ERP	Espessura relativa da parede
FC	Frequência cardíaca
FE	Fração de ejeção
g	Gramas
i.p.	Intraperitoneal
ECA	Enzima conversora da angiotensina
kg	Quilograma
ME	Maleato de Enalapril
μg	Micrograma
μL	Microlitro

Mg	Miligrama
mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de mercúrio
mL	Mililitro
OVX	Ovariectomia
PAP	Pressão arterial pulsátil
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
SIV	Septo interventricular
SRA	Sistema renina-angiotensina
VDFVE	Volume diastólico final do ventrículo esquerdo
VE	Ventrículo esquerdo
VSFVE	Volume sistólico final do ventrículo esquerdo

Lista de Tabelas

Tabela 1: Características gerais e parâmetros morfológicos cardíacos obtidos nos grupos SHAM e ovariectomizados (OVX), sedentários e treinados.....	45
Tabela 2: Parâmetros morfológicos normalizados pelo peso corporal obtidos nos grupos SHAM e ovariectomizados (OVX), sedentários e treinados.....	46
Tabela 3: Parâmetros hemodinâmicos e funcionais cardíacos obtidos nos grupos SHAM e ovariectomizados (OVX), sedentários e treinados.....	48
Tabela 4: Características gerais e parâmetros morfológicos cardíacos obtidos nos grupos ovariectomizados (OVX) veículo e OVX tratados com Maleato de Enalapril (OVX-EM), ambos sedentários e treinados.....	64
Tabela 5: Características gerais e parâmetros morfológicos cardíacos obtidos nos grupos ovariectomizados (OVX) veículo e OVX tratados com Maleato de Enalapril (OVX-EM), ambos sedentários e treinados.....	65
Tabela 6: Valores da pressão arterial e dos parâmetros de função cardíaca obtidos nos grupos ovariectomizados (OVX) veículo e OVX tratados com Maleato de Enalapril (OVX-ME), ambos sedentários e treinados.....	67

Lista de Figuras

Figura 1: Reatividade do leito coronariano (A) e Pressão Intraventricular Esquerda Máxima (B) ao aumento do fluxo coronariano nos grupos SHAM e ovariectomizados (OVX), sedentários e treinados. Todos os valores estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). ⁺ P<0.05 vs. SHAM-treinado. [#] P<0.05 vs. OVX sedentário. [†] P<0.05 vs. OVX-treinado.....	50
Figura 2: Valores de dP/dT _(máx) (A) e dP/dT _(min) (B) ao aumento do fluxo coronariano nos grupos SHAM e ovariectomizados (OVX), sedentários e treinados. Todos os valores estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM) ⁺ P<0.05 vs. SHAM-treinado. [#] P<0.05 vs. OVX sedentário. [†] P<0.05 vs. OVX-treinado.....	51
Figura 3: Curva dose-resposta (A) e Resposta Contrátil Máxima (100nmol) da pressão intraventricular esquerda máxima (C) após a administração de dobutamina e Curva dose-resposta (B) e Resposta Contrátil Máxima (15nmol) (D) da pressão intraventricular esquerda máxima após a administração de salbutamol obtidas nos grupos SHAM e ovariectomizados (OVX), sedentários e treinados. Todos os valores estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). [*] P<0,05 vs. SHAM; ⁺ P<0,05 vs. SHAM treinado; [#] P<0,05 vs. OVX sedentário; [†] P<0.05 vs. OVX-treinado.....	53
Figura 4: Expressão de receptores beta do tipo 1 (β -1) (A) e de receptores beta do tipo 2 (β -2) (B) nos grupos SHAM e ovariectomizados (OVX), sedentários e treinados. Todos os valores estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). [*] P<0,05 vs. SHAM; ⁺ P<0,05 vs. SHAM treinado; [#] P<0,05 vs. OVX sedentário.....	55
Figura 5: Reatividade do leito coronariano (A) e Pressão Intraventricular Esquerda Máxima (B) ao aumento do fluxo coronariano nos grupos ovariectomizados (OVX) veículo e OVX tratados com Maleato de Enalapril (OVX-ME), ambos sedentários e treinados. Todos os valores estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM) ⁺ P<0,05 vs. OVX-T; [#] P<0,05 vs. OVX-ME; [†] P<0.05 vs. OVX-MET.....	69
Figura 6: Valores de dP/dT _(máx) (A) e dP/dT _(min) (B) ao aumento do fluxo coronariano nos grupos ovariectomizados (OVX) veículo e OVX tratados com Maleato de Enalapril (OVX-ME), ambos sedentários e treinados. Todos os valores estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). ⁺ P<0,05 vs. OVX-T; [#] P<0,05 vs. OVX-ME; [†] P<0.05 vs. OVX-MET.....	70

Figura 7. Curva dose-resposta (A) e Resposta Contrátil Máxima (100nmol) da pressão intraventricular esquerda máxima (C) após a administração de dobutamina e Curva dose-resposta (B) e Resposta Contrátil Máxima (15nmol) (D) da pressão intraventricular esquerda máxima após a administração de salbutamol obtidas nos grupos ovariectomizados (OVX) veículo e OVX tratados com Maleato de Enalapril (OVX-ME), ambos sedentários e treinados. Todos os valores estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). *P<0,05 vs. OVX; ⁺P<0,05 vs. OVX-T; [#]P<0,05 vs. OVX-ME. [†]P<0.05 vs. OVX-MET.....72

Figura 8. Expressão de receptores beta do tipo-1 (β -1) (A) e de receptores beta do tipo-2 (β -2) (B) obtidos nos grupos ovariectomizados (OVX) veículo e OVX tratados com Maleato de Enalapril (OVX-ME), ambos sedentários e treinados. Todos os valores estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). *P<0,05 vs. OVX; ⁺P<0,05 vs. OVX-T; [#]P<0,05 vs. OVX-ME.73

Sumário

Sumário

1. INTRODUÇÃO	23
<i>Epidemiologia</i>	23
<i>Estrogênios e o sistema cardiovascular</i>	24
<i>Estrogênios e o sistema renina angiotensina (SRA)</i>	26
<i>Abordagens terapêuticas na menopausa</i>	27
2. OBJETIVOS	31
<i>Objetivos Gerais</i>	31
<i>Objetivos específicos</i>	31
3. MÉTODOS	33
3.1. <i>Animais experimentais</i>	33
3.2. <i>Grupos experimentais</i>	33
3.3. <i>Procedimentos</i>	34
3.4. <i>Protocolos Experimentais</i>	36
3.5. <i>Análise Estatística</i>	41
4. RESULTADOS - ESTUDO 1	43
4.1. <i>Morfologia Cardíaca</i>	43
4.2. <i>Função Cardíaca</i>	47
4.3. <i>Reatividade do leito coronariano- Fluxo induzida</i>	49
4.4. <i>Sensibilidade dos receptores β-adrenérgicos</i>	52
4.5. <i>Expressão de receptores β-adrenérgicos cardíacos</i>	54
5. DISCUSSÃO – ESTUDO 1	57
6. RESULTADOS - ESTUDO 2	63
6.1. <i>Morfologia Cardíaca</i>	63
6.2. <i>Função Cardíaca</i>	66
6.3. <i>Reatividade do leito coronariano ao fluxo-induzido</i>	68
6.4. <i>Sensibilidade dos receptores β-adrenérgicos cardíacos</i>	71
6.5. <i>Expressão de receptores β-adrenérgicos cardíacos</i>	73
7. DISCUSSÃO - ESTUDO 2	75
8. CONCLUSÃO	82
9. REFERÊNCIAS	84
ANEXO	97

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Epidemiologia

A menopausa (mensis = mês; pausis = pausa), é definida pela Organização Mundial da Saúde como a fase da vida da mulher em que a capacidade reprodutiva chega ao fim, sendo marcada pela ausência permanente das menstruações em decorrência da perda da atividade folicular ovariana (Who, 1996). Esse evento decorre de alterações nos níveis dos hormônios sexuais femininos, com diminuição dos níveis circulantes de estrogênio e progesterona, e concomitante elevação dos hormônios folículo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH). Seu diagnóstico é eminentemente clínico e retrospectivo, confirmado após transcorrência de doze meses da amenorréia (Who, 1996).

A média de idade para ocorrência da menopausa nos países desenvolvidos é de 51 anos, mas, em alguns casos, ela pode acontecer precocemente (antes dos 40 anos) decorrente de causas cirúrgicas, genéticas, autoimunes, iatrogênicas e idiopáticas (Chang et al, 2007; Kalantaridou et al, 2006). Essa condição é definida como menopausa precoce (Torrealday & Pal, 2015; Rodriguez & Shoupe, 2015) e é comumente associada com risco aumentado de infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico e mortalidade, seja a causa natural ou cirúrgica (Takahashi & Johnson, 2015; Hall, 2015; Wellons et al, 2012). Inclusive, alguns autores postulam que esta condição, quando comparada à menopausa fisiológica, proporciona riscos cardiovasculares ainda maiores (Parker et al, 2009; Lobo, 2007; Atsma et al, 2006). Dessa forma, é possível que a privação precoce dos hormônios ovarianos (menopausa precoce), quando associada ao processo de envelhecimento, seja mais devastadora para o sistema cardiovascular do que o envelhecimento com os ovários preservados (menopausa fisiológica).

Nesse sentido, independente da época da menopausa, diversos estudos têm sugerido que a proteção cardiovascular, observada na mulher antes da menopausa, seja devido à ação

cardioprotetora exercida pelos hormônios sexuais femininos, sobretudo os estrogênios (Knowton & Lee, 2012; Vitale et al, 2010; Arnal et al, 2007). Entretanto, os mecanismos envolvidos nessa ação cardioprotetora, bem como o papel dos estrogênios, ainda não estão bem estabelecidos. O que é apontado por alguns estudos é que os estrogênios teriam um importante papel, influenciando de forma preponderante adaptações autonômicas, morfológicas e funcionais cardíacas (Felix et al, 2015; Stice et al, 2011; Guo et al, 2006; Tostes et al, 2003).

Estrogênios e o sistema cardiovascular

Estudos apontam que a redução dos níveis de estrogênios parece estar intimamente relacionado ao desenvolvimento de hipertensão arterial e ao aumento da influência do sistema nervoso simpático sobre o coração (Barton & Meyer, 2009; Moodithaya & Avadhany, 2009; Jazbutyte et al, 2007; Zhu et al, 2002) além de prejuízos na morfologia cardíaca, dentre eles o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca concêntrica (Donaldson et al, 2009; Tivesten et al, 2006; Hinderliter et al, 2002), que consiste em um remodelamento cardíaco caracterizado pela adição dos sarcômeros das fibras cardíacas em paralelo (Bernardo et al, 2010), e o aumento da fibrose cardíaca (Felix et al, 2015; Cabanelas et al, 2012; Pedram et al, 2010; Voloshenyuk & Gardner, 2010).

As consequências da hipertrofia dos cardiomiócitos incluem, principalmente; a redução da eficiência do acoplamento excitação-contração; e a diminuição da contratilidade cardíaca (Gómez et al, 1997). Por sua vez, a fibrose promove alterações nas propriedades mecânicas do coração (Brower et al, 2006), o que também resulta em prejuízo na oxigenação e no metabolismo local, como consequência da barreira física imposta pelas fibras colágenas entre as células. Dessa forma, estudos têm demonstrado que esse tipo de remodelamento cardíaco está associado à disfunção e à falência cardíaca, sendo a hipertrofia por si só, um fator preditor para morbimortalidade cardiovascular (Tsao et al, 2015; Gosse, 2005).

Corroborando com as informações acima, estudos prévios comparativos entre mulheres, antes e após a menopausa, identificaram maior incidência de hipertrofia ventricular esquerda naquelas com redução hormonal (Dunzeli et al, 2007; Hinderliter et al, 2002). Do mesmo modo, modelos experimentais de privação de hormônios ovarianos mostraram aumento da massa ventricular esquerda e do peso cardíaco (Haines et al, 2012; Jazbutyte et al, 2006), bem como o desenvolvimento de disfunção ventricular esquerda (Haines et al, 2012; Ozdemir et al, 2004). Nesse contexto, alguns autores pontuam que os estrogênios parecem atuar no bloqueio de vias celulares relacionadas ao desenvolvimento de hipertrofia cardíaca, dentre elas a relacionada ao aumento de cálcio e da calcineurina (Pedram et al, 2005) e a outra, da ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (Pedram et al, 2013, Wang et al, 2013).

Em relação à função do ventrículo esquerdo, muitas vezes também encontra-se reduzida em mulheres após a menopausa (Alecrin et al, 2004; Light et al, 2001). Um estudo apontou que a supressão da enzima aromatase, essencial para produção de estrogênios, promove prejuízo na função cardíaca, contribuindo para a redução da fração de encurtamento ventricular esquerda, e ainda, foi apontado que a suplementação com o hormônio β - estradiol, por um período de 2 meses, restaura esse parâmetro (Haines et al, 2012). De maneira similar, foi demonstrado, através da cirurgia de retirada bilateral dos ovários (ovariectomia), que a privação dos hormônios ovarianos, colabora para a diminuição da fração de ejeção do ventrículo esquerdo, decorrente do infarto do miocárdio (Cavasin et al, 2003). Outros autores recentemente mostraram em um modelo experimental de sobrecarga de volume cardíaco que a ausência dos estrogênios também promove redução da fração de ejeção, bem como piora de parâmetros marcadores de função diastólica (El Hajj et al, 2016).

Ademais, além dos seus efeitos fisiológicos sobre a morfologia e a funcionalidade cardíaca, há evidências de que os estrogênios atuam na proteção da integridade estrutural do endotélio vascular (Menazza et al, 2016). Isso seria decorrente de suas ações modulatórias sobre

o tônus vascular, favorecendo a via celular de produção de óxido nítrico (NO), importante fator de relaxamento vascular, bem como pela sua ação inibitória em vias celulares envolvidas na produção de substâncias vasoconstritoras, como as espécies reativas ao oxigênio, endotelina I e angiotensina II (Ang-II) (Pedram et al, 2010; Wu et al, 2009; Antonicelli et al, 2008; Duckles & Miller, 2010), além da inibição de substâncias responsáveis por lesão e apoptose celular, como por exemplo, as citocinas inflamatórias e as moléculas de adesão (Cutini et al, 2012; Xing et al, 2009).

No entanto, apesar da importância dos hormônios ovarianos sobre o sistema cardiovascular, bem como os efeitos deletérios que ocorrem após o declínio da função ovariana, a sua associação com o envelhecimento ainda é um importante fator de confusão na interpretação dos efeitos da privação precoce dos hormônios ovarianos. Essa confusão é atribuída em grande parte aos estudos realizados em modelos experimentais, uma vez que a maioria desses estudos foram realizadas em animais jovens.

Nesse caso, pouco sabemos sobre os prejuízos cardiovasculares da privação precoce dos hormônios ovarianos associada ao envelhecimento quando comparados à falência ovariana fisiológica, e se isso realmente representa em pior prognóstico, principalmente em relação ao remodelamento e a função cardíaca.

Estrogênios e o sistema renina angiotensina (SRA)

Diversos estudos têm apontado uma relação inversa entre os estrogênios e o SRA (López & Tena-sempere, 2015; do Santos et al, 2014; Korzick & Lancaster, 2013; Deschamps et al, 2010) sugerindo uma importante participação desse sistema endócrino nas alterações morfológicas e funcionais cardíacas decorrentes da falência ovariana, uma vez que a Ang-II está relacionada com a fisiopatologia da hipertensão arterial e a piora do remodelamento cardiovascular. Esses fatores que em conjunto podem promover prejuízos na função cardíaca

(Tazumi et al, 2016; Husain et al, 2015; Sayer & Bhat, 2014; Herichova & Szantoova, 2013; Cozza et al, 2012)

Mais especificamente, estudos apontam que os estrogênios teriam um importante papel na redução da expressão e/ou concentração da renina plasmática e da enzima conversora da angiotensina (ECA) sérica e tecidual, resultando em menores concentrações plasmáticas de Ang-II (Yoshida et al, 2011; Coylewright et al, 2008; Dean et al, 2005; Harrison-Bernard et al, 2003; Chappell et al, 2003; bem como da expressão dos receptores: do tipo 1 (AT₁) (Hilliard et al, 2013; Dean et al, 2005) e do tipo 2 (AT₂) (Zimmernan & Sullivan, 2013).

Entretanto, há relatos que apontam que os estrogênios modulariam favoravelmente o SRA, aumentando os níveis plasmáticos de renina e, conseqüentemente, de Ang-II (Tostes et al, 2003), e ainda, nessa linha de evidência alguns autores observaram maior atuação do SRA no controle da pressão arterial, em manobra de estresse ostostático, em mulheres as quais fizeram o uso de terapia de reposição hormonal após a menopausa (Harvey et al, 2005).

Baseado nessas informações, ainda permanece controverso os reais mecanismos fisiológicos envolvidos na relação entre os estrogênios e o SRA, e se realmente podemos atribuir ao SRA os prejuízos cardiovasculares na morfologia e na função cardíaca decorrentes da privação dos hormônios ovarianos.

Abordagens terapêuticas na menopausa

Com o objetivo de atenuar os riscos das doenças cardiovasculares (DCVs), assim como para minimizar os sinais e sintomas decorrentes da privação dos hormônios ovarianos, a suplementação exógena de hormônios sexuais femininos (estrogênios e/ou progesterona) seria a conduta primária a ser escolhida.

No entanto, devido às divergências de resultados sobre essa prática, a prescrição da terapêutica hormonal tem sido amplamente discutida pela comunidade científica desde o final da década de 90, quando o seu efeito cardioprotetor foi amplamente questionado após a publicação dos resultados do Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS) (Hulley et al., 1998) e do Women's Health Initiative (WHI) (Rossow et al, 2002), ambos apontando que a terapia de reposição hormonal aumentava o risco relativo para as DCVs, em mulheres após a menopausa. Tais achados provocaram grande impacto sobre a prescrição dessa terapêutica até os dias de hoje (Hsia et al, 2016; Sassarini & Lumsden, 2015; Pardini, 2014), sendo necessário à implementação de terapias alternativas para reduzir os riscos já mencionados.

Nesse aspecto, com o intuito de atenuar os prejuízos cardiovasculares decorrentes da ausência dos hormônios ovarianos, diferentes abordagens terapêuticas têm sido investigadas e aplicadas nas últimas décadas. Dessa forma, estudos têm apontado que mudanças no estilo de vida após a menopausa, por meio da prática regular de exercícios físicos, principalmente os denominados aeróbios, promoveriam melhoras na qualidade de vida relacionadas à saúde cardiovascular (Moriyama et al, 2008; Asikainen et al, 2006); redução da pressão arterial e da dislipidemia (Asikainen et al, 2004; Asikainen et al, 2003), além de melhora da função ventricular esquerda, caracterizada pelo aumento da fração de ejeção e de encurtamento (Di Blasio et al, 2011; Morrison et al, 1986).

Além disso, de forma mais específica, diversos estudos têm demonstrado que o treinamento físico aeróbio promove adaptações morfológicas e funcionais benéficas, como a melhora do remodelamento cardíaco adverso e a fibrose cardíaca, bem como de parâmetros marcadores da função sistólica e da contratilidade cardíaca (Felix et al, 2015; Cocco et al, 2011; Di Blasio et al, 2011; Bocalini et al, 2010; Xu et al, 2010; Garcarena et al, 2009; Marques et al, 2006; Goodman et al, 2005), além de promover adaptações neuro-humorais, autonômicas e

hemodinâmicas importantes (Ichige et al, 2016; Endlich et al, 2013; Cozza et al, 2012; Michelini & Sters, 2009).

Paralelamente, os benefícios cardiovasculares do uso de drogas inibidoras da enzima conversora de angiotensina (ECA) como forma de terapia farmacológica devem ser considerados para a prevenção e o tratamento dos prejuízos na morfologia e funcionalidade cardíaca decorrentes da privação dos hormônios ovarianos. Nessa linha, estudos experimentais têm demonstrado que o tratamento com um inibidor da ECA promove redução da massa ventricular esquerda e melhora de parâmetros hemodinâmicos em ratos hipertensos (Nunez et al, 1999), da função endotelial em ratas jovens ovariectomizadas (Yung et al, 2011), bem como na redução da hipertrofia cardíaca observada em ratas hipertensas ovariectomizadas (Santos et al, 2004), impedindo também a piora da função diastólica em ratos submetidos ao infarto agudo do miocárdio (Ocaranza et al, 2006). Adicionalmente, um estudo com mulheres após a menopausa mostrou que a inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) promoveria, entre outros efeitos, a redução do inibidor da ativação do plasminogênio (PAI-I), principal o elemento envolvido na formação de aterosclerose nos vasos (Brown et al, 2002).

No entanto, embora os efeitos cardiovasculares do treinamento físico e da inibição da enzima conversora da angiotensina tenham sido muito estudados, suas implicações sobre o remodelamento e a função cardíaca em ratas submetidas à privação precoce dos hormônios ovarianos associadas ao envelhecimento ainda não foram abordadas. Diante do exposto, nossa primeira hipótese é de que a privação precoce dos hormônios ovarianos associada ao processo de envelhecimento, promova um pior remodelamento cardíaco prejudicando a função cardíaca, principalmente quando comparada à falência ovariana fisiológica. Nossa segunda hipótese é de que o treinamento físico aeróbio e tratamento crônico com um inibidor da ECA, de forma isolada ou em conjunto, possam atenuar esses prejuízos cardíacos.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Investigar em ratas velhas (82 semanas) submetidas à privação precoce dos hormônios ovarianos (ovariectomia na 10ª semana de idade) os prejuízos sobre a morfologia e a funcionalidade cardíaca, bem como os efeitos benéficos do treinamento físico aeróbio e do bloqueio da enzima conversora de angiotensina com Maleato de Enalapril (ME) sobre esses parâmetros.

Objetivos específicos

1. Avaliar os parâmetros morfológicos e funcionais do ventrículo esquerdo;
2. Avaliar a função cardíaca isolada através da contratilidade cardíaca e da reatividade do leito coronariano;
3. Quantificar a expressão dos receptores beta adrenérgicos do tipo 1 (β -1) e do tipo 2 (β -2) no ventrículo esquerdo;

Métodos

3. MÉTODOS

3.1. *Animais experimentais*

Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar com 10 semanas de idade (250 ± 5 g), provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo (USP), Campus de Ribeirão Preto. Durante o período experimental, os animais foram acondicionados e mantidos até a 82ª semana de idade no Biotério do Programa de Pós-Graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional, com ciclo claro-escuro de 12 horas à temperatura de 21 ± 1 °C, com livre acesso a água e comida (Nuvilab CR-1, Nuvital, Colombo, PR, Brasil).

Os protocolos experimentais utilizados no presente estudo estão de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP, SP, Brasil), Protocolo N°.167/2013.

3.2. *Grupos experimentais*

Inicialmente, 48 ratas Wistar foram divididas em dois grupos: grupo submetido à privação precoce dos hormônios ovarianos, utilizando a cirurgia de ovariectomia (OVX, N=24) e grupo controle, utilizando a cirurgia sham (SHAM N=24), ambas realizadas com 10 semanas de idade. Metade de cada grupo foi submetido a um treinamento físico aeróbio entre a 62ª e a 82ª semanas de idade. Portanto, totalizando 4 grupos: SHAM sedentário (N=12); SHAM treinado (SHAM-T, N=12); OVX sedentário (N=12) e OVX treinado (OVX-T, N=12).

Posteriormente, mais 48 animais foram submetidos à OVX com 10 semanas de idade e divididos em 4 grupos experimentais: OVX sedentário tratado com veículo (OVX, N=12); OVX sedentário tratado com ME (OVX-ME, N=12); OVX treinado (OVX-T, N=12) e OVX

tratado e treinado (OVX-MET, N=12). O tratamento com ME e o treinamento físico aeróbico também foram realizados durante a 62^a a 82^a semanas de idade.

3.3. Procedimentos

3.3.1. Cirurgia para retirada dos ovários

Sob anestesia de quetamina e xilazina (80 mg/kg and 10 mg/kg, i.p., respectivamente), as ratas foram submetidas à OVX bilateral ou a retirada fictícia dos ovários (cirurgia SHAM).

Para realização da OVX, foram realizadas incisões cutâneas nos flancos bilateralmente, permitindo acesso à cavidade abdominal. Após localização do ovário, foi realizada uma ligadura na extremidade distal da trompa uterina e o ovário foi retirado. A trompa uterina foi recolocada no interior da cavidade abdominal e as camadas musculares e cutâneas foram suturadas isoladamente. O ovário contralateral foi removido de maneira semelhante. A cirurgia SHAM foi realizada seguindo os mesmos procedimentos descritos para a OVX, com exceção da ligadura da trompa uterina e retirada dos ovários.

Após o procedimento cirúrgico, os animais receberam injeção de antibiótico intramuscular (40000 U/kg Penicilina G procaina IM), para prevenir infecção, e anti-inflamatório não-esteroidal flunixin meglumine (Banamine) subcutâneo (2,5 mg/kg), para analgesia no pós-operatório. Nas duas semanas subsequentes à realização da OVX ou a cirurgia SHAM, os animais permaneceram em gaiolas individuais para adequada recuperação pós-cirúrgica. Em seguida, as ratas foram alocadas em grupos de 5 por caixa (60 x 50 x 22 cm, Insight Ltda, Brasil) e permaneceram por mais 70 semanas, seguindo o protocolo específico de cada grupo até o início dos experimentos.

Durante as últimas 4 semanas após a realização da cirurgia, o esfregaço vaginal foi coletado diariamente em todas as ratas, seguindo o procedimento descrito por Marcondes et al. (2002). Esse procedimento permite determinar a fase do ciclo estral por meio da análise diária

do tipo de células que descamam do epitélio vaginal. Dessa forma, após a coleta do fluido vaginal, o mesmo foi colocado em lâminas de vidro e analisado por meio de microscopia óptica (40x). A ausência do ciclo estral foi confirmada pela permanente fase diestro, caracterizada por um infiltrado leucocitário, sem células epiteliais, consequência da ação da progesterona, bem como das baixas concentrações de estradiol.

3.3.2. Tratamento com Maleato de Enalapril

O tratamento com ME ocorreu por via oral, na dose de 10mg/kg/dia (Yung et al, 2011) diluído na água de beber durante 20 semanas (da 62^a a 82^a semana de idade), diariamente. A concentração da solução foi determinada a partir do consumo diário médio de água (quatro ratos por gaiola) e o peso corporal dos animais, ajustado semanalmente durante todo o protocolo experimental.

3.3.3. Treinamento físico aeróbio

O treinamento físico aeróbio consistiu de sessões de natação realizadas em um aquário de vidro (100 cm comprimento x 80 cm largura x 80 cm altura), que permitiu o treinamento de 6 animais simultaneamente. O aquário contendo água a uma profundidade de 50 cm, mantida aquecida ($30 \pm 2^{\circ}\text{C}$), e trocada a cada grupo de treinamento.

O programa de treinamento foi realizado em duas etapas distintas, com duração de 20 semanas (da 62^a a 82^a semana de idade). A primeira etapa consistiu em 2 semanas de adaptação ao meio aquático, com aumentos graduais de 5 minutos até atingirem 30 minutos diários (5x/semana). A segunda etapa consistiu em 18 semanas, com sessões de treinamento de 30 minutos de duração, com a frequência semanal de 5 vezes.

Para a avaliação da intensidade do treinamento físico, foi coletado o sangue da veia caudal dos animais na 5^a, 10^a, 18^a semanas, imediatamente antes e após as sessões de

treinamento de 30 minutos, e a concentração de lactato foi medida (Accutrend® Plus, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). O nível esperado de lactato variou de 5,5 a 6 mmol/L, conforme determinado previamente (Gobatto et al, 2001). Se estes níveis de lactato não fossem atingidos, a intensidade do treinamento físico foi aumentada utilizando uma cinta de velcro impermeável contendo chumbo, a qual era fixada no tórax, a 2% a 6% do peso corporal do animal (Gobatto et al, 2001).

3.4. Protocolos Experimentais

3.4.1. Cirurgia de canulação da artéria femoral

Os animais foram submetidos à cirurgia, sob anestesia de quetamina e xilazina (80 mg/kg e 10 mg/kg, i.p., respectivamente), para implante de cânulas de polietileno (PE-50 fundido a uma extensão PE-10; Intermédica, Clay Adams, Parsippany, NJ, USA) na artéria femoral esquerda para posterior registro da pressão arterial. A cânula foi exteriorizada na região dorsal, através do tecido subcutâneo. Para evitar coágulos, a cânula foi preenchida com salina heparinizada (500 UI/mL).

3.4.2. Registro da pressão arterial pulsátil

A pressão arterial pulsátil (PAP) foi registrada 24 horas após o procedimento cirúrgico de canulação. A extremidade exteriorizada da cânula implantada na artéria femoral foi acoplada ao sistema digital de aquisição de sinais biológicos, composto por um transdutor de pressão (MLT844, ADInstruments, Bella Vista, Australia) e um amplificador de sinais (FE117, ADInstruments, Bella Vista, Australia) acoplado a um sistema de aquisição computadorizado (ADInstruments, Austrália - PowerLab 8/30). O sinal de PA foi adquirido usando frequência de amostragem de 2 KHz. A pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) foram inferidas a partir da PAP por meio de um software (PowerLab Chart ADInstruments, Austrália).

3.4.3. Avaliação morfofuncional do ventrículo esquerdo mediante o emprego da ecocardiografia bidimensional convencional

Este protocolo foi realizado no Laboratório Multiusuário de Ecocardiografia de pequenos animais, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Para a realização desta análise, foi utilizado o equipamento de ecocardiografia Vevo 2100® High-Resolution Imaging System (VisualSonics, Toronto, ON, Canada), com transdutor de frequência de 21 MHz, seguindo as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia (Sahn et al, 1978).

3.4.4. Procedimento do exame ecocardiográfico

Para o procedimento, a região anterior do tórax do animal foi previamente tricotomizada (Veet®, Reckitt Benckiser, São Paulo, SP, Brasil), e todos os animais foram anestesiados com isoflurano a 1,5% suplementada 1% de O₂, permitindo aos animais manter a respiração espontânea durante o exame. Os animais foram colocados em uma plataforma aquecida (37° C) e as quatro patas conectadas a eletrodos de eletrocardiograma, monitorizado durante todo o procedimento.

As medidas diastólicas foram realizadas na região de maior dimensão da cavidade ventricular, e as medidas sistólicas na região de menor dimensão da cavidade ventricular, de acordo com as diretrizes da Sociedade Americana de Ecocardiografia. A fração de ejeção e fração de encurtamento foram calculadas e utilizadas como um determinante da função sistólica do ventrículo esquerdo.

As imagens obtidas pelo modo B e modo M foram feitas utilizando como referencial anatômico o plano transversal e o corte paraesternal, ao nível dos músculos papilares. As melhores imagens foram usadas para avaliação off-line da função ventricular. A realização dos

exames e das medidas foi feita sempre pelo mesmo observador. A partir da projeção paraesternal do eixo curto do ventrículo esquerdo, ao nível dos músculos papilares, foi utilizado o modo-M para quantificação das dimensões do septo interventricular (SIV) e parede posterior (EPP), assim como das dimensões do diâmetro diastólico final do VE (DDFVE) e do diâmetro sistólico final (DSFVE), todos expressos em milímetros (mm). Todas as medições foram realizadas de acordo com as normas da Sociedade Americana de Ecocardiografia.

A massa ventricular esquerda foi obtida a partir da fórmula: $1,047 \times [(DDFVE + EPP + SIV)^3 - DDFVE^3]$, onde: 1,047 representa a densidade do miocárdio, validada em ratos (Barauna et al, 2007; Wichi et al, 2007; Fard et al, 2000). Após a obtenção desta medida, foi obtido o valor corrigido pelo peso corporal (valor absoluto/peso corporal do animal). Outro importante índice morfológico avaliado, fornecido pelo ecocardiógrafo para caracterização da hipertrofia cardíaca (excêntrica / concêntrica) é a espessura relativa da parede (ERP), cuja fórmula é: $2 \times PP / DDFVE$ (PP: parede posterior do VE em diástole; DDFVE: diâmetro diastólico final do VE).

Os valores referentes aos diâmetros da cavidade ventricular esquerda, em sístole e em diástole, foram utilizados para estimativa da função sistólica do ventrículo esquerdo através da fração de encurtamento do ventrículo esquerdo: $(DDFVE - DSFVE / DDFVE) \times 100$. A fração de ejeção (FE) foi estimada pelo método de Teichholz (Teichholz et al, 1976), pela fórmula $FE = (VDFVE - VSFVE / VDFVE) \times 100$ e expressa em porcentagem (%). Todos os valores expressos representam a média de três valores consecutivos obtidos para cada animal. Para a quantificação dos volumes ventriculares esquerdo, foram utilizadas as seguintes fórmulas: volume diastólico final do ventrículo esquerdo; $VDFVE (\mu L) = [DDFVE^3 \times (7 \div 2.4 + DDFVE)]$ e volume sistólico final do ventrículo esquerdo; $VSFVE (\mu L) = [DSFVE^3 \times (7 \div 2.4 + DSFVE)]$ (Teichholz et al, 1976).

3.4.5. Isolamento e Perfusão do Coração Isolado - Técnica de Langendorff

Para o isolamento e perfusão dos corações, os animais foram anestesiados com quetamina e xilazina (80 mg/kg e 10 mg/kg, i.p., respectivamente) e heparinizados (5000 UI/kg).

Após a decapitação, os corações foram perfundidos (8ml/g) com uma solução de Krebs-Henseleit contendo (mM/L): NaCl 118,4, KCl 4,7, CaCl₂ 2,5, MgSO₄·7H₂O 1,2, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1,2, e glicose 11,2 e piruvato 2,0. A solução de Krebs foi aerada com uma combinação de 95% de O₂ e 5% de CO₂ a 37°C (Skrzpiec-Spring et al, 2007).

A pressão de perfusão coronariana e a pressão intraventricular foram obtidas através da canulação da aorta e da implantação de um balão de látex dentro do ventrículo esquerdo, respectivamente, e foram mensuradas utilizando dois transdutores de pressão (MLT844, ADInstruments, Bella Vista, Australia). Para verificar a viabilidade das preparações, a pressão de perfusão coronariana e a pressão intraventricular foram avaliadas através de registros gráficos utilizando o software (PowerLab, Chart7; ADInstruments, Bella Vista, Australia).

O protocolo experimental teve duração de 1 hora, assim, após 10 minutos de estabilização basal, iniciou-se a avaliação da reatividade do leito coronariano mediante ao aumento do fluxo basal, o qual foi aumentado progressivamente em 20%, a cada 2 minutos, até o total de 200%. Para cada valor de fluxo, foi registrada a pressão de perfusão coronariana, a pressão intraventricular esquerda, a velocidade máxima de contração ($dp/dT_{\max}$) e a velocidade máxima de relaxamento ($dp/dT_{\min}$) ventricular esquerdo.

Posteriormente, após uma estabilização de 10 minutos, foi realizada a avaliação da sensibilidade dos receptores β -adrenérgicos, utilizando a curva dose-resposta cardíaca e a resposta máxima à pressão intraventricular obtida pela administração de dobutamina (agonista β_1 -adrenérgico) e salbutamol (Agonista β_2 -adrenérgico). Foram administradas doses

crescentes e em bolus (0,25 a 100 nmoles de dobutamina; 0,25 a 15 nmoles de salbutamol), de forma alternada com intervalo de 2 minutos entre elas, em intervalos de 2 minutos consecutivos.

3.4.6. Quantificação dos receptores beta-adrenérgicos

Amostras de tecido cardíaco dos grupos em estudo foram coletadas, lavadas em PBS estéril gelado, secas em papel de filtro, colocadas em tubos de eppendorf de 2mL e imediatamente congeladas a -80°C até o momento da extração de proteínas. Foi adicionado ao eppendorf o tampão de extração com inibidores da protease e fosfatase e, em seguida, o tecido foi triturado em polytron. O material foi centrifugado a 13.000 rpm por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante congelado a -70°C e posteriormente utilizado para a dosagem de proteínas. A dosagem de proteínas foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595nm pelo método de Bradford. As proteínas foram separadas por eletroforese (100 volts por 1h 40 min) e então transferidas para membrana de PVDF (100 volts por 2 horas em tampão de transferência). Após, as membranas foram coradas por Ponceau para marcação das proteínas. Em seguida, as membranas foram lavadas em H₂O deionizada e colocadas em solução de bloqueio *overnight*. Após esse procedimento, as membranas foram incubadas com anticorpo primário *overnight*. Os anticorpos utilizados foram: anti-β1 receptor adrenérgico e anti-β2 receptor adrenérgico. Após as lavagens com Tampão TBS-T foi colocado o anticorpo secundário conjugado a peroxidase por 40 minutos à temperatura ambiente. Após este processo, a membrana foi revelada no aparelho ChemiDoc XRS (BioRad). A quantificação das bandas específicas foi realizada usando o programa *ImageJ* (disponível na internet <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>). Os valores relatados são referentes à densidade óptica (DO) das bandas expressas em unidade arbitrária (UA).

3.5. *Análise Estatística*

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ E.P.M. (erro padrão da média). O teste de variância ANOVA two way para medidas repetidas seguido do teste de comparações múltiplas de Student Newman Keuls foi utilizado para avaliar os efeitos da privação precoce dos hormônios ovarianos e do treinamento físico aeróbio, bem como os efeitos do tratamento com Maleato de Enalapril.

A reatividade do leito vascular coronariano e a curva-dose resposta da contratilidade cardíaca, após a administração de dobutamina e salbutamol foram analisadas pela análise multivariada de medidas repetidas, seguido do pós teste quando necessário. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0.05$. Todos os testes estatísticos foram realizados por meio do software SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA).

Resultados - estudo 1

4. RESULTADOS - ESTUDO 1

Efeitos da privação precoce dos hormônios ovarianos associado ao envelhecimento sobre a morfologia e a função cardíaca – papel do treinamento físico aeróbio

4.1. Morfologia Cardíaca

Tabela 1 apresenta as características gerais e os parâmetros morfológicos cardíacos. O grupo OVX sedentário apresentou maiores valores de septo interventricular (SIV) em comparação ao grupo SHAM sedentário. A comparação entre os grupos SHAM, mostrou que o grupo SHAM-T apresentou maiores valores de peso cardíaco, peso cardíaco relativo, espessura da parede posterior (EPP), espessura da parede do septo interventricular (SIV), espessura da parede relativa do VE (ERP) e massa do VE, e menores valores de diâmetro diastólico (DDFVE) e sistólico final do VE (DSFVE).

Por sua vez, a comparação entre os grupos OVX, mostrou que o grupo OVX-T apresentava menores valores da espessura da parede posterior (EPP), espessura da parede do septo interventricular (SIV), espessura da parede relativa do VE (ERP) e maiores valores de diâmetro diastólico (DDFVE) e sistólico final do VE (DSFVE).

Quando os grupos treinados foram comparados, o grupo OVX-T apresentou menores valores de peso cardíaco, peso cardíaco relativo e de todas as espessuras e massa do VE, e aumento do diâmetro diastólico (DDFVE) e sistólico final do VE (DSFVE).

A Tabela 2 mostra os parâmetros morfológicos cardíacos normalizados pelo peso corporal. O grupo OVX sedentário apresentou maiores valores de septo interventricular (SIV) em comparação ao grupo SHAM sedentário. A comparação entre os grupos SHAM, mostrou que o grupo SHAM-T apresentou maiores valores de todas as espessuras e massa do VE, e menores de diâmetro sistólico final do VE (DSFVE). Por sua vez, a comparação entre os grupos OVX mostrou que o grupo OVX-T apresentava menores valores da espessura da parede

posterior (EPP) e espessura da parede do septo interventricular (SIV). Quando os grupos treinados foram comparados, o grupo OVX-T apresentou menores valores de todas as espessuras das paredes e massa do VE, e maiores valores de diâmetro sistólico final do VE (DSFVE).

Tabela 1. Características gerais e parâmetros morfológicos cardíacos obtidos nos grupos SHAM e ovariectomizados (OVX), sedentários e treinados.

	SHAM		OVX		Fator Ovariectomia	Fator Treinamento Físico	Interação
	Sedentário	Treinado	Sedentário	Treinado	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>
Parâmetros							
Peso corporal, g	472 ± 24,5	479 ± 13,9	483 ± 20,0	485 ± 13,0	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>
Peso cardíaco, g	1,35 ± 0,02	2,24 ± 0,10*	1,37 ± 0,01	1,43 ± 0,02* ⁺	<0,001	<0,001	<0,001
Peso cardíaco relativo, mg/kg	2,86 ± 0,14	4,67 ± 0,26*	2,83 ± 0,07	2,94 ± 0,06 ⁺	<0,001	<0,001	<0,001
Morfologia Cardíaca							
EPP, mm	1,9 ± 0,03	2,3 ± 0,16*	1,9 ± 0,02	1,7 ± 0,04* ^{#,+}	<0,001	<i>NS</i>	<0,001
SIV, mm	1,5 ± 0,04	2,4 ± 0,10*	2,0 ± 0,11*	1,5 ± 0,04 ^{#,+}	<i>NS</i>	0,043	<0,001
ERP, mm	0,46 ± 0,01	0,63 ± 0,10*	0,50 ± 0,02	0,43 ± 0,02* ^{#,+}	<0,001	<i>NS</i>	<0,001
DDFVE, mm	8,0 ± 0,26	7,3 ± 0,16*	7,5 ± 0,28	8,0 ± 0,19 ^{#,+}	<i>NS</i>	<i>NS</i>	0,029
DSFVE, m	5,4 ± 0,16	3,7 ± 0,13*	4,9 ± 0,19	5,4 ± 0,13 ^{#,+}	0,002	0,002	<0,001
Massa cardíaca, mg/g	1016 ± 57	1430 ± 114*	1133 ± 101	942 ± 16 ⁺	0,004	<i>NS</i>	0,002

Valores expressos como média ± EPM. mm, milímetros; kg; quilogramas; mg; miligramas; EPP, espessura da parede posterior; SIV, septo interventricular; ERP, espessura relativa da parede; DDFVE, diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo; DSFVE, diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo. *P<0,05 vs. SHAM sedentário; ⁺P<0,05 vs. SHAM treinado; [#]P<0,05 vs. OVX sedentário; NS: não significativo.

Tabela 2. Parâmetros morfológicos normalizados pelo peso corporal obtidos nos grupos SHAM e ovariectomizados (OVX), sedentários e treinados.

	SHAM		OVX		Fator Ovariectomia	Fator Treinamento Físico	Interação
	Sedentário	Treinado	Sedentário	Treinado	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>
Morfologia Cardíaca							
EPP, mm/kg	4,0 ± 0,25	4,9 ± 0,35*	3,8 ± 0,16	3,5 ± 0,23 ^{*,#,+}	0,008	NS	0,003
SIV, mm/kg	3,18 ± 0,18	4,95 ± 0,28*	4,14 ± 0,28*	3,16 ± 0,15 ^{#+}	<0,001	0,006	<0,001
ERP, mm/kg	1,00 ± 0,08	1,33 ± 0,09*	1,02 ± 0,05	0,89 ± 0,08 ^{*,+}	0,01	NS	0,007
DDFVE, mm/kg	17,3 ± 0,8	15,3 ± 0,3	15,4 ± 0,8	16,5 ± 0,2	NS	NS	NS
DSFVE, mm/kg	11,6 ± 0,6	7,7 ± 0,1*	10,2 ± 0,6	11,2 ± 0,2 ⁺	0,072	0,015	<0,001
Massa cardíaca, mg/g	2,1 ± 0,11	2,9 ± 0,23*	2,3 ± 0,22	1,9 ± 0,04 ⁺	0,024	NS	0,004

Valores expressos como média ± EPM. mm, milímetros; kg; quilogramas; mg; miligramas; EPP, espessura da parede posterior; SIV, septo interventricular; ERP, espessura relativa da parede; DDFVE, diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo; DSFVE, diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo. *P<0,05 vs. SHAM sedentário; ⁺P<0,05 vs. SHAM treinado; [#]P<0,05 vs. OVX sedentário. NS: não significativo.

4.2. Função Cardíaca

A Tabela 3 mostra os parâmetros hemodinâmicos e funcionais cardíacos obtidos pelo registro da pressão arterial e da ecocardiografia, respectivamente. O grupo OVX sedentário apresentou maiores valores de pressão arterial sistólica (PAS) quando comparado ao grupo SHAM sedentário. A comparação entre os grupos SHAM, mostrou que o grupo SHAM-T apresentava menores valores de volume diastólico final (VDFVE) e do volume sistólico final do VE (VSFVE), e maiores valores de fração de ejeção e de fração de encurtamento. Por sua vez, a comparação entre os grupos OVX mostrou que o grupo OVX-T apresentou somente maiores valores de volume diastólico final do VE (VDFVE).

Quando os grupos treinados foram comparados, o grupo OVX-T apresentou maiores valores de pressão arterial sistólica (PAS), volume diastólico final (VDFVE) e volume sistólico final (VSFVE). Entretanto, apresentou menores valores de fração de ejeção e de fração de encurtamento.

Tabela 3. Parâmetros hemodinâmicos e funcionais cardíacos obtidos nos grupos SHAM e ovariectomizados (OVX), sedentários e treinados.

	SHAM		OVX		Fator Ovariectomia	Fator Treinamento Físico	Interação
	Sedentário	Treinado	Sedentário	Treinado	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>
Valores Hemodinâmicos							
PAS, mmHg	123 ± 5	126 ± 1	140 ± 2*	137 ± 2 ⁺	<0,001	NS	NS
PAD, mmHg	97 ± 4	91 ± 3	91 ± 2	94 ± 2	NS	NS	NS
PAM, mmHg	108 ± 4	105 ± 2	110 ± 1	111 ± 2	NS	NS	NS
Função Cardíaca							
FC, bpm	320 ± 10	315 ± 8	311 ± 9	316 ± 8	NS	NS	NS
VDFVE (μL)	597 ± 69	411 ± 33*	469 ± 65	585 ± 47 ⁺	NS	NS	0,019
VSFVE (μL)	134 ± 16	36 ± 5*	101 ± 13	140 ± 12 ^{#,+}	0,017	0,026	<0,001
Volume de Ejeção, μL	459 ± 61	376 ± 83	367 ± 53	445 ± 36	NS	NS	NS
Fração de Ejeção, %	76 ± 2,0	91 ± 0,8*	78 ± 1,0	76 ± 0,5 ⁺	<0,001	<0,001	<0,001
Fração de Encurtamento, %	32 ± 1,6	49 ± 1,4*	34 ± 1,0	32 ± 0,4 ⁺	<0,001	<0,001	<0,001
Débito Cardíaco, mL/ min	146 ± 18	118 ± 9	114 ± 16	140 ± 12	NS	NS	NS
Índice Cardíaco, mL/g	0,35 ± 0,03	0,24 ± 0,01	0,23 ± 0,03	0,28 ± 0,02	NS	NS	NS

Valores expressos em média ± EPM. mmHg, milímetros de mercúrio; bpm, batimentos por minuto; μL, microlitros; %, percentual; mL, mililitros; min, minutos; g, gramas; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca; VDFVE, volume diastólico final do ventrículo esquerdo; VSFVE, volume sistólico final do ventrículo esquerdo. *P<0,05 vs. SHAM; ⁺P<0,05 vs. SHAM treinado; [#]P<0,05 vs. OVX sedentário. NS: não significativo.

4.3. Reatividade do leito coronariano- Fluxo induzida

As Figuras 1A e 1B mostram os resultados dos valores de pressão de perfusão coronariana e da pressão intraventricular esquerda máxima ao aumento do fluxo coronariano, respectivamente. O grupo OVX sedentário apresentou menores valores de pressão de perfusão coronariana e maiores valores de pressão intraventricular esquerda máxima ao aumento do fluxo, exceto para o fluxo basal, em comparação ao grupo SHAM.

A comparação entre os grupos SHAM, mostrou que o grupo SHAM-T somente apresentou maiores valores de pressão de perfusão ao fluxo basal, e maiores valores de pressão intraventricular esquerda máxima para os valores de fluxo acima de 60%.

Por sua vez, a comparação entre os grupos OVX, mostrou que os dois grupos não diferiram em relação à pressão de perfusão coronariana, ao contrário da pressão intraventricular esquerda máxima, onde o grupo OVX-T apresentou maiores valores quando submetido aos maiores valores de fluxo. Quando os grupos treinados foram comparados, o grupo OVX-T apresentou menores valores de pressão de perfusão coronariana, e maiores valores de pressão intraventricular esquerda máxima quando submetido aos maiores valores de fluxo.

As Figuras 2A e 2B mostram os valores de $dP/dT_{\text{máx}}$ e dP/dT_{min} ao aumento do fluxo, respectivamente. Os grupos OVX sedentário e OVX-T apresentaram maiores valores de $dP/dT_{\text{máx}}$ e dP/dT_{min} quando comparados aos grupos SHAM sedentário e SHAM-T.

Figura 1. Reatividade do leito coronariano (A) e Pressão Intraventricular Esquerda Máxima (B) ao aumento do fluxo coronariano nos grupos SHAM e ovariectomizados (OVX), sedentários e treinados. Todos os valores estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). $^+P < 0.05$ vs. SHAM-treinado. $^{\#}P < 0.05$ vs. OVX sedentário. $^{\dagger}P < 0.05$ vs. OVX-treinado.

Figura 2. Valores de $dP/dT_{(máx)}$ (A) e $dP/dT_{(min)}$ (B) ao aumento do fluxo coronariano nos grupos SHAM e ovariectomizados (OVX), sedentários e treinados. Todos os valores estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). $^{\dagger}P < 0.05$ vs. SHAM-treinado. $^{\#}P < 0.05$ vs. OVX sedentário. $^{\dagger}P < 0.05$ vs. OVX-treinado.

4.4. Sensibilidade dos receptores β -adrenérgicos

As figuras 3A e 3B mostram as curvas dose-resposta e os valores da pressão intraventricular esquerda (variações em Δ) após a administração de dobutamina e salbutamol, respectivamente, enquanto as figuras 3C e 3D mostram as respostas máximas da pressão intraventricular.

O grupo OVX sedentário apresentou maiores valores de pressão intraventricular esquerda a partir da dose de 2,5 nmol de dobutamina, e consequentemente maior resposta máxima da pressão intraventricular esquerda em comparação ao grupo SHAM sedentário.

A comparação somente entre os grupos SHAM, mostrou que o grupo SHAM-T apresentou menores valores de pressão intraventricular esquerda em todas as doses da curva dose-resposta, e consequentemente menor resposta máxima da pressão intraventricular após a administração de dobutamina. Em relação ao salbutamol, o grupo SHAM-T também apresentou menores valores de pressão intraventricular esquerda e, consequentemente menor resposta máxima da pressão intraventricular em relação ao grupo SHAM.

De modo similar, a comparação entre os grupos OVX, mostrou que o grupo OVX-T apresentou menores valores de pressão intraventricular esquerda nas doses de 15, 30 e 100 nmol da curva dose-resposta de dobutamina, e consequentemente menor resposta máxima da pressão intraventricular. Em relação ao salbutamol, não houve diferenças significativas.

Quando os grupos treinados foram comparados, o grupo OVX-T apresentou maiores valores de pressão intraventricular esquerda em todas as doses da curva dose-resposta de dobutamina, e consequentemente maior resposta máxima da pressão intraventricular. Em relação ao salbutamol, o grupo OVX-T apresentou maiores valores de pressão intraventricular esquerda nas doses de 2,5 a 15nmol, e consequentemente, maior resposta máxima da pressão intraventricular, em relação ao grupo SHAM-T.

Figura 3. Curva dose-resposta (A) e Resposta Contrátil Máxima (100nmol) da pressão intraventricular esquerda máxima (C) após a administração de dobutamina e Curva dose-resposta (B) e Resposta Contrátil Máxima (15nmol) (D) da pressão intraventricular esquerda máxima após a administração de salbutamol obtidas nos grupos SHAM e ovariectomizados (OVX), sedentários e treinados. Todos os valores estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). * $P < 0,05$ vs. SHAM; $^{\dagger}P < 0,05$ vs. SHAM treinado; $^{\#}P < 0,05$ vs. OVX sedentário. $^{\dagger}P < 0,05$ vs. OVX-treinado.

4.5. Expressão de receptores β -adrenérgicos cardíacos

As Figuras 4A e 4B apresentam os resultados da expressão dos receptores β -1 e β -2 adrenérgicos cardíacos, respectivamente, assim como as imagens representativas dos grupos estudados. A Figura 4A mostra que os grupos sedentários, SHAM e OVX, apresentaram valores semelhantes. Também mostra que ambos os grupos treinados, SHAM-T e OVX-T, apresentaram redução na expressão dos receptores β 1-adrenérgicos em relação aos seus respectivos grupos sedentários, e quando comparados, o grupo SHAM-T apresentou maior redução.

Por sua vez, a Figura 4B mostra que os grupos sedentários, SHAM e OVX, não diferiram na expressão dos receptores β -2 adrenérgicos. No entanto, após o treinamento físico, somente o grupo SHAM-T apresentou redução.

Figura 4. Expressão de receptores beta do tipo 1 (β -1) (A) e de receptores beta do tipo 2 (β -2) (B) nos grupos SHAM e ovariectomizados (OVX), sedentários e treinados. Todos os valores estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). *P<0,05 vs. SHAM; ⁺P<0,05 vs. SHAM treinado; [#]P<0,05 vs. OVX sedentário.

Discussão – estudo 1

5. DISCUSSÃO – ESTUDO 1

A privação precoce dos hormônios ovarianos associada ao processo de envelhecimento elevou a pressão arterial sistólica (PAS) e promoveu um discreto remodelamento cardíaco quando comparada à falência ovariana fisiológica. No entanto, não houve repercussões sobre a função cardíaca avaliada por meio da ecocardiografia bidimensional. Por sua vez, o treinamento físico aeróbio nas ratas submetidas à OVX promoveu a redução das espessuras e da massa ventricular esquerda, enquanto que nas ratas SHAM promoveu aumento do peso cardíaco, das espessuras das paredes e massa ventricular esquerda.

Os aumentos da PAS e da espessura do septo interventricular (SIV) sugerem que a privação dos hormônios ovarianos em longo prazo está associada ao desenvolvimento de hipertensão arterial e a um discreto remodelamento cardíaco adverso. Tais achados parecem corroborar com resultados de outros estudos que também utilizaram o mesmo modelo experimental, entretanto avaliando ratas jovens (Felix et al, 2015; Hernandez et al, 2000). Nesse caso, a literatura indica que a privação dos hormônios ovarianos promove aumento do drive simpático cardíaco (Vongpatanasin, 2009) e da atividade do sistema renina angiotensina (SRA) (Yung et al, 2011), além de prejuízos na função endotelial (Knowlton & Lee, 2012) contribuindo para a elevação dos níveis de PA, e, por consequência o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca (Donaldson et al, 2009).

Por sua vez, o treinamento físico nas ratas OVX não reverteu os valores elevados da PAS, porém reduziu todas as espessuras cardíacas avaliadas, sem modificar a massa do ventrículo esquerdo, promovendo a atenuação do remodelamento cardíaco adverso decorrente da privação precoce dos hormônios ovarianos. Esses resultados evidenciam o papel cardioprotetor exercido pelo treinamento físico aeróbio (Wisloff et al, 2002). Entretanto, os animais SHAM apresentaram após o treinamento físico resultados bem diferentes em relação à

morfologia, como os aumentos do peso cardíaco, massa ventricular e das espessuras cardíacas avaliadas. No entanto, não apresentaram alterações nos principais parâmetros funcionais, como o volume de ejeção e o índice cardíaco.

As causas dessas observações ainda não estão estabelecidas e sugerem um papel fundamental dos hormônios ovarianos nas adaptações teciduais cardíacas decorrentes do envelhecimento, bem como do treinamento físico, ao ponto que os parâmetros morfológicos cardíacos do grupo OVX-T serem muito semelhantes ao grupo SHAM sedentário. Essas observações são muito interessantes, uma vez que estudos clínicos e experimentais mostraram que o treinamento físico aeróbio promove aumento da pré-carga cardíaca, induzindo com o passar do tempo, o espessamento das paredes ventriculares (Arbab-Zadeh et al, 2014), o que corrobora com os resultados encontrados no grupo SHAM, mas não no grupo OVX.

Em relação à avaliação da função cardíaca isolada, por meio da técnica de Langendorff, os resultados foram bem interessantes. Nesse caso, ratas sedentárias submetidas à privação precoce dos hormônios ovarianos apresentaram menor reatividade do leito coronariano e maiores valores da pressão intraventricular esquerda, $dP/dT_{\text{máx}}$ e dP/dT_{min} ao aumento induzido do fluxo. Também apresentaram maior resposta máxima da pressão intraventricular esquerda à administração de dobutamina.

Por sua vez, ambos os grupos treinados apresentaram maiores valores da pressão intraventricular esquerda ao aumento induzido do fluxo, e menores respostas da pressão intraventricular esquerda à dobutamina. Entretanto, somente o grupo SHAM apresentou redução desses mesmos parâmetros após a administração de salbutamol.

Os menores valores da pressão de perfusão coronariana ao aumento induzido do fluxo no grupo sedentário submetido à privação precoce dos hormônios ovarianos sugere importantes alterações na reatividade do leito coronariano. Resultados de estudos anteriores mostraram que a disfunção endotelial está presente em ratas ovariectomizadas, caracterizada pelo aumento da

área do lúmen vascular coronariano (Borgo et al, 2015), bem como por alterações no relaxamento vascular em outros leitos vasculares (Kang et al, 2011; Lamas et al, 2015). Por outro lado, é possível sugerir que a redução da reatividade coronariana ao aumento do fluxo induzido nos animais com privação precoce dos hormônios ovarianos possa estar associada a um mecanismo de auto-regulação da circulação coronariana, com o objetivo de manter o fluxo sanguíneo adequado, principalmente em decorrência do aumento do trabalho cardíaco observado nesses animais, evidenciado pelos maiores valores observados na $dP/dT_{\text{máx}}$ e dP/dT_{min} .

De fato, a causa dos maiores valores de pressão intraventricular esquerda e da dP/dT ao aumento induzido do fluxo ainda são desconhecidas, entretanto é possível que sejam decorrentes do efeito de fatores inotrópicos positivos, a exemplo da angiotensina II, potencializados pela ausência dos estrogênios (Yung et al, 2011). Ademais, reforçando esta hipótese, a privação precoce dos hormônios ovarianos nos animais sedentários promoveu o aumento da resposta da pressão intraventricular esquerda máxima à administração da dobutamina, um agonista β_1 -adrenérgico. Esses achados corroboram estudos anteriores que mostraram aumento da resposta contrátil de cardiomiócitos após a administração de isoprenalina em ratas ovariectomizadas jovens, e neste estudo, os autores associaram essa maior resposta contrátil ao aumento de receptores β_1 -adrenérgicos (Wu et al, 2008), porém no presente estudo não observamos diferenças na expressão desses receptores.

Por outro lado, o treinamento físico promoveu a redução da pressão intraventricular esquerda à dobutamina em ambos os grupos, enquanto que a resposta ao salbutamol somente estava reduzida no grupo SHAM-T. Essas menores respostas parecem associadas à redução da expressão dos receptores β_1 e β_2 adrenérgicos, respectivamente, e sugerem uma menor dependência do sistema nervoso autonômico simpático, principalmente no grupo SHAM-T, uma vez que o grupo treinado submetido à privação precoce dos hormônios ovarianos, OVX-

T, apresentou menor redução de receptores β -1, sugerindo uma dependência do sistema nervoso autonômico simpática mais elevada para a manutenção da eficiência cardíaca. Nesse caso, é possível que exista uma relação entre as alterações na morfologia cardíaca, evidenciadas pela ecocardiografia, e a menor atenuação dos receptores β -adrenérgicos observados no grupo treinado submetido à privação precoce dos hormônios ovarianos.

Contrariamente, o treinamento físico aeróbio promoveu aumento da pressão intraventricular máxima ao aumento induzido do fluxo em ambos grupos. Esses resultados corroboram resultados obtidos por outros autores que mostraram efeitos benéficos do exercício físico aeróbio sobre o coração, entretanto utilizando diferentes metodologias (Portes et al, 2009; Wisloff et al, 2001). Uma possível hipótese para esse efeito é que o treinamento físico aeróbio promova um aumento da vascularização miocárdica, aumento mitocondrial e da atividade enzimática aeróbia e, por conseguinte, o aumento do metabolismo aeróbio (Brown et al, 2003; Cosmas et al, 1997).

Por fim, nosso estudo mostra que a privação precoce dos hormônios ovarianos, quando associada ao processo de envelhecimento, apresenta discretas alterações morfológicas cardíacas, porém, sem repercutir sobre a função cardíaca ao exame ecocardiográfico. Por sua vez, no estudo da função cardíaca isolada houve maior pressão intraventricular esquerda associada a menor reatividade do leito coronariano ao aumento do fluxo nesses animais. Esses achados evidenciam o importante papel em longo prazo dos hormônios ovarianos sobre a função vascular e cardíaca, e apontam a necessidade de outros estudos para investigação os reais mecanismos fisiológicos envolvidos nessa resposta.

Por sua vez, o treinamento físico, mesmo que realizado nas últimas 20 semanas de vida, promoveu em ambos os grupos, importantes alterações cardiovasculares, caracterizadas principalmente pelo aumento da performance cardíaca com uma menor dependência do sistema nervoso autonômico simpático, o que evidencia o seu efeito cardioprotetor, uma vez que o

hiperatividade adrenérgica têm sido relacionada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Schlaich et al, 2004; Seals et al, 2000; Davies et al, 1996; Kaye et al, 1995). No entanto, é importante ressaltar que no grupo de ratas com privação precoce dos hormônios ovarianos esse efeito foi menos evidente, o que sugere a grande importância desses hormônios ovarianos como cardioprotetores durante toda a vida do animal, uma vez que repercute sobre a função cardiovascular no envelhecimento.

Resultados - Estudio 2

6. RESULTADOS - ESTUDO 2

Efeito do treinamento físico aeróbio e do tratamento com ME sobre a morfologia e a função cardíaca de ratas submetidas à privação precoce dos hormônios ovarianos associada ao envelhecimento.

6.1. Morfologia Cardíaca

Tabela 4 apresenta as características gerais e os parâmetros morfológicos cardíacos. Os grupos estudados apresentaram valores semelhantes do peso corporal, peso cardíaco e peso cardíaco relativo. O grupo OVX apresentou maiores valores de espessura da parede posterior (EPP), espessura da parede do septo interventricular (SIV), espessura relativa da parede (ERP) e de massa ventricular esquerda quando comparado aos demais.

A Tabela 5 mostra os parâmetros morfológicos cardíacos normalizados pelo peso corporal. Quando comparado ao grupo OVX, os grupos tratados com ME, OVX-ME e OVX-MET apresentaram menores valores de espessura da parede posterior (EPP), espessura da parede do septo interventricular (SIV), espessura relativa da parede (ERP) e massa do VE, enquanto que o grupo OVX-T apresentou menores valores de espessura da parede do septo interventricular (SIV) e da espessura relativa da parede (ERP).

Tabela 4. Características gerais e parâmetros morfológicos cardíacos obtidos nos grupos ovariectomizados (OVX) veículo e OVX tratados com Maleato de Enalapril (OVX-EM), ambos sedentários e treinados.

	Grupos Experimentais				Fator Treinamento Físico	Fator Maleato de Enalapril	Interação
	OVX	OVX-T	OVX-ME	OVX-MET	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>
Parâmetros							
Peso corporal, g	483 ± 56	485 ± 35	494 ± 51	473 ± 48	NS	NS	NS
Peso cardíaco, g	1,38 ± 0,04	1,42 ± 0,07	1,41 ± 0,07	1,40 ± 0,05	NS	NS	NS
Peso cardíaco relativo, mg/kg	2,86 ± 0,14	2,92 ± 0,17	2,85 ± 0,22	2,95 ± 0,43	NS	NS	NS
Morfologia Cardíaca							
EPP, mm	1,9 ± 0,04	1,6 ± 0,12*	1,5 ± 0,15*	1,5 ± 0,12*	0,018	<0,001	0,034
SIV, mm	2,0 ± 0,27	1,5 ± 0,11*	1,3 ± 0,16*	1,5 ± 0,11*	0,019	<0,001	<0,001
ERP, mm	0,49 ± 0,05	0,40 ± 0,05*	0,38 ± 0,05*	0,38 ± 0,03*	0,014	<0,001	0,043
DDFVE, mm	7,6 ± 0,76	8,1 ± 0,43	7,8 ± 0,41	7,9 ± 0,43	NS	NS	NS
DSFVE, mm	5,0 ± 0,52	5,5 ± 0,31	5,2 ± 0,60	4,9 ± 0,37	NS	NS	NS
Massa cardíaca, mg	1186 ± 305	944 ± 37*	822 ± 74*	871 ± 135*	0,04	0,002	0,03

Valores expressos como média ± EPM. mm, milímetros; kg; quilogramas; mg; miligramas; EPP, espessura da parede posterior; SIV, septo interventricular; ERP, espessura relativa da parede; DDFVE, diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo; DSFVE, diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo. *P<0.05 vs. OVX. NS: não significativo.

Tabela 5. Características gerais e parâmetros morfológicos cardíacos obtidos nos grupos ovariectomizados (OVX) veículo e OVX tratados com Maleato de Enalapril (OVX-EM), ambos sedentários e treinados.

	Grupos Experimentais				Fator Treinamento Físico	Fator Maleato de Enalapril	Interação
	OVX	OVX-T	OVX-ME	OVX-MET	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>
Morfologia Cardíaca							
ERP, mm/kg	3,8 ± 0,17	3,2 ± 0,20	3,0 ± 0,13*	3,2 ± 0,10*	<i>NS</i>	0,006	<i>NS</i>
SIV, mm/kg	4,26 ± 0,29	3,09 ± 0,13*	2,63 ± 0,09*	3,22 ± 0,16*	0,006	<0,001	<0,001
ERP, mm/kg	1,03 ± 0,04	0,82 ± 0,06*	0,76 ± 0,03*	0,81 ± 0,03*	0,04	0,01	0,04
DDFVE, mm/kg	16,1 ± 0,9	16,7 ± 0,2	16,1 ± 0,6	16,9 ± 0,6	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>
DSFVE, mm/kg	10,6 ± 0,7	11,4 ± 0,2	10,8 ± 0,6	10,5 ± 0,4	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>
Massa cardíaca relativa, mg/g	2,4 ± 0,22	1,9 ± 0,04	1,6 ± 0,05*	1,8 ± 0,08*	<i>NS</i>	0,002	0,01

Valores expressos como média ± EPM. mm, milímetro; kg; quilograma; mg; miligrama; EPP, espessura da parede posterior; SIV, septo interventricular; ERP, espessura relativa da parede; DDFVE, diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo; DSFVE, diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo. *P<0.05 vs. OVX. NS: não significativo.

6.2. Função Cardíaca

A Tabela 6 mostra os parâmetros hemodinâmicos e funcionais cardíacos obtidos pelo registro da pressão arterial e da ecocardiografia, respectivamente. Os grupos tratados com ME, OVX-ME e OVX-MET apresentaram menores valores de pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial média (PAM) quando comparado aos grupos OVX e ao grupo OVX-T.

Os resultados do exame ecocardiográfico mostraram que o grupo OVX-T apresentou maiores valores de volume sistólico final do ventrículo esquerdo (VSFVE) quando comparado ao grupo OVX. Entretanto, o grupo OVX-MET apresentou menores valores de volume sistólico final do ventrículo esquerdo (VSFVE) em comparação ao grupo OVX-T, e um aumento da fração de ejeção e da fração de encurtamento em relação aos grupos OVX-ME e OVX-T.

Tabela 6. Valores da pressão arterial e dos parâmetros de função cardíaca obtidos nos grupos ovariectomizados (OVX) veículo e OVX tratados com Maleato de Enalapril (OVX-ME), ambos sedentários e treinados.

	Grupos Experimentais				Fator Treinamento Físico	Fator Maleato de Enalapril	Interação
	OVX	OVX-T	OVX-ME	OVX-MET	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>
Pressão Arterial							
PAS, mmHg	139 ± 2	136 ± 2	110 ± 3 ^{*,+}	105 ± 2 ^{*,+}	NS	<0,001	NS
PAD, mmHg	91 ± 2	92 ± 2	85 ± 2	87 ± 3	NS	NS	NS
PAM, mmHg	110 ± 1	109 ± 2	95 ± 3 ^{*,+}	94 ± 3 ^{*,+}	NS	<0,001	NS
Função Cardíaca							
FC, bpm	309 ± 8	317 ± 7	311 ± 8	314 ± 9	NS	NS	NS
VDFVE (μL)	498 ± 60	594 ± 44	533 ± 37	558 ± 40	NS	NS	NS
VSFVE (μL)	106 ± 13	143 ± 11 [*]	127 ± 18	96 ± 10 ⁺	0,04	NS	0,019
Volume de Ejeção, μL	382 ± 49	451 ± 33	406 ± 23	461 ± 39	NS	NS	NS
Fração de Ejeção, %	78 ± 1,0	76 ± 0,5	77 ± 2,1	82 ± 2,0 ^{#,+}	NS	NS	NS
Fração de Encurtamento, %	34 ± 0,9	31 ± 0,9	33 ± 1,7	38 ± 1,9 ^{#,+}	NS	NS	0,03
Débito Cardíaco, mL/ min	120 ± 15	143 ± 12	126 ± 6	145 ± 12	NS	NS	NS
Índice Cardíaco, mL/g	0,25 ± 0,03	0,29 ± 0,02	0,26 ± 0,01	0,30 ± 0,01	NS	NS	NS

Valores expressos em média ± EPM. mmHg, milímetros de mercúrio; bpm, batimentos por minuto; μL, microlitros; %, percentual; mL, mililitros; min, minutos; g, gramas; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca; VDFVE, volume diastólico final do ventrículo esquerdo; VSFVE, volume sistólico final do ventrículo esquerdo. *P<0,05 vs. OVX; +P<0,05 vs. OVX-T; #P<0,05 vs. OVX-ME. NS: não significativo.

6.3. Reatividade do leito coronariano ao fluxo-induzido

As Figuras 5A e 5B mostram os resultados do aumento do fluxo-induzido sobre a pressão de perfusão coronariana e sobre a pressão máxima intraventricular esquerda, respectivamente. O grupo OVX-ME apresentou menores valores de pressão de perfusão coronariana nos maiores valores de fluxo (40, 60 e 80%) quando comparado ao grupo OVX (Figura 5A). Entretanto, o grupo OVX-T apresentou maiores valores de pressão intraventricular nos maiores valores de fluxo, em relação ao grupo OVX (Figure 5B).

A Figura 6A e 6B mostram os resultados do aumento do fluxo-induzido sobre a $dP/dT_{\text{máx}}$ e dP/dT_{min} , respectivamente. O grupo OVX-ME apresentou menores valores de $dP/dT_{\text{máx}}$ em todos os valores de fluxo em relação ao grupo OVX (Figura 6A), e menor valor de dP/dT_{min} somente no fluxo basal (Figura 6B).

Figura 5. Reatividade do leito coronariano (**A**) e Pressão Intraventricular Esquerda Máxima (**B**) ao aumento do fluxo coronariano nos grupos ovariectomizados (OVX) veículo e OVX tratados com Maleato de Enalapril (OVX-ME), ambos sedentários e treinados. Todos os valores estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). $^{\dagger}P < 0,05$ vs. OVX-T; $^{\#}P < 0,05$ vs. OVX-ME; $^{+}P < 0,05$ vs. OVX-MET.

Figura 6. Valores de $dP/dT_{(máx)}$ (**A**) e $dP/dT_{(min)}$ (**B**) ao aumento do fluxo coronariano nos grupos ovariectomizados (OVX) veículo e OVX tratados com Maleato de Enalapril (OVX-ME), ambos sedentários e treinados. Todos os valores estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). [†]P<0,05 vs. OVX-T; [#]P<0,05 vs. OVX-ME; [†]P<0,05 vs. OVX-MET.

6.4. Sensibilidade dos receptores β -adrenérgicos cardíacos

As Figuras 7A e 7C mostram as curvas dose-resposta da pressão intraventricular esquerda (variações em Δ) após a administração de dobutamina e do salbutamol, enquanto que as Figuras 7B e 7D apresentam a resposta máxima da pressão intraventricular de cada agonista.

Todos os grupos apresentaram curvas dose-resposta semelhantes para ambos agonistas. Por outro lado, os grupos OVX-T, OVX-ME e OVX-MET apresentaram menor resposta máxima da pressão intraventricular à dobutamina em relação ao grupo OVX.

Figura 7. Curva dose-resposta (A) e Resposta Contrátil Máxima (100nmol) da pressão intraventricular esquerda máxima (C) após a administração de dobutamina e Curva dose-resposta (B) e Resposta Contrátil Máxima (15nmol) (D) da pressão intraventricular esquerda máxima após a administração de salbutamol obtidas nos grupos ovariectomizados (OVX) veículo e OVX tratados com Maleato de Enalapril (OVX-ME), ambos sedentários e treinados. Todos os valores estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). * $P < 0,05$ vs. OVX; $^+P < 0,05$ vs. OVX-T; $^{\#}P < 0,05$ vs. OVX-ME; $^{\dagger}P < 0,05$ vs. OVX-MET.

6.5. Expressão de receptores β -adrenérgicos cardíacos

As Figuras 8A e 8B apresentam os resultados da expressão dos receptores β -1 e β -2 adrenérgicos cardíacos, respectivamente, assim como as imagens representativas dos grupos estudados. A Figura 8A mostra que os grupos OVX-T e OVX-ME apresentaram redução na expressão dos receptores β 1-adrenérgicos em relação ao grupo OVX. No entanto, o grupo OVX-MET apresentou aumento na expressão dos receptores β 1-adrenérgicos em relação ao demais grupos.

Por sua vez, a Figura 8B mostra que o grupo OVX-ME apresentou aumento na expressão dos receptores β 2-adrenérgicos em relação ao grupo OVX. No entanto, o grupo OVX-MET apresentou redução na expressão dos receptores β 2-adrenérgicos em relação ao demais grupos.

Figura 8. Expressão de receptores beta do tipo-1 (β -1) (A) e de receptores beta do tipo-2 (β -2) (B) obtidos nos grupos ovariectomizados (OVX) veículo e OVX tratados com Maleato de Enalapril (OVX-ME), ambos sedentários e treinados. Todos os valores estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). *P<0,05 vs. OVX; #P<0,05 vs. OVX-T; +P<0,05 vs. OVX-ME.

Discussão - Estudo 2

7. DISCUSSÃO - ESTUDO 2

Nossos resultados mostram que o tratamento com ME e o treinamento físico atenuam o remodelamento cardíaco adverso observado nas ratas submetidas à privação precoce dos hormônios ovarianos, entretanto, sem modificar os parâmetros funcionais cardíacos obtidos pelo exame ecocardiográfico. Por outro lado, a função cardíaca isolada, avaliada pela técnica de Langendorff mostrou que o tratamento com ME promoveu menores valores da reatividade do leito coronariano e dos valores da $dP/dT_{\text{máx}}$ durante o aumento do fluxo coronariano, enquanto que o treinamento físico promoveu maiores valores da pressão intraventricular esquerda ao aumento do fluxo. Todos os grupos apresentaram menores valores da pressão intraventricular esquerda e da resposta contrátil máxima à administração de dobutamina, quando comparados ao grupo controle.

Os grupos tratados com ME apresentaram redução na PAS e PAM, o que não foi observado no grupo submetido ao treinamento físico isoladamente. De fato, o aumento na incidência de hipertensão arterial após a queda da função ovariana já foi descrito na literatura (Lima et al, 2012; Taddei, 2009; Coylewright et al, 2008; Hinojosa-Laborde et al, 2004) a causa desse aumento parece estar relacionada a inúmeros fatores ligados à privação dos hormônios ovarianos, inclusive a hiperatividade do sistema renina angiotensina (SRA) (O'donnell et al, 2014; Souza & Tezini, 2013). Entretanto, a associação do tratamento com ME ao treinamento físico não potencializou essa resposta, ao contrário do observado em estudo com indivíduos hipertensos (Cozza et al, 2012).

Esses achados mostram uma relação inversa entre os hormônios ovarianos e a ativação do SRA, bem como da participação desse sistema endócrino na fisiopatologia da hipertensão e no aumento do risco cardiovascular após a privação dos hormônios ovarianos, porém os mecanismos que explicam essa ação ainda permanecem incertos, entretanto, em nosso estudo

observamos que o tratamento com o ME promoveu importantes efeitos sobre o coração, como melhora do remodelamento, caracterizado pela redução das espessuras da parede e massa ventricular esquerda, sugerindo um efeito anti-hipertrófico cardíaco decorrente da inibição da enzima conversora de angiotensina. Esse achado corrobora resultados anteriores de estudos experimentais e clínicos que demonstraram o efeito trófico da angiotensina II sobre o tecido cardíaco (Robles et al, 2014; Lima et al, 2013; Cozza et al, 2012; Bader & Gande, 2008; Basso et al, 2007). Entretanto, apesar das alterações morfológicas, não foi observado alterações dos parâmetros funcionais decorrentes do exame de ecocardiografia bidimensional.

Por outro lado, a avaliação da função cardíaca isolada mostrou que o tratamento com ME promoveu menores valores da pressão de perfusão coronariana ao aumento do fluxo coronariano, o que poderia indicar uma menor resistência do leito vascular coronariano. A causa desse achado ainda permanece incerta, entretanto, estudos com ratas jovens ovariectomizadas mostraram uma melhora do remodelamento vascular e da função endotelial após o tratamento com um inibidor da ECA (Yung et al, 2011; Garcia et al, 2006;), principalmente decorrente do aumento de fatores vasodilatadores, principalmente o óxido nítrico (Pecháňová et al, 2007; Zicha et al, 2006; Brosnihan et al, 1997; Pecháňová et al, 1997; Sigusch et al, 1996). Adicionalmente, nossos resultados mostraram que o tratamento com ME promoveu menores valores da $dP/dT_{\text{máx}}$, independentemente da associação com o treinamento físico. Esse resultado necessita ser melhor investigado, mas poderia ser decorrente dos menores valores pressóricos observados nesses animais.

Em relação a sensibilidade dos receptores beta-adrenérgicos, o tratamento com ME promoveu menores valores da pressão intraventricular esquerda à administração de dobutamina. A causa desse feito permanece incerta, porém sugerimos que possa envolver aspectos hemodinâmicos, como a redução do trabalho cardíaco decorrente da redução dos níveis da PA e/ou também por mecanismos neuroendócrinos que envolvem o controle

autônomo cardíaco, mais especificamente pela redução do drive autônomo simpático, como demonstrado em estudos prévios em diferentes modelos experimentais (Herichova & Szantoova, 2013; Paul et al, 2006; Mckinley et al, 2003), o que pode ser evidenciado pela redução da expressão dos receptores β -1 adrenérgicos encontrada em nossos resultados.

Nesse contexto, estudos apontam evidências de que a inibição da ECA além de promover melhoras hemodinâmicas e no remodelamento cardíaco, também estaria relacionada a redução do drive autônomo simpático cardíaco através de ações da Angio-II em núcleos centrais referentes ao controle autônomo cardíaco (Herichova & Szantoova, 2013; Paul et al, 2006; Mckinley et al, 2003) bem como pela redução da liberação de noradrenalina pelas terminações pré-sinápticas dos neurônios adrenérgicos (Balt et al, 2001; Cox et al, 1995; Gilbert et al, 1993). Entretanto, apesar das evidências encontradas entre a relação dos hormônios ovarianos ao SRA sobre a morfologia e a funcionalidade cardíaca, novos estudos devem ser realizados com o objetivo de elucidar os mecanismos fisiológicos envolvidos nessa questão.

Por outro lado, o treinamento físico aeróbio também promoveu redução das espessuras das paredes do ventrículo esquerdo, entretanto, sem modificar a massa ventricular, o que sugere um efeito cardioprotetor do exercício (Kemi et al, 2004; Wisloff et al, 2002; Wisloff et al, 2001; Craig et al, 1991). De fato, alguns estudos demonstraram que o treinamento físico aeróbio promove redução da hipertrofia e da fibrose cardíaca associado a manutenção do número de cardiomiócitos em ratas jovens ovariectomizadas (Felix et al, 2015; Marques et al, 2006). Entretanto, apesar das adaptações morfológicas, houve apenas um aumento do volume sistólico final ventricular esquerdo (VSFVE) após o treinamento físico, embora tenha ocorrido uma tendência para o aumento do volume diastólico final do ventrículo esquerdo (VDFVE), sugerindo um aumento da capacidade funcional decorrente da melhora do remodelamento cardíaco. No entanto, é importante ressaltar que o exame ecocardiográfico foi realizado com os

animais anestesiados, o que poderia ter influenciado nos resultados dos parâmetros funcionais avaliados.

Nesse contexto, um estudo recente mostrou que o treinamento físico aeróbio promoveu aumento da espessura da parede posterior (EPP) e do diâmetro diastólico e sistólico final do ventrículo esquerdo (DDFVE) sem alterações sobre os parâmetros da função sistólica (Bocalini et al, 2010), entretanto outros autores não observaram alterações nas espessuras do ventrículo esquerdo e da função sistólica (Hydock et al, 2007), outros mostraram um aumento do débito cardíaco após o treinamento físico (Lachance et al, 2009). Contudo, todos esses estudos foram realizados utilizando diferentes modelos experimentais, o que dificulta a comparação com nossos resultados. Apenas dois estudos mostraram em ratas ovariectomizadas redução da espessuras ventriculares (Felix et al, 2015) e um aumento da massa cardíaca e da espessura do septo interventricular (Calvé et al, 2012), sendo que ambos não encontraram alterações na função sistólica após o treinamento físico. Os mecanismos envolvidos entre o treinamento físico e o papel dos hormônios ovarianos sobre os parâmetros morfológicos e funcionais cardíacos não estão esclarecidos, no entanto, estudos mostram que o treinamento físico promove redução dos níveis de Angio-II (Pereira et al, 2009), atenua o drive autonômico simpático cardíaco (Billman et al, 2006), fatores pró-inflamatórios, hipertrofia e a fibrose cardíaca (Liao et al, 2015).

A avaliação da função cardíaca isolada, através da técnica de Langendorff, mostrou um aumento da pressão intraventricular esquerda ao aumento do fluxo após o treinamento físico, o que sugere uma melhora da performance cardíaca nesses animais. Esse resultado corrobora estudos prévios que demonstraram um efeito benéfico do treinamento físico sobre o coração, entretanto utilizando diferentes metodologias (Portes et al, 2009; Wisloff et al, 2002; Wisloff et al, 2001; Pierce et al, 1989; Fuller & Nutter, 1981; Móle, 1978). Os mecanismos envolvidos nessa resposta ainda necessitam de investigação, uma hipótese para explicar esses resultados

seria de que o treinamento físico promove um aumento do número de capilares sanguíneos, aumento do número de mitocôndrias e enzimas antioxidantes promovendo maior suporte de nutrientes e de oxigênio ao tecido cardíaco (Brown et al, 2003; Chrysohoou et al, 2003; Cosmas et al, 1997).

Outro importante achado do presente estudo mostra que houve menores valores de pressão intraventricular esquerda, através da administração de dobutamina após o treinamento físico, de forma semelhante ao tratamento com ME, que poderia ser explicado através da menor expressão dos receptores β -1 adrenérgicos, o que corrobora dados de estudos prévios que mostraram que o treinamento físico reduz a expressão desses receptores, utilizando diferentes abordagens: estímulo de fibras da musculatura papilar isolada com isoproteronol (Takeda et al, 1985); quantificação desses receptores na membrana de células cardíacas, utilizando radioligantes (Werle et al, 1990) e utilizando a técnica de Western Blot no tecido cardíaco (Barbier et al, 2006; Barbier et al, 2004). Esses achados mostram que o treinamento físico de forma semelhante ao tratamento com o ME parece promover uma redução da influência do drive autonômico simpático cardíaco (Souza & Tezini, 2013).

Entretanto, interessante a associação das terapias não promoveu efeitos adicionais nos parâmetros morfológicos e funcionais cardíacos, exceto para o aumento da expressão de receptores β 1-adrenérgicos, o que poderia ser explicado pelo aumento do efeito do tônus simpático sobre o coração desses animais observado em experimentos recentes em nosso laboratório.

Por fim, nossos resultados mostram que o treinamento físico e o tratamento com ME promove benefícios semelhantes na morfologia e na função cardíaca em ratas velhas submetidas à privação precoce dos hormônios ovarianos. Adicionalmente, ambos promovem redução da influência autonômica simpática através da menor expressão de receptores β 1-adrenérgicos. Entretanto, ainda são necessários mais estudos para a identificação dos reais mecanismos

fisiológicos envolvidos nessa questão, apesar de ambos os tratamentos serem considerados importantes estratégias terapêuticas para a redução dos riscos cardiovasculares decorrentes da privação precoce dos hormônios ovarianos associado ao envelhecimento.

Conclusão

8. CONCLUSÃO

A privação precoce dos hormônios ovarianos associada ao envelhecimento promove discretas alterações morfológicas cardíacas. Entretanto, causa importantes alterações na função, caracterizada por menor reatividade do leito coronariano e maior contratilidade ventricular esquerda, evidenciando a importância em longo prazo dos hormônios ovarianos sobre a função vascular e contrátil.

Por outro lado, o treinamento físico e o tratamento com Maleato de Enalapril promovem efeitos semelhantes na morfologia e na redução da contratilidade cardíaca, bem como da expressão de receptores β_1 -adrenérgicos, o que evidencia menor dependência do sistema nervoso autonômico simpático. Tais resultados sugerem que ambos os tratamentos são importantes estratégias terapêuticas para a redução dos riscos cardiovasculares decorrentes da privação precoce dos hormônios ovarianos associada ao envelhecimento.

Referências

9. REFERÊNCIAS

Alecrin IN, Aldrighi JM, Caldas MA, Gebara OC, Lopes NH, Ramires JA. Acute and chronic effects of oestradiol on left ventricular diastolic function in hypertensive postmenopausal women with left ventricular diastolic dysfunction. *Heart*. 2004;90(7):777-81.

Andrews Portes L, Magalhães Saraiva R, Alberta Dos Santos A, Tucci PJ. Swimming training attenuates remodeling, contractile dysfunction and congestive heart failure in rats with moderate and large myocardial infarctions. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009;36(4):394-9.

Antonicelli R, Olivieri F, Morichi V, Urbani E, Mais V. Prevention of cardiovascular events in early menopause: a possible role for hormone replacement therapy. *Int J Cardiol*. 2008;130(2):140-6.

Arbab-Zadeh A, Perhonen M, Howden E, Peshock RM, Zhang R, Adams-Huet B, et al. Cardiac remodeling in response to 1 year of intensive endurance training. *Circulation*. 2014;130(24):2152-61.

Arnal JF, Scarabin PY, Trémollières F, Laurell H, Gourdy P. Estrogens in vascular biology and disease: where do we stand today? *Curr Opin Lipidol*. 2007;18(5):554-60.

Asikainen TM, Kukkonen-Harjula K, Miilunpalo S. Exercise for health for early postmenopausal women: a systematic review of randomised controlled trials. *Sports Med*. 2004;34(11):753-78.

Asikainen TM, Miilunpalo S, Kukkonen-Harjula K, Nenonen A, Pasanen M, Rinne M, et al. Walking trials in postmenopausal women: effect of low doses of exercise and exercise fractionization on coronary risk factors. *Scand J Med Sci Sports*. 2003;13(5):284-92.

Asikainen TM, Suni JH, Pasanen ME, Oja P, Rinne MB, Miilunpalo SI, et al. Effect of brisk walking in 1 or 2 daily bouts and moderate resistance training on lower-extremity muscle strength, balance, and walking performance in women who recently went through menopause: a randomized, controlled trial. *Phys Ther*. 2006;86(7):912-23.

Atsma F, Bartelink ML, Grobbee DE, van der Schouw YT. Postmenopausal status and early menopause as independent risk factors for cardiovascular disease: a meta-analysis. *Menopause*. 2006;13(2):265-79.

Bader M, Ganten D. Update on tissue renin-angiotensin systems. *J Mol Med (Berl)*. 2008;86(6):615-21.

Balt JC, Mathy MJ, Nap A, Pfaffendorf M, van Zwieten PA. Effect of the AT1-receptor antagonists losartan, irbesartan, and telmisartan on angiotensin II-induced facilitation of sympathetic neurotransmission in the rat mesenteric artery. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2001;38(1):141-8.

Barauna VG, Rosa KT, Irigoyen MC, de Oliveira EM. Effects of resistance training on ventricular function and hypertrophy in a rat model. *Clin Med Res*. 2007;5(2):114-20.

Barbier J, Rannou-Bekono F, Marchais J, Berthon PM, Delamarche P, Carré F. Effect of

training on beta1 beta2 beta3 adrenergic and M2 muscarinic receptors in rat heart. *Med Sci Sports Exerc.* 2004;36(6):949-54.

Barbier J, Reland S, Ville N, Rannou-Bekono F, Wong S, Carré F. The effects of exercise training on myocardial adrenergic and muscarinic receptors. *Clin Auton Res.* 2006;16(1):61-5.

Basso N, Cini R, Pietrelli A, Ferder L, Terragno NA, Inserra F. Protective effect of long-term angiotensin II inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293(3):H1351-8.

Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther.* 2010;128(1):191-227.

Billman GE, Kukielka M. Effects of endurance exercise training on heart rate variability and susceptibility to sudden cardiac death: protection is not due to enhanced cardiac vagal regulation. *J Appl Physiol (1985).* 2006;100(3):896-906.

Bocalini DS, Carvalho EV, de Sousa AF, Levy RF, Tucci PJ. Exercise training-induced enhancement in myocardial mechanics is lost after 2 weeks of detraining in rats. *Eur J Appl Physiol.* 2010;109(5):909-14.

Borgo MV, Claudio ER, Silva FB, Romero WG, Gouvea SA, Moysés MR, et al. Hormonal therapy with estradiol and drospirenone improves endothelium-dependent vasodilation in the coronary bed of ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res.* 2016;49(1):e4655.

Brosnihan KB, Weddle D, Anthony MS, Heise C, Li P, Ferrario CM. Effects of chronic hormone replacement on the renin-angiotensin system in cynomolgus monkeys. *J Hypertens.* 1997;15(7):719-26.

Brower GL, Gardner JD, Forman MF, Murray DB, Voloshenyuk T, Levick SP, et al. The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2006;30(4):604-10.

Brown DA, Jew KN, Sparagna GC, Musch TI, Moore RL. Exercise training preserves coronary flow and reduces infarct size after ischemia-reperfusion in rat heart. *J Appl Physiol (1985).* 2003;95(6):2510-8.

Brown NJ, Abbas A, Byrne D, Schoenhard JA, Vaughan DE. Comparative effects of estrogen and angiotensin-converting enzyme inhibition on plasminogen activator inhibitor-1 in healthy postmenopausal women. *Circulation.* 2002;105(3):304-9.

Cabanelas LA, Carbonel AA, dos Santos MA, Simões RS, Liberatori-Filho AW, Baracat EC, et al. [Cardiomyocytes morphology and collagen quantification in the myocardium of female rats treated with isoflavones or estrogens]. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2012;34(10):447-52.

Calvé A, Haddad R, Barama SN, Meilleur M, Sebag IA, Chalifour LE. Cardiac response to doxorubicin and dexrazoxane in intact and ovariectomized young female rats at rest and after swim training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;302(10):H2048-57.

- Cavasin MA, Sankey SS, Yu AL, Menon S, Yang XP. Estrogen and testosterone have opposing effects on chronic cardiac remodeling and function in mice with myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284(5):H1560-9.
- Chang SH, Kim CS, Lee KS, Kim H, Yim SV, Lim YJ, et al. Premenopausal factors influencing premature ovarian failure and early menopause. *Maturitas*. 2007;58(1):19-30.
- Chappell MC, Gallagher, PE, Averill DB, Ferrario CM, Brosnihan, KB. Estrogen or the AT1 antagonist olmesartan reverses the development of profound hypertension in the congenic mRen2.Lewis rat. *Hypertension*. 2003; 42(4):781-6.
- Chrysohoou C, Pitsavos C, Panagiotakos DB, Kokkinos PF, Stefanadis C, Toutouzas P. The association between physical activity and the development of acute coronary syndromes in treated and untreated hypertensive subjects. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2003;5(2):115-20.
- Cocco G, Pandolfi S. Physical exercise with weight reduction lowers blood pressure and improves abnormal left ventricular relaxation in pharmacologically treated hypertensive patients. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2011;13(1):23-9.
- Cosmas AC, Kernan K, Buck E, Fernhall B, Manfredi TG. Exercise and dietary cholesterol alter rat myocardial capillary ultrastructure. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1997;75(1):62-7.
- Cox SL, Ben A, Story DF, Ziogas J. Evidence for the involvement of different receptor subtypes in the pre- and postjunctional actions of angiotensin II at rat sympathetic neuroeffector sites. *Br J Pharmacol*. 1995;114(5):1057-63.
- Coylewright M, Reckelhoff JF, Ouyang P. Menopause and hypertension: an age-old debate. *Hypertension*. 2008;51(4):952-9.
- Cozza IC, Di Sacco TH, Mazon JH, Salgado MC, Dutra SG, Cesarino EJ, et al. Physical exercise improves cardiac autonomic modulation in hypertensive patients independently of angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment. *Hypertens Res*. 2012;35(1):82-7.
- Craig BW, Martin G, Betts J, Lungren M, Lambret V, Kaiserauer S. The influence of training-detaining upon the heart, muscle and adipose tissue of female rats. *Mech Ageing Dev*. 1991;57(1):49-61.
- Cutini PH, Campelo AE, Agriello E, Sandoval MJ, Rauschemberger MB, Massheimer VL. The role of sex steroids on cellular events involved in vascular disease. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2012;132(3-5):322-30.
- Davies CH, Ferrara N, Harding SE. Beta-adrenoceptor function changes with age of subject in myocytes from non-failing human ventricle. *Cardiovasc Res*. 1996;31(1):152-6.
- Dean SA, Tan J, O'Brien ER, Leenen FH. 17beta-estradiol downregulates tissue angiotensin-converting enzyme and ANG II type 1 receptor in female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288(3):R759-66.
- Deschamps AM, Murphy E, Sun J. Estrogen receptor activation and cardioprotection in

ischemia reperfusion injury. *Trends Cardiovasc Med*. 2010;20(3):73-8.

Di Blasio A, Di Donato F, De Stefano A, Gallina S, Granieri M, Napolitano G, et al. Left ventricle relative wall thickness and plasma leptin levels: baseline relationships and effects of 4 months of walking training in healthy overweight postmenopausal women. *Menopause*. 2011;18(1):77-84.

Donaldson C, Eder S, Baker C, Aronovitz MJ, Weiss AD, Hall-Porter M, et al. Estrogen attenuates left ventricular and cardiomyocyte hypertrophy by an estrogen receptor-dependent pathway that increases calcineurin degradation. *Circ Res*. 2009;104(2):265-75, 11p following 75.

dos Santos RL, da Silva FB, Ribeiro RF, Stefanon I. Sex hormones in the cardiovascular system. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2014;18(2):89-103.

Duckles SP, Miller VM. Hormonal modulation of endothelial NO production. *Pflugers Arch*. 2010;459(6):841-51.

Düzenli MA, Ozdemir K, Sokmen A, Soylu A, Aygul N, Gezginc K, et al. Effects of menopause on the myocardial velocities and myocardial performance index. *Circ J*. 2007;71(11):1728-33.

El Hajj MC, Ninh VK, El Hajj EC, Bradley JM, Gardner JD. Estrogen receptor antagonism exacerbates cardiac structural and functional remodeling in female rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2017;312(1):H98-H105.

Endlich PW, Claudio ER, da Silva Gonçalves WL, Gouvêa SA, Moysés MR, de Abreu GR. Swimming training prevents fat deposition and decreases angiotensin II-induced coronary vasoconstriction in ovariectomized rats. *Peptides*. 2013;47:29-35.

Fard A, Wang CY, Takuma S, Skopicki HA, Pinsky DJ, Di Tullio MR, et al. Noninvasive assessment and necropsy validation of changes in left ventricular mass in ascending aortic banded mice. *J Am Soc Echocardiogr*. 2000;13(6):582-7.

Felix AC, Dutra SG, Tezini GC, Simões MV, de Souza HC. Aerobic physical training increases contractile response and reduces cardiac fibrosis in rats subjected to early ovarian hormone deprivation. *J Appl Physiol (1985)*. 2015;118(10):1276-85.

Fuller EO, Nutter DO. Endurance training in the rat. II. Performance of isolated and intact heart. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 1981;51(4):941-7.

Garciarena CD, Pinilla OA, Nolly MB, Laguens RP, Escudero EM, Cingolani HE, et al. Endurance training in the spontaneously hypertensive rat: conversion of pathological into physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension*. 2009; 53(4):708-14.

García MP, Giménez J, Serna M, Salom MG, Bonacasa B, Carbonell LF, et al. Effect of estrogen and angiotensin-converting enzyme inhibitor on vascular remodeling in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Menopause*. 2006;13(3):397-403.

Gilbert EM, Sandoval A, Larrabee P, Renlund DG, O'Connell JB, Bristow MR. Lisinopril lowers cardiac adrenergic drive and increases beta-receptor density in the failing human heart.

Circulation. 1993;88(2):472-80.

Gobatto CA, de Mello MA, Sibuya CY, de Azevedo JR, dos Santos LA, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2001;130(1):21-7.

Gómez AM, Valdivia HH, Cheng H, Lederer MR, Santana LF, Cannell MB, et al. Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure. *Science*. 1997;276(5313):800-6.

Goodman JM, Liu PP, Green HJ. Left ventricular adaptations following short-term endurance training. *J Appl Physiol* (1985). 2005;98(2):454-60.

Gosse P. Left ventricular hypertrophy as a predictor of cardiovascular risk. *J Hypertens Suppl*. 2005;23(1):S27-33.

Guo X, Lu X, Ren H, Levin ER, Kassab GS. Estrogen modulates the mechanical homeostasis of mouse arterial vessels through nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290(5):H1788-97.

Haines CD, Harvey PA, Leinwand LA. Estrogens mediate cardiac hypertrophy in a stimulus-dependent manner. *Endocrinology*. 2012;153(9):4480-90.

Hall JE. Endocrinology of the Menopause. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2015;44(3):485-96.

Harrison-Bernard LM, Schulman IH, Rajj L. Postovariectomy hypertension is linked to increased renal AT1 receptor and salt sensitivity. *Hypertension*. 2003;42(6):1157-63.

Harvey PJ, Morris BL, Miller JA, Floras JS. Estradiol induces discordant angiotensin and blood pressure responses to orthostasis in healthy postmenopausal women. *Hypertension*. 2005;45(3):399-405.

Herichova I, Szantoova K. Renin-angiotensin system: upgrade of recent knowledge and perspectives. *Endocr Regul*. 2013;47(1):39-52.

Hernández I, Delgado JL, Díaz J, Quesada T, Teruel MJ, Llanos MC, et al. 17beta-estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000;279(5):R1599-605.

Hilliard LM, Sampson AK, Brown RD, Denton KM. The "his and hers" of the renin-angiotensin system. *Curr Hypertens Rep*. 2013;15(1):71-9.

Hinderliter AL, Sherwood A, Blumenthal JA, Light KC, Girdler SS, McFetridge J, et al. Changes in hemodynamics and left ventricular structure after menopause. *Am J Cardiol*. 2002;89(7):830-3.

Hinojosa-Laborde C, Craig T, Zheng W, Ji H, Haywood JR, Sandberg K. Ovariectomy augments hypertension in aging female Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension*. 2004;44(4):405-9.

66. Hsia J, Langer RD, Manson JE, Kuller L, Johnson KC, Hendrix SL, et al. Conjugated equine estrogens and coronary heart disease: the Women's Health Initiative. *Arch Intern Med.* 2006;166(3):357-65.
- Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, et al. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA.* 1998;280(7):605-13.
- Husain K, Hernandez W, Ansari RA, Ferder L. Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis. *World J Biol Chem.* 2015;6(3):209-17.
- Hydock DS, Lien CY, Schneider CM, Hayward R. Effects of voluntary wheel running on cardiac function and myosin heavy chain in chemically gonadectomized rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293(6):H3254-64.
- Ichige MH, Santos CR, Jordão CP, Ceroni A, Negrão CE, Michelini LC. Exercise training preserves vagal preganglionic neurones and restores parasympathetic tonus in heart failure. *J Physiol.* 2016;594(21):6241-54.
- Jazbutyte V, Arias-Loza PA, Hu K, Widder J, Govindaraj V, von Poser-Klein C, et al. Ligand-dependent activation of ER{beta} lowers blood pressure and attenuates cardiac hypertrophy in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 2008;77(4):774-81.
- Jazbutyte V, Hu K, Kruchten P, Bey E, Maier SK, Fritzemeier KH, et al. Aging reduces the efficacy of estrogen substitution to attenuate cardiac hypertrophy in female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2006;48(4):579-86.
- Kalantaridou SN, Naka KK, Bechlioulis A, Makrigiannakis A, Michalis L, Chrousos GP. Premature ovarian failure, endothelial dysfunction and estrogen-progestogen replacement. *Trends Endocrinol Metab.* 2006;17(3):101-9.
- Kang LS, Chen B, Reyes RA, Leblanc AJ, Teng B, Mustafa SJ, et al. Aging and estrogen alter endothelial reactivity to reactive oxygen species in coronary arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;300(6):H2105-15.
- Kaye DM, Lefkovits J, Jennings GL, Bergin P, Broughton A, Esler MD. Adverse consequences of high sympathetic nervous activity in the failing human heart. *J Am Coll Cardiol.* 1995;26(5):1257-63.
- Kemi OJ, Haram PM, Wisløff U, Ellingsen Ø. Aerobic fitness is associated with cardiomyocyte contractile capacity and endothelial function in exercise training and detraining. *Circulation.* 2004;109(23):2897-904.
- Knowlton AA, Lee AR. Estrogen and the cardiovascular system. *Pharmacol Ther.* 2012;135(1):54-70.
- Korzick DH, Lancaster TS. Age-related differences in cardiac ischemia-reperfusion injury: effects of estrogen deficiency. *Pflugers Arch.* 2013;465(5):669-85.

- Lachance D, Champetier S, Plante E, Bouchard-Thomassin AA, Roussel E, Couet J, et al. Effects of exercise in volume overload: insights from a model of aortic regurgitation. *Med Sci Sports Exerc.* 2009;41(6):1230-8.
- Lamas AZ, Caliman IF, Dalpiaz PL, de Melo AF, Abreu GR, Lemos EM, et al. Comparative effects of estrogen, raloxifene and tamoxifen on endothelial dysfunction, inflammatory markers and oxidative stress in ovariectomized rats. *Life Sci.* 2015;124:101-9.
- Liao PH, Hsieh DJ, Kuo CH, Day CH, Shen CY, Lai CH, et al. Moderate exercise training attenuates aging-induced cardiac inflammation, hypertrophy and fibrosis injuries of rat hearts. *Oncotarget.* 2015;6(34):35383-94.
- Light KC, Hinderliter AL, West SG, Grewen KM, Steege JF, Sherwood A, et al. Hormone replacement improves hemodynamic profile and left ventricular geometry in hypertensive and normotensive postmenopausal women. *J Hypertens.* 2001;19(2):269-78.
- Lima R, Wofford M, Reckelhoff JF. Hypertension in postmenopausal women. *Curr Hypertens Rep.* 2012;14(3):254-60.
- Lima R, Yanes LL, Davis DD, Reckelhoff JF. Roles played by 20-HETE, angiotensin II and endothelin in mediating the hypertension in aging female spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2013;304(3):R248-51.
- Lobo RA. Surgical menopause and cardiovascular risks. *Menopause.* 2007;14(3 Pt 2):562-6.
- López M, Tena-Sempere M. Estrogens and the control of energy homeostasis: a brain perspective. *Trends Endocrinol Metab.* 2015;26(8):411-21.
- Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol.* 2002;62(4A):609-14.
- Marques CM, Nascimento FA, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguilá MB. Exercise training attenuates cardiovascular adverse remodeling in adult ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Menopause.* 2006;13(1):87-95.
- Martins-Pinge MC, Becker LK, Garcia MR, Zoccal DB, Neto RV, Basso LS, et al. Attenuated pressor responses to amino acids in the rostral ventrolateral medulla after swimming training in conscious rats. *Auton Neurosci.* 2005;122(1-2):21-8.
- McKinley MJ, Albiston AL, Allen AM, Mathai ML, May CN, McAllen RM, et al. The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. *Int J Biochem Cell Biol.*
- Menazza S, Murphy E. The Expanding Complexity of Estrogen Receptor Signaling in the Cardiovascular System. *Circ Res.* 2016;118(6):994-1007.
- Micheline LC, Stern JE. Exercise-induced neuronal plasticity in central autonomic networks: role in cardiovascular control. *Exp Physiol.* 2009;94(9):947-60.
- Molé PA. Increased contractile potential of papillary muscles from exercise-trained rat hearts. *Am J Physiol.* 1978;234(4):H421-5.

- Moodithaya SS, Avadhany ST. Comparison of cardiac autonomic activity between pre and post menopausal women using heart rate variability. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2009;53(3):227-34.
- Moriyama CK, Oneda B, Bernardo FR, Cardoso CG, Forjaz CL, Abrahao SB, et al. A randomized, placebo-controlled trial of the effects of physical exercises and estrogen therapy on health-related quality of life in postmenopausal women. *Menopause*. 2008;15(4 Pt 1):613-8.
- Morrison DA, Boyden TW, Pamenter RW, Freund BJ, Stini WA, Harrington R, et al. Effects of aerobic training on exercise tolerance and echocardiographic dimensions in untrained postmenopausal women. *Am Heart J*. 1986;112(3):561-7.
- Nunez E, Hosoya K, Susic D, Frohlich ED. Enalapril and losartan reduced cardiac mass and improved coronary hemodynamics in SHR. *Hypertension*. 1997;29(1 Pt 2):519-24.
- O'Donnell E, Floras JS, Harvey PJ. Estrogen status and the renin angiotensin aldosterone system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014;307(5):R498-500.
- Ocaranza MP, Godoy I, Jalil JE, Varas M, Collantes P, Pinto M, et al. Enalapril attenuates downregulation of Angiotensin-converting enzyme 2 in the late phase of ventricular dysfunction in myocardial infarcted rat. *Hypertension*. 2006;48(4):572-8.
- Ozdemir K, Celik C, Altunkeser BB, Içli A, Albeni H, Düzenli A, et al. Effect of postmenopausal hormone replacement therapy on cardiovascular performance. *Maturitas*. 2004;47(2):107-13.
- Pardini D. [Hormone replacement therapy in menopause]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2014;58(2):172-81.
- Parker WH, Jacoby V, Shoupe D, Rocca W. Effect of bilateral oophorectomy on women's long-term health. *Womens Health (Lond)*. 2009;5(5):565-76.
- Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev*. 2006;86(3):747-803.
- Pechánová O, Bernátová I, Pelouch V, Simko F. Protein remodelling of the heart in NO-deficient hypertension: the effect of captopril. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29(12):3365-74.
- Pechánová O, Zicha J, Paulis L, Zenebe W, Dobesová Z, Kojsová S, et al. The effect of N-acetylcysteine and melatonin in adult spontaneously hypertensive rats with established hypertension. *Eur J Pharmacol*. 2007;561(1-3):129-36.
- Pedram A, Razandi M, Aitkenhead M, Levin ER. Estrogen inhibits cardiomyocyte hypertrophy in vitro. Antagonism of calcineurin-related hypertrophy through induction of MCIP1. *J Biol Chem*. 2005;280(28):26339-48.
- Pedram A, Razandi M, Narayanan R, Dalton JT, McKinsey TA, Levin ER. Estrogen regulates histone deacetylases to prevent cardiac hypertrophy. *Mol Biol Cell*. 2013;24(24):3805-18.

- Pedram A, Razandi M, O'Mahony F, Lubahn D, Levin ER. Estrogen receptor-beta prevents cardiac fibrosis. *Mol Endocrinol*. 2010;24(11):2152-65.
- Pereira MG, Ferreira JC, Bueno CR, Mattos KC, Rosa KT, Irigoyen MC, et al. Exercise training reduces cardiac angiotensin II levels and prevents cardiac dysfunction in a genetic model of sympathetic hyperactivity-induced heart failure in mice. *Eur J Appl Physiol*. 2009;105(6):843-50.
- Pierce GN, Sekhon PS, Meng HP, Maddaford TG. Effects of chronic swimming training on cardiac sarcolemmal function and composition. *J Appl Physiol* (1985). 1989;66(4):1715-21.
- Robles NR, Cerezo I, Hernandez-Gallego R. Renin-angiotensin system blocking drugs. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2014;19(1):14-33.
- Rodriguez M, Shoupe D. Surgical Menopause. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2015;44(3):531-42.
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2002;288(3):321-33.
- Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation*. 1978;58(6):1072-83.
- Santos WV, Pereira LM, Mandarim-de-Lacerda CA. The effect of enalapril on the cardiac remodelling in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Int J Exp Pathol*. 2004;85(5):287-94.
- Sassarini J, Lumsden MA. Oestrogen replacement in postmenopausal women. *Age Ageing*. 2015;44(4):551-8.
- Sayer G, Bhat G. The renin-angiotensin-aldosterone system and heart failure. *Cardiol Clin*. 2014;32(1):21-32, vii.
- Schlaich MP, Lambert E, Kaye DM, Krozowski Z, Campbell DJ, Lambert G, et al. Sympathetic augmentation in hypertension: role of nerve firing, norepinephrine reuptake, and Angiotensin neuromodulation. *Hypertension*. 2004;43(2):169-75.
- Seals DR, Esler MD. Human ageing and the sympathoadrenal system. *J Physiol*. 2000;528(Pt 3):407-17.
- Sigusch HH, Campbell SE, Weber KT. Angiotensin II-induced myocardial fibrosis in rats: role of nitric oxide, prostaglandins and bradykinin. *Cardiovasc Res*. 1996;31(4):546-54.
- Skrzypiec-Spring M, Grotthus B, Szelag A, Schulz R. Isolated heart perfusion according to Langendorff---still viable in the new millennium. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2007;55(2):113-26.

- Souza HC, Tezini GC. Autonomic Cardiovascular Damage during Post-menopause: the Role of Physical Training. *Aging Dis.* 2013;4(6):320-8.
- Stice JP, Chen L, Kim SC, Jung JS, Tran AL, Liu TT, et al. 17 β -Estradiol, aging, inflammation, and the stress response in the female heart. *Endocrinology.* 2011;152(4):1589-98.
- Taddei S. Blood pressure through aging and menopause. *Climacteric.* 2009;12 Suppl 1:36-40.
- Takahashi TA, Johnson KM. Menopause. *Med Clin North Am.* 2015;99(3):521-34.
- Takeda N, Dominiak P, Türck D, Rupp H, Jacob R. The influence of endurance training on mechanical catecholamine responsiveness, beta-adrenoceptor density and myosin isoenzyme pattern of rat ventricular myocardium. *Basic Res Cardiol.* 1985;80(1):88-99.
- Tazumi S, Yokota N, Kawakami M, Omoto S, Takamata A, Morimoto K. Effects of estrogen replacement on stress-induced cardiovascular responses via renin-angiotensin system in ovariectomized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2016;311(5):R898-R905.
- Teichholz LE, Kreulen T, Herman MV, Gorlin R. Problems in echocardiographic volume determinations: echocardiographic-angiographic correlations in the presence of absence of asynergy. *Am J Cardiol.* 1976;37(1):7-11.
- Tivesten A, Bollano E, Nyström HC, Alexanderson C, Bergström G, Holmäng A. Cardiac concentric remodelling induced by non-aromatizable (dihydro-)testosterone is antagonized by oestradiol in ovariectomized rats. *J Endocrinol.* 2006;189(3):485-91.
- Torrealday S, Pal L. Premature Menopause. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2015;44(3):543-57.
- Tostes RC, Nigro D, Fortes ZB, Carvalho MH. Effects of estrogen on the vascular system. *Braz J Med Biol Res.* 2003;36(9):1143-58.
- Tsao CW, Gona PN, Salton CJ, Chuang ML, Levy D, Manning WJ, et al. Left Ventricular Structure and Risk of Cardiovascular Events: A Framingham Heart Study Cardiac Magnetic Resonance Study. *J Am Heart Assoc.* 2015;4(9):e002188.
- Vitale C, Fini M, Speziale G, Chierchia S. Gender differences in the cardiovascular effects of sex hormones. *Fundam Clin Pharmacol.* 2010;24(6):675-85.
- Voloshenyuk TG, Gardner JD. Estrogen improves TIMP-MMP balance and collagen distribution in volume-overloaded hearts of ovariectomized females. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;299(2):R683-93.
- Vongpatanasin W. Autonomic regulation of blood pressure in menopause. *Semin Reprod Med.* 2009;27(4):338-45.
- Wang H, Jessup JA, Zhao Z, Da Silva J, Lin M, MacNamara LM, et al. Characterization of the cardiac renin angiotensin system in oophorectomized and estrogen-replete mRen2.Lewis rats. *PLoS One.* 2013;8(10):e76992.

- Wellons M, Ouyang P, Schreiner PJ, Herrington DM, Vaidya D. Early menopause predicts future coronary heart disease and stroke: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Menopause*. 2012;19(10):1081-7.
- Werle EO, Strobel G, Weicker H. Decrease in rat cardiac beta 1- and beta 2-adrenoceptors by training and endurance exercise. *Life Sci*. 1990;46(1):9-17.
- Wichi R, Malfitano C, Rosa K, De Souza SB, Salemi V, Mostarda C, et al. Noninvasive and invasive evaluation of cardiac dysfunction in experimental diabetes in rodents. *Cardiovasc Diabetol*. 2007;6:14.
- Wisløff U, Loennechen JP, Currie S, Smith GL, Ellingsen Ø. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca²⁺ sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2002;54(1):162-74.
- Wisløff U, Loennechen JP, Falck G, Beisvag V, Currie S, Smith G, et al. Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. *Cardiovasc Res*. 2001;50(3):495-508.
- Who. Research on the menopause in the 1990s. Report of a WHO Scientific Group World Health Organ Tech Rep Ser. 1996;866:1-107.
- Wu M, Han M, Li J, Xu X, Li T, Que L, et al. 17beta-estradiol inhibits angiotensin II-induced cardiac myofibroblast differentiation. *Eur J Pharmacol*. 2009;616(1-3):155-9.
- Wu Q, Zhao Z, Sun H, Hao YL, Yan CD, Gu SL. Oestrogen changed cardiomyocyte contraction and beta-adrenoceptor expression in rat hearts subjected to ischaemia-reperfusion. *Exp Physiol*. 2008;93(9):1034-43.
- Xing D, Nozell S, Chen YF, Hage F, Oparil S. Estrogen and mechanisms of vascular protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(3):289-95.
- Xu X, Zhao W, Wan W, Ji LL, Powers AS, Erikson JM, et al. Exercise training combined with angiotensin II receptor blockade reduces oxidative stress after myocardial infarction in rats. *Exp Physiol*. 2010;95(10):1008-15.
- Yoshida H, Rosano G, Shimizu M, Mochizuki S, Yoshimura M. Gender differences in the effects of angiotensin receptor blockers on cardiovascular disease. *Curr Pharm Des*. 2011;17(11):1090-4.
- Yung LM, Wong WT, Tian XY, Leung FP, Yung LH, Chen ZY, et al. Inhibition of renin-angiotensin system reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in estrogen deficient rats. *PLoS One*. 2011;6(3):e17437.
- Zhu Y, Bian Z, Lu P, Karas RH, Bao L, Cox D, et al. Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor beta. *Science*. 2002;295(5554):505-8.
- Zicha J, Dobesová Z, Kunes J. Antihypertensive mechanisms of chronic captopril or N-acetylcysteine treatment in L-NAME hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2006;29(12):1021-7.

Zimmerman MA, Sullivan JC. Hypertension: what's sex got to do with it?. *Physiology (Bethesda)*. 2013;8(4):234-44.

Anexo

ANEXO

PHYSICAL TRAINING PROMOTES SIMILAR EFFECTS TO THE BLOCKADE OF ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME ON THE CARDIAC MORPHOLOGY AND FUNCTION IN OLD FEMALE RATS SUBJECTED TO PREMATURE OVARIAN FAILURE

Ana Carolina S. Felix¹, Sabrina G.V. Dutra¹, Ada C. Gastaldi¹, Pâmela C. Bonfim¹,
Suenimeire Vieira¹, Hugo Celso Dutra de Souza¹

¹ Department of Physiology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

***Corresponding author:**

Hugo C.D. Souza, Ph.D.
Medical School of Ribeirão Preto
University of São Paulo
14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil
TEL: 55-16-3602 4416
FAX: 55-16-3602 4413
E-mail: hugocds@fmrp.usp.br

ABSTRACT

We investigated the effects of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition and aerobic physical training on the heart of old female rats (82-wk-old) submitted to premature ovarian failure (10-wk-old). We used different approaches: morphology and function by echocardiography, reactivity of the coronary bed and left ventricular contractility (Langendorff Technique). Female Wistar ovariectomized (OVX) rats (n=42) were assigned to one of four groups: OVX, vehicle treated only; OVX-EM, Enalapril Maleate only (EM, 10mg.kg⁻¹.d⁻¹); OVX-T, aerobic trained only; and OVX-EMT, treated with Enalapril Maleate and aerobic trained. Both Enalapril Maleate treatment and aerobic training were done in the last 20 weeks of the experimental protocol. When compared to the OVX group, the OVX-EM group showed lower values of wall thickness and left ventricular (LV) mass, lower values of coronary bed reactivity and reduced maximum response of LV contractility to dobutamine, while the OVX-T group showed lower values of LV wall thickness, increase in end-systolic volume, reduced maximum response of LV contractility to dobutamine, and left intraventricular pressure due to increased flow. The combination of treatments (EM and aerobic physical training) did not promote additional important effects on the parameters evaluated.

Our results suggest similar beneficial effects of physical training and EM treatment on the morphology and cardiac function in old female rats submitted to premature ovarian failure. Although the causes of these benefits are still unknown, both treatments have promoted a decrease in cardiac contractility, and the reduced β 1-adrenergic sensitivity suggests that both treatments may attenuate the sympathetic effect on the heart.

Keywords: ovarian hormones, aging, angiotensin-converting enzyme, physical training, morphology, cardiac function.

ABBREVIATIONS

PWT, posterior wall thickness; IVST, interventricular septum thickness; RWT, relative wall thickness; LVEDD, left ventricular end-diastolic diameter; LVESD, left ventricular end-systolic diameter; LV, left ventricular; SAP, systolic arterial pressure; DAP, diastolic arterial pressure; MAP, mean arterial pressure; HR, heart rate; LVEDV, left ventricular end-diastolic volume; LVESV, left ventricular end-systolic volume; $dP/dT_{\max}$, maximal systolic contraction velocity; $dP/dT_{\min}$, maximal diastolic relaxation velocity.

1. INTRODUCTION

Ovarian hormones, especially estrogens, play an important role in various tissues and physiological systems, contributing to body homeostasis (MILLER & DUCKLES, 2008; WEND et al., 2012; do SANTOS et al., 2014; JIA et al., 2015).

Of all their actions, the cardiovascular protection is outstanding, since after the occurrence of menopause there is a significant increase in the incidence of several diseases, such as arterial hypertension, acute myocardial infarction, heart failure and cerebrovascular accident (KANNEL et al., 1976; AT SMA et al., 2006; ANTONICELLI et al., 2008; XING et al., 2009; KNOWTON & LEE, 2012; KNOWTON & KORZICK, 2014). In fact, a few authors point out that these hormones are of such importance to the cardiovascular system that the risks are higher the earlier menopause occurs (VAN DER SCHOUW et al., 1996; AT SMA et al., 2006; LOBO, 2007; SUKUR et al., 2014; RODRIGUEZ & SHOUPE, 2015).

However, the causes of increased cardiovascular risk are still uncertain. Some studies suggest that the decline of ovarian function might promote cardiac morphological alterations (HAINES et al., 2012; KWON et al., 2013; PEDRAM et al., 2013) characterized, mainly, by increased cardiac fibrosis and reduction of left ventricular mass, leading to impairments in cardiac functional parameters, which would justify the greater occurrence of cardiovascular events after menopause (PEDRAM et al., 2010; VOLOSHENYUK & GARDNER, 2010; FELIX et al., 2015).

Thus, it is increasingly necessary to search for pharmacological and non-pharmacological therapies in order to attenuate the effects from the decline of the ovarian hormones production. This is specially important due to the fact that the results from the use of hormone replacement therapy on the cardiovascular system are controversial and, in some cases, worrisome (HULLEY et al., 1998; ROSSOW et al., 2002; PARDINI, 2014, SASSARINI & LUMSDEN, 2015).

Regarding pharmacological approaches, some authors have shown that estrogens and the renin-angiotensin system (RAS) have an inverse relationship (DESCHAMPS et al., 2010; KORZICK & LANCASTER, 2013; do SANTOS et al., 2014, LÓPEZ & TENA-SEMPERE, 2015), suggesting a greater participation of this endocrine system in the morphofunctional cardiovascular alterations due to the decline of ovarian function. Thus, the use of RAS system's inhibitors, as a therapeutic target for the control, prevention and treatment of cardiovascular diseases, associated with the reduction of ovarian function, should be considered.

In addition, there is evidence that inhibition of the angiotensin converting enzyme (ACE) promote, among other effects, the reduction of the plasminogen activator inhibitor (PAI-I), the main element involved in the formation of atherosclerosis in vessels (BROWN et al., 2002). The effects of inhibition of RAS on cardiac morphology and function due to ovarian failure have not yet been established. At the same time, lifestyle modifications, such as regular physical exercise, especially aerobic exercise, are also often recommended as main or adjuvant therapy to minimize cardiovascular risks and general symptoms of reduced ovarian function (ASIKAINEN et al., 2006; MORIYAMA et al., 2008). Based on solid evidence, it is agreed that aerobic physical exercise offers benefits to the cardiovascular system, promoting important morphological and functional cardiac adaptations, such as reduction of cardiac fibrosis associated with beneficial cardiac remodeling, and improvement in left ventricular function (MORRISON et al., 1986; GOODMAN et al., 2005; MARQUES et al., 2006; GARCIARENA et al., 2009; BOCALINI et al., 2010; XU et al., 2010; COCCO et al., 2011; DI BLASIO et al., 2011; FELIX et al., 2015), in addition to a series of autonomic and hemodynamic cardiovascular benefits (IRIGOYEN et al., 2005; TEZINI et al., 2009; SILVEIRA et al., 2011; COZZA et al., 2012; TEZINI et al., 2013).

Taking this information into account, our hypothesis is that chronic treatment with an ACE inhibitor will bring long-term benefits to cardiac morphology and function, and, these

benefits will be enhanced when the treatment is associated with aerobic physical training, in female rats. Therefore, our objective was to investigate the effects of aerobic physical training and chronic inhibition of the angiotensin-converting enzyme using treatment with Enalapril Maleate (EM) on the morphology and cardiac function of old female rats submitted to early ovarian failure through ovariectomy at 10 weeks of life.

2. METHODS

2.1. Animals

Female Wistar rats (82 week old) were submitted to ovariectomy (OVX) in the 10th week of life and were supplied by the Animal Facility of the Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Brazil. The rats were housed in a room with a strictly controlled temperature ($21 \pm 1^{\circ}\text{C}$) and a 12-h light/dark cycle with unrestricted access to tap water and standard rat chow (Nuvilab CR-1, Nuvital, Brazil).

All of the experimental protocols performed in the current study were approved by the Committee on Animal Research and Ethics of the Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (Protocol # 167/2013).

2.2. Experimental Groups

The animals (N=42) were initially subjected to ovariectomy (OVX) surgery and were assigned to one of 4 experimental groups as follows: Vehicle treated only (OVX, N=14), EM ($10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) treated only (OVX-EM, N=14), aerobic trained only (OVX-T, N=14) and EM treated and aerobic trained (OVX-EMT, N=14). The treatment with Enalapril Maleate and the physical training were done in the last 20 weeks of the experimental protocol (from 62 to 82 weeks of age).

2.2.1. Ovariectomy

The rats were anesthetized with ketamine and xylazine (80 mg/kg and 10 mg/kg, i.p., respectively) and a small abdominal incision was made. The ovaries were then located, and a silk thread was tightly tied around the oviduct, including the ovarian blood vessels. The oviduct was sectioned and the ovary was removed. The contralateral ovary was removed in a similar manner. The skin and muscle wall were then sutured with silk thread. All animals received prophylactic antibiotic therapy (penicillin G procaine, 4000 IU/kg, IM) following the surgical procedure. The rats were housed individually, and a 2-week post-surgical recovery period followed. Next, the rats were housed in groups of 3 per cage (60 x 50 x 22 cm, Insight Ltda, Brazil). Daily vaginal smears were collected from all rats (MARCONDES et al., 2002). This procedure allowed for the phase of the oestrus cycle to be determined by daily analysis of the types of cells that sloughed off of the vaginal epithelium. With this approach, 4 different stages can be observed as follows: proestrus (nucleated epithelial cells), oestrus (cornified cells), metoestrus (some cornified cells in addition to nucleated cells and a large number of leukocytes) and dioestrus (leukocyte infiltration). Thus, collected vaginal fluid was placed on glass slides and examined by light microscopy (40x). The absence of the oestrous cycle was confirmed by a permanent diestrus phase.

2.2.2. Enalapril Maleate treatment

The solution concentration used for the Enalapril Maleate treatment by oral route was calculated by dividing the average daily intake of water (four rats per cage) by the body weight of the animals. Enalapril $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ was chosen based on results from previous studies showing that this dose promotes better responses in remodeling and cardiovascular function using different experimental models (OCARANZA et al., 2006; YUNG et al., 2011). Water

consumption and body weight were checked weekly in order to adjust the Enalapril Maleate dose.

2.2.3. Physical Training

The rats in the training groups underwent a protocol of aerobic physical training that consisted of swimming sessions in a glass tank (100 cm long × 80 cm wide × 80 cm high), which allowed for the simultaneous training of 6 animals. The tank was filled with 50 cm of warm water (30 ± 2 °C), which was changed after every group training session. The training program was conducted in 2 different stages over a total of 20 weeks (from 62 to 82 weeks of age). The first stage consisted of a 2-week adaptation period, during which the session length was gradually increased from 5 to 30 minutes per day, 5 times per week (in increments of 5 min per day). The second stage consisted of 18 weeks, with 30 minutes physical training sessions conducted 5 times per week. To evaluate physical training intensity, blood was collected from the tail vein of the animals at the 5th, 10th, 18th weeks immediately before and after the 30-minute exercise sessions, and the lactate concentration was measured (Accutrend® Plus, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The expected lactate level ranged from 5.5 to 6 mmol/L, as previously determined (GOBATTO et al., 2001). If the animals did not achieve the expected lactate concentration, the level of training exertion was increased by fastening an impermeable, lead-containing Velcro strap to the chest to increase body weight by 2 to 6% (GOBATTO et al., 2001).

2.3. Experimental Protocol

2.3.1. Echocardiography

At 82 weeks of age, the rats were evaluated by echocardiography via an ultrasound Vevo 2100® High-Resolution Imaging System (VisualSonics, Toronto, ON, Canada) with a high-resolution transducer at 21 MHz. For this procedure, the anterior regions of the thorax had been previously trichotomized (Veet®, Reckitt Benckiser, São Paulo, SP, Brazil), and all animals were anesthetized with 1.5% isoflurane supplemented with 1% O₂ and placed on a heated (37°C) platform. Electrocardiogram and platform temperature were monitored.

High-resolution B-mode and M-mode images were acquired. Wall thicknesses and left ventricle dimensions were obtained from a short-axis view at the level of the papillary muscles. Diastolic measurements were performed at the point of greatest cavity dimension, and systolic measurements were conducted at the point of minimal cavity dimension. All measurements were performed according to the standards of the American Society of Echocardiography (SAHN et al., 1978) by a single individual who was blind to the characteristics of each group.

The following parameters were obtained from the images: interventricular septum thickness (IVST), posterior wall thickness (PWT), end-diastolic diameter of the left ventricle (LVEDD) and end-systolic diameter of the left ventricle (LVESD). The shortening fraction was calculated as follows: $FS (\%) = [(LVEDD - LVESD) \div LVEDD] \times 100$, and the ejection fraction (EF) was calculated according to Teicholz as follows: $[(LVEDV - LVESV) \div LVEDV] \times 100$ (TEICCHOLZ et al., 1976). The left ventricle mass (LV mass/final body weight) was obtained with the following formula: $1.047 \times [(LVEDD + PWT + IVST)^3 - (LVEDD)^3]$ (LITWIN et al., 1994), and the relative wall thickness (RWT) was calculated as follows: $(2 \times PWT \div LVEDD)$ (QU et al., 2000; WICHI et al., 2007). For the quantifications of left ventricular volumes, the following formula was used for Left ventricular end diastolic volume $LVEDV (\mu L) = (LVEDD^3 \times (7 \div 2.4 + LVEDD^3))$ and Left ventricular end systolic volume $LVESV (\mu L) = (LVESD^3 \times (7 \div 2.4 + LVESD^3))$ (TEICCHOLZ et al., 1976).

2.3.2. Recording of arterial pressure and heart rate

Forty-eight hours after the echocardiographic exam, the animals were anesthetized with ketamine and xylazine (80 mg/kg and 10 mg/kg, i.p., respectively) and polyethylene catheter made in our laboratory (PE-50 soldered to PE-10; Intramedic, Clay Adams, Parsippany, NJ, USA) were implanted into the left femoral artery for the subsequent recording of hemodynamic parameters, systolic arterial pressure (SAP), diastolic arterial pressure (DAP), mean arterial pressure (MAP). Catheters were tunnelled subcutaneously and exteriorized at the nape. To prevent blood from clotting, the catheters were filled with a heparinized saline solution (500 IU/mL).

The arterial pulse pressure was measured in conscious rats that were kept in a quiet environment. Arterial pressure (AP) was recorded with a pressure transducer (ADInstruments - MLT0380) and the amplified signal (ADInstruments - ML110) was fed to a computer acquisition system (LabChart 7 Pro). MAP and heart rate (HR) were calculated from arterial pulse pressure.

2.3.3. Preparation of isolated hearts for perfusion - Langendorff technique

For the isolation and perfusion of hearts, the animals were anesthetized with ketamine and xylazine (80 mg/kg and 10 mg/kg, i.p., respectively), and heparin (5000 UI/kg.). After decapitation, the hearts were perfused (8ml/g) with a Krebs-Henseleit solution containing (mM/L): NaCl 118.4, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, MgSO₄·7H₂O 1.2, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, and glucose 11.2 and pyruvic acid 2.0. The Krebs solution was gassed with a combination of 95% O₂ and 5% CO₂ at 37°C (SKRZPIEC-SPRING et al., 2007).

The coronary perfusion pressure and the left intraventricular were measured via a latex balloon inserted in the left ventricle, respectively. Two pressure transducers, previously calibrated, were used for the quantification of these parameters (MLT844, ADInstruments,

Bella Vista, Australia). The records of the coronary perfusion pressure and intraventricular pressure were obtained using a data acquisition system (PowerLab 8/35, Chart8, ADInstruments, Bella Vista, Australia).

The experimental protocol lasted 1 hour. Following 10 minutes of baseline stabilization, the evaluation of the reactivity in the coronary bed was initiated by increasing the basal flow rate gradually by 20% every 2 minutes, until it reached 200%. For each flow rate, the following parameters were recorded; coronary perfusion pressure, maximum left intraventricular pressure, maximal systolic contraction velocity ($dP/dT_{\max}$) and maximal diastolic relaxation velocity ($dP/dT_{\min}$).

Subsequently, after a 10 minute-stabilization, the evaluation of the β -adrenergic receptor sensitivity was performed, using the cardiac dose-response curve and the maximum intraventricular pressure response obtained by the administration of dobutamine (β_1 -adrenergic agonist) and salbutamol (β_2 -adrenergic agonist) increasing *in bolus* rate (0.25 to 100 nmoles of dobutamine, 0.25 to 15 nmoles of salbutamol) at 2-minute intervals.

2.4. Statistical Analysis

The results are shown as the mean $\pm$ SEM (standard error of the mean). The effects of Enalapril Maleate treatment and physical training were assessed by two-way analysis of variance (ANOVA). When appropriate, post hoc comparisons were performed using Student-Newman-Keuls's test. The reactivity of the coronary vascular bed and dose-response curves of cardiac contractility, after the administration of dobutamine and salbutamol, were analyzed with a multivariate repeated-measures model, and when appropriate, post hoc comparisons were performed. Differences were considered significant at $p < 0.05$. All statistical tests were performed using the BioEstat 5.0 and SigmaStat 3.5 software (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

3. RESULTS

3.1. Cardiac Morphology

As seen in Table 1, all groups showed similar values for body weight, heart weight and relative heart weight, and the OVX group showed higher values for PWT, IVST, RWT and LV mass, when compared to the other groups. Table 2 shows the values of morphological parameters normalized by body weight. When compared to the OVX group, the groups treated with Enalapril Maleate, OVX-EM and OVX-EMT, showed lower values for PWT, IVST, RWT and for relative heart mass while the OVX-T group showed lower values for PWT, IVST.

3.2. Cardiac Function

Table 3 shows the cardiac hemodynamics and functional parameters obtained by recording AP and echocardiography respectively. The groups treated with Enalapril Maleate, OVX-EM and OVX-EMT showed lower values of SAP and MAP, when compared to the OVX and OVX -T groups. The results of echocardiographic examination show that the OVX-EM group did not differ from the OVX group, while the OVX-T group showed higher values for left ventricular end systolic volume (LVESV), while the OVX-EMT group showed the lowest LVESV compared to the OVX-T group, and increased ejection fraction values and fractional shortening when compared to OVX-EM and OVX-T groups.

3.3. Flow - induced Reactivity of the coronary bed

Figures 1A and 1B show the results of flow-induced increase of the coronary perfusion pressure and the maximum left intraventricular pressure, respectively. The OVX-EM group showed lower coronary perfusion pressure values in higher flow values (40, 60 and 80%) when

compared to the OVX group (Figure 1A), while the OVX-T group showed higher intraventricular pressure values when the flow rates were higher, when compared to the OVX group (Figure 1B).

Figure 2A and 2B show the results of increased coronary blood flow for the $dP/dT_{\max}$ and $dP/dT_{\min}$, respectively. The OVX-EM group had lower $dP/dT_{\max}$ in all flow values when compared to the OVX group (Figure 2A), and decreased values for $dP/dT_{\min}$ only for the basal flow (Figure 2B).

3.4. Cardiac β -adrenergic receptors Sensitivity

Figures 3A and 3B show the dose-response curves of the left intraventricular pressure (Δ variations) after the administration of dobutamine and salbutamol, respectively, while Figures 3C and 3D show the maximal intraventricular pressure responses for each agonist. All groups showed dose-response curves that were similar for both agonists. However, the OVX-T, OVX-EM and OVX-EMT groups showed decreased maximum response to dobutamine intraventricular pressure, when compared to the OVX group.

4. DISCUSSION

Our findings show that treatment with Enalapril Maleate or physical training attenuated the cardiac remodeling observed in old female rats with premature ovarian failure, however, no significant changes in cardiac function (in vivo) was observed. On the other hand, the cardiac function evaluated by the Langendorff technique (in vitro) revealed that Enalapril Maleate treatment decreased the coronary bed reactivity and the $dP/dT_{\max}$ during the higher flow, while physical activity increased flow-induced left intraventricular pressure. All treated groups presented lower maximum response to dobutamine, when compared to the non-treated group.

The groups treated with Enalapril Maleate showed decreased SAP and MAP, and this result was not observed in the group undergoing physical training only. The increased incidence of hypertension after ovarian failure has been described in the literature (HINOJOSA-LABORDE et al., 2004; COYLEWRIGHT et al., 2008; TADDEI., 2009; LIMA et al., 2012), and the cause of this increase seems related to numerous factors linked to ovarian hormone deprivation, including the hyperactivity of the renin-angiotensin system (RAS) (SOUZA & TEZINI, 2013; O'DONNELL et al, 2014). However, the association with physical training did not potentiate this response, going in the opposite direction of clinical outcomes described in hypertensive individuals (COZZA et al., 2012). This finding highlights the inverse relationship of ovarian hormones and the activation of RAS, as well as their participation in the pathogenesis of hypertension and cardiovascular risk after menopause. The mechanisms responsible for this action remain unclear, however, treatment with Enalapril Maleate showed some important cardiac effects, such as, cardiac remodeling characterized by reduced wall thickness and left ventricular mass, indicating an anti-hypertrophic effect of ACE inhibition. These finding corroborates experimental studies and clinical trials that have demonstrated the trophic effect of angiotensin II on the heart (BASSO et al., 2007; BADER & GANDE, 2008; COZZA et al., 2012; LIMA et al., 2013; ROBLES et al., 2014). However, despite these morphological changes, the evaluation of cardiac functional parameters, with the use of two-dimensional echocardiography, did not reveal any changes. On the other hand, the in vitro cardiac evaluation of the functional and vascular parameters, using the Langendorff technique, showed that the treatment with Enalapril Maleate promoted lower coronary perfusion pressure-induced flow, indicating low vascular bed resistance. The cause for this finding remains unclear, however, some studies with young ovariectomized rats show improvement in vascular remodeling and in endothelial function after ACE inhibitor treatment (GARCIA et al., 2006; YUNG et al., 2011), most likely due to the increase of vasodilators factors, including nitric oxide (SIGUSCH et al.;

1996; BROSNIHAN et al., 1997; PECHÁŇOVÁ et al., 1997; ZICHA et al., 2006; PECHÁŇOVÁ et al., 2007).

In addition, our findings show that treatment with Enalapril Maleate promoted decreased values of dP/dT_{max} , regardless of association to physical training. This result needs to be investigated further, but it may be due to the low perfusion pressure observed in these animals.

For the sensitivity of β -adrenergic receptors, the lower left ventricular maximum pressure induced by the administration of dobutamine may indicate a lower sensitivity and/or expression of β_1 -adrenergic receptors. The cause for this effect remains unclear, but it may involve hemodynamic aspects, such as reduced cardiac work due to the reduction in AP and neuroendocrine aspects involving the cardiac autonomic regulation. This regulation is characterized by reduction in sympathetic autonomic drive, previously discussed by other authors, using different experimental models (McKINLEY et al., 2003; PAUL et al., 2006; HERICHOVA & SZANTOOVA, 2013). Studies have shown evidence that ACE inhibition promote benefits on hemodynamics and cardiac remodeling, as well as reduction in cardiac sympathetic autonomic drive, by indirect means, and directly through the Angio II action modulation in central nuclei, that are responsible for the cardiac autonomic control (McKINLEY et al., 2003; PAUL et al., 2006; HERICHOVA & SZANTOOVA, 2013), or by reducing the release of norepinephrine through presynaptic endings of adrenergic neurons (GILBERT et al., 1993; COX et al., 1995; BALT et al., 2001). However, despite evidence of the important relationship between ovarian hormones and the RAS, interfering with the cardiac morphology and functionality, new studies should be designed with the objective of identifying the mechanisms involved.

On the other hand, the aerobic physical training also promoted reduction of the wall thickness, however, without changing the left ventricular mass, suggesting a cardioprotective

effect related to adverse cardiac remodeling (CRAIG et al., 1991; WISLOFF et al., 2001; WISLOFF et al., 2002; KEMI et al., 2004). In fact, some studies demonstrate that aerobic physical training promote the reduction of hypertrophy and cardiac fibrosis, associated with greater preservation of the number of cardiomyocytes in young ovariectomized rats (MARQUES et al., 2006; FELIX et al., 2015). However, despite the cardiac morphological adaptations, only an increase of left ventricular end-systolic volume was observed after the physical training, even though there was a tendency towards an increase in left ventricular end-diastolic volume, suggesting an increase in functional capacity due to improvement in cardiac remodeling. Nonetheless, it is important to point out that the echocardiographic examination was conducted in anesthetized animals with great effects on the cardiac function. It has been shown that young rats undergoing physical training have increased posterior wall thickness, left ventricular end-diastolic diameter and left ventricular end-systolic diameter, and no changes in the parameters of the cardiac systolic function (BOCALINI et al., 2010). While some authors have reported no changes in the left ventricular wall thickness and systolic function after physical training (HYDOCK et al., 2007), others have shown an increase in cardiac output, after physical training (LACHANCE et al., 2009). However, all of these studies were performed using different experimental models, making it difficult for us to compare their findings with ours.

However, there are two studies showing reduction in left ventricle wall thickness in young trained ovariectomized rats (FELIX et al., 2015), and increase in cardiac mass and intraventricular septum thickness after physical training (CALVÉ et al., 2012). Both studies showed no changes in cardiac systolic function. Thus, the action mechanisms of physical training and the role of ovarian hormones on morphological and functional adaptations are not completely clear. Nonetheless, physical training seems to promote the reduction of Ang II levels (PEREIRA et al., 2009) and attenuate the sympathetic autonomic drive (BILLMAN et al.,

2006), inflammatory factors, hypertrophy and cardiac fibrosis (LIAO et al., 2015). The assessment in isolated heart by the Langendorff technique allowed us to observe higher left intraventricular pressure induced by the increased flow in the trained group, suggesting an improvement in the cardiac performance of these animals. This result corroborates previous studies that showed this beneficial effect of physical training on the heart, however, they used other experimental methods that were different from ours (MÓLE, 1978; PIERCE et al., 1989; FULLER & NUTTER, 1981; WISLOFF et al., 2001; WISLOFF et al., 2002; PORTES et al., 2009).

The cause of this finding has yet to be clarified, however, the hypothesis is that physical training might be promoting an increase in the number of blood capillaries in the cardiomyocytes, increase in number of mitochondria and activity of antioxidant enzymes, allowing greater flow in oxygen and nutrient supply to the heart tissue (COSMAS et al., 1997; BROWN et al., 2003; CHRYSOHOOU et al., 2003).

Another important finding is that the β -adrenergic receptor sensitivity results are similar for the trained group and the sedentary group treated with Enalapril Maleate. The lower maximum rate of intraventricular pressure due to the β_1 -adrenergic agonist stimulation, may indicate a decrease in expression and/or sensitivity of β_1 -adrenergic receptors. This interpretation is based on studies that have shown the attenuating effect of exercise training on these receptors, using different approaches: stimulation of the mechanical activity of isolated papillary muscle fibers by isoproterenol (TAKEDA et al., 1985), quantification of expression in myocardial cell membrane, using radioligand markers (WERLE et al., 1990) and Western Blot technique in cardiac tissues (BARBIER et al., 2004; BARBIER et al., 2006). As seen with the findings obtained for the group treated with Enalapril Maleate, these results also suggest a decrease in cardiac sympathetic drive, as reported in a previous study (SOUZA & TEZINI, 2013).

In conclusion, our findings show similar beneficial effects of physical training and Enalapril Maleate treatment on the morphology and cardiac function in old female rats subjected to premature ovarian failure. Although the causes might differ, there is one main similarity, which is the reduction of sympathetic autonomic influence on the heart through the β 1-adrenergic sensitivity in both types of treatments. Although further studies are necessary to identify the mechanisms involved, both treatments may be clinically relevant therapeutic strategies that can be used to reduce cardiovascular risks due to premature ovarian failure associated with aging.

ACKNOWLEDGMENTS

We appreciate the technical support offered by Dr. Cybele Maria Prado for obtaining the echocardiographic images.

FUNDING

This study was funded by FAPESP (Process: 2014/01937-9) and CNPq (Process: 141693/2014-2).

5. REFERENCES

1. Antonicelli, R.; Olivieri, F.; Morichi, V.; Urbani, E.; Mais, V. Prevention of cardiovascular events in early menopause: a possible role for hormone replacement therapy. *Int J Cardiol.* 130:140-146; 2008.
2. Asikainen, T.M.; Suni, J.H.; Pasanen, M.E.; Oja, P.; Rinne, M.B.; Miilunpalo, S.I.; Nygård, C.H.; Vuori, I.M. Effect of brisk walking in 1 or 2 daily bouts and moderate resistance training on lower-extremity muscle strength, balance, and walking performance in women who recently went through menopause: a randomized, controlled trial. *Phys Ther.* 86:912-923; 2006.
3. Atsma, F.; Bartelink, M.L.; Grobbee, D.E.; van der Schouw, Y.T. Postmenopausal status and early menopause as independent risk factors for cardiovascular disease: a meta-analysis. *Menopause.* 13:265-279; 2006.

4. Bader, M.; Ganten, D. Update on tissue renin-angiotensin systems. *J Mol Med (Berl)*. 86:615-621; 2008.
5. Balt, J.C.; Mathy, M.J.; Nap, A.; Pfaffendorf, M.; van Zwieten, P.A. Effect of the AT1-receptor antagonists losartan, irbesartan, and telmisartan on angiotensin II-induced facilitation of sympathetic neurotransmission in the rat mesenteric artery. *J Cardiovasc Pharmacol*. 38:141-148; 2001.
6. Barbier, J.; Rannou-Bekono, F.; Marchais, J.; Berthon, P.M.; Delamarche, P.; Carré, F. Effect of training on beta1 beta2 beta3 adrenergic and M2 muscarinic receptors in rat heart. *Med Sci Sports Exerc*. 36:949-954; 2004.
7. Barbier, J.; Reland, S.; Ville, N.; Rannou-Bekono, F.; Wong, S.; Carré, F. The effects of exercise training on myocardial adrenergic and muscarinic receptors. *Clin Auton Res*. 16:61-65; 2006.
8. Basso, N.; Cini, R.; Pietrelli, A.; Ferder, L.; Terragno, N.A.; Inserra, F. Protective effect of long-term angiotensin II inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 293:H1351-1358; 2007.
9. Billman, G.E.; Kukielka, M. Effects of endurance exercise training on heart rate variability and susceptibility to sudden cardiac death: protection is not due to enhanced cardiac vagal regulation. *J Appl Physiol (1985)*. 100:896-906; 2006.
10. Bocalini, D.S.; Carvalho, E.V.; de Sousa, A.F.; Levy, R.F.; Tucci, P.J. Exercise training-induced enhancement in myocardial mechanics is lost after 2 weeks of detraining in rats. *Eur J Appl Physiol*. 109:909-914; 2010.
11. Brosnihan, K.B.; Weddle, D.; Anthony, M.S.; Heise, C.; Li, P.; Ferrario, C.M. Effects of chronic hormone replacement on the renin-angiotensin system in cynomolgus monkeys. *J Hypertens*. 15:719-726; 1997.
12. Brown, N.J.; Abbas, A.; Byrne, D.; Schoenhard, J.A.; Vaughan, D.E. Comparative effects of estrogen and angiotensin-converting enzyme inhibition on plasminogen activator inhibitor-1 in healthy postmenopausal women. *Circulation*. 105:304-309; 2002.
13. 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 (1985)*. 95:2510-2518; 2003.
14. Calvé, A.; Haddad, R.; Barama, S.N.; Meilleur, M.; Sebag, I.A.; Chalifour, L.E. Cardiac response to doxorubicin and dexrazoxane in intact and ovariectomized young female rats at rest and after swim training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 302:H2048-2057; 2012.
15. Chrysohoou, C.; Pitsavos, C.; Panagiotakos, D.B.; Kokkinos, P.F.; Stefanadis, C.; Toutouzas, P. The association between physical activity and the development of acute coronary syndromes in treated and untreated hypertensive subjects. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 5:115-120; 2003.

16. Cocco, G.; Pandolfi, S. Physical exercise with weight reduction lowers blood pressure and improves abnormal left ventricular relaxation in pharmacologically treated hypertensive patients. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 13:23-29; 2011.
17. Cosmas, A.C.; Kernan, K.; Buck, E.; Fernhall, B.; Manfredi, T.G. Exercise and dietary cholesterol alter rat myocardial capillary ultrastructure. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 75:62-67; 1997.
18. Cox, S.L.; Ben, A.; Story, D.F.; Ziogas, J. Evidence for the involvement of different receptor subtypes in the pre- and postjunctional actions of angiotensin II at rat sympathetic neuroeffector sites. *Br J Pharmacol*. 114:1057-1063; 1995.
19. Coylewright, M.; Reckelhoff, J.F.; Ouyang, P. Menopause and hypertension: an age-old debate. *Hypertension*. 51:952-959; 2008.
20. Cozza, I.C.; Di Sacco, T.H.; Mazon, J.H.; Salgado, M.C.; Dutra, S.G.; Cesarino, E.J.; Souza, H.C. Physical exercise improves cardiac autonomic modulation in hypertensive patients independently of angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment. *Hypertens Res*. 35:82-87; 2012.
21. Craig, B.W.; Martin, G.; Betts, J.; Lungren, M.; Lambret, V.; Kaiserauer, S. The influence of training-detraining upon the heart, muscle and adipose tissue of female rats. *Mech Ageing Dev*. 57:49-61; 1991.
22. Deschamps, A.M.; Murphy, E.; Sun, J. Estrogen receptor activation and cardioprotection in ischemia reperfusion injury. *Trends Cardiovasc Med*. 20:73-78; 2010.
23. Di Blasio, A.; Di Donato, F.; De Stefano, A.; Gallina, S.; Granieri, M.; Napolitano, G.; Petrella, V.; Riccardi, I.; Santarelli, F.; Valentini, P.; Ripari, P. Left ventricle relative wall thickness and plasma leptin levels: baseline relationships and effects of 4 months of walking training in healthy overweight postmenopausal women. *Menopause*. 18:77-84; 2011.
24. dos Santos, R.L.; da Silva, F.B.; Ribeiro, R.F.; Stefanon, I. Sex hormones in the cardiovascular system. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 18:89-103; 2014.
25. Felix, A.C.; Dutra, S.G.; Tezini, G.C.; Simões, M.V.; de Souza, H.C. Aerobic physical training increases contractile response and reduces cardiac fibrosis in rats subjected to early ovarian hormone deprivation. *J Appl Physiol (1985)*. 118:1276-1285; 2015.
26. Fuller, E.O.; Nutter, D.O. Endurance training in the rat. II. Performance of isolated and intact heart. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 51:941-947; 1981.
27. Garcarena, C.D.; Pinilla, O.A.; Nolly, M.B.; Laguens, R.P.; Escudero, E.M.; Cingolani, H.E.; Ennis, I.L. Endurance training in the spontaneously hypertensive rat: conversion of pathological into physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension*. 53:708-714; 2009.

28. García, M.P.; Giménez, J.; Serna, M.; Salom, M.G.; Bonacasa, B.; Carbonell, L.F.; Quesada, T.; Hernández, I. Effect of estrogen and angiotensin-converting enzyme inhibitor on vascular remodeling in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Menopause*. 13:397-403; 2006.
29. Gilbert, E.M.; Sandoval, A.; Larrabee, P.; Renlund, D.G.; O'Connell, J.B.; Bristow, M.R. Lisinopril lowers cardiac adrenergic drive and increases beta-receptor density in the failing human heart. *Circulation*. 88:472-480; 1993.
30. Gobatto, C.A.; de Mello, M.A.; Sibuya, C.Y.; de Azevedo, J.R.; dos Santos, L.A.; Kokubun, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 130:21-27; 2001.
31. Goodman, J.M.; Liu, P.P.; Green, H.J. Left ventricular adaptations following short-term endurance training. *J Appl Physiol* (1985). 98:454-460; 2005.
32. Haines, C.D.; Harvey, P.A.; Leinwand, L.A. Estrogens mediate cardiac hypertrophy in a stimulus-dependent manner. *Endocrinology*. 153:4480-4490; 2012.
33. Herichova, I.; Szantoova, K. Renin-angiotensin system: upgrade of recent knowledge and perspectives. *Endocr Regul*. 47:39-52; 2013.
34. Hinojosa-Laborde, C.; Craig, T.; Zheng, W.; Ji, H.; Haywood, J.R.; Sandberg, K. Ovariectomy augments hypertension in aging female Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension*. 44:405-409; 2004.
35. Hulley, S.; Grady, D.; Bush, T.; Furberg, C.; Herrington, D.; Riggs, B.; Vittinghoff, E. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA*. 280:605-613; 1998.
36. Hydock, D.S.; Lien, C.Y.; Schneider, C.M.; Hayward, R. Effects of voluntary wheel running on cardiac function and myosin heavy chain in chemically gonadectomized rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 293:H3254-3264; 2007.
37. Irigoyen, M.C.; Paulini, J.; Flores, L.J.; Flues, K.; Bertagnolli, M.; Moreira, E.D.; Consolim-Colombo, F.; Belló-Klein, A.; De Angelis, K. Exercise training improves baroreflex sensitivity associated with oxidative stress reduction in ovariectomized rats. *Hypertension*. 46:998-1003; 2005.
38. Jia, M.; Dahlman-Wright, K.; Gustafsson, J. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 29:557-568; 2015.
39. Kannel, W.B.; Hjortland, M.C.; McNamara, P.M.; Gordon, T. Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study. *Ann Intern Med*. 85:447-452; 1976.
40. Kemi, O.J.; Haram, P.M.; Wisløff, U.; Ellingsen, Ø. Aerobic fitness is associated with cardiomyocyte contractile capacity and endothelial function in exercise training and detraining. *Circulation*. 109:2897-2904; 2004.

41. Knowlton, A.A.; Korzick, D.H. Estrogen and the female heart. *Mol Cell Endocrinol.* 389:31-39; 2014.
42. Knowlton, A.A.; Lee, A.R. Estrogen and the cardiovascular system. *Pharmacol Ther.* 135:54-70; 2012.
43. Korzick, D.H.; Lancaster, T.S. Age-related differences in cardiac ischemia-reperfusion injury: effects of estrogen deficiency. *Pflugers Arch.* 465:669-685; 2013.
44. Kwon, D.H.; Eom, G.H.; Kee, H.J.; Nam, Y.S.; Cho, Y.K.; Kim, D.K.; Koo, J.Y.; Kim, H.S.; Nam, K.I.; Kim, K.K.; Lee, I.K.; Park, S.B.; Choi, H.S.; Kook, H. Estrogen-related receptor gamma induces cardiac hypertrophy by activating GATA4. *J Mol Cell Cardiol.* 65:88-97; 2013.
45. Lachance, D.; Champetier, S.; Plante, E.; Bouchard-Thomassin, A.A.; Roussel, E.; Couet, J.; Arsenault, M. Effects of exercise in volume overload: insights from a model of aortic regurgitation. *Med Sci Sports Exerc.* 41:1230-1238; 2009.
46. Liao, P.H.; Hsieh, D.J.; Kuo, C.H.; Day, C.H.; Shen, C.Y.; Lai, C.H.; Chen, R.J.; Padma, V.V.; Kuo, W.W.; Huang, C.Y. Moderate exercise training attenuates aging-induced cardiac inflammation, hypertrophy and fibrosis injuries of rat hearts. *Oncotarget.* 6:35383-35394; 2015.
47. Lima, R.; Wofford, M.; Reckelhoff, J.F. Hypertension in postmenopausal women. *Curr Hypertens Rep.* 14:254-260; 2012.
48. Lima, R.; Yanes, L.L.; Davis, D.D.; Reckelhoff, J.F. Roles played by 20-HETE, angiotensin II and endothelin in mediating the hypertension in aging female spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 304:R248-251; 2013.
49. Litwin, S.E.; Katz, S.E.; Morgan, J.P.; Douglas, P.S. Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation.* 89:345-354; 1994.
50. Lobo, R.A. Surgical menopause and cardiovascular risks. *Menopause.* 14:562-566; 2007.
51. López, M.; Tena-Sempere, M. Estrogens and the control of energy homeostasis: a brain perspective. *Trends Endocrinol Metab.* 26:411-421; 2015.
52. Marcondes, F.K.; Bianchi, F.J.; Tanno, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol.* 62:609-614; 2002.
53. Marques, C.M.; Nascimento, F.A.; Mandarim-de-Lacerda, C.A.; Aguilá, M.B. Exercise training attenuates cardiovascular adverse remodeling in adult ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Menopause.* 13:87-95; 2006.
54. McKinley, M.J.; Albiston, A.L.; Allen, A.M.; Mathai, M.L.; May, C.N.; McAllen, R.M.; Oldfield, B.J.; Mendelsohn, F.A.; Chai, S.Y. The brain renin-angiotensin system:

- location and physiological roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 35:901-918; 2003.
55. Miller, V.M.; Duckles, S.P. Vascular actions of estrogens: functional implications. *Pharmacol Rev.* 60:210-241; 2008.
56. Molé, P.A. Increased contractile potential of papillary muscles from exercise-trained rat hearts. *Am J Physiol.* 234:H421-425; 1978.
57. Morrison, D.A.; Boyden, T.W.; Pamenter, R.W.; Freund, B.J.; Stini, W.A.; Harrington, R.; Wilmore, J.H. Effects of aerobic training on exercise tolerance and echocardiographic dimensions in untrained postmenopausal women. *Am Heart J.* 112:561-567; 1986.
58. Ocaranza, M.P.; Godoy, I.; Jalil, J.E.; Varas, M.; Collantes, P.; Pinto, M.; Roman, M.; Ramirez, C.; Copaja, M.; Diaz-Araya, G.; Castro, P.; Lavandero, S. Enalapril attenuates downregulation of Angiotensin-converting enzyme 2 in the late phase of ventricular dysfunction in myocardial infarcted rat. *Hypertension.* 48:572-578; 2006.
59. O'Donnell, E.; Floras, J.S.; Harvey, P.J. Estrogen status and the renin angiotensin aldosterone system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 307:R498-500; 2014.
60. Pardini, D. Hormone replacement therapy in menopause. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 58:172-181; 2014.
61. Paul, M.; Poyan Mehr, A.; Kreutz, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev.* 86:747-803; 2006.
62. Pechánová, O.; Bernátová, I.; Pelouch, V.; Simko, F. Protein remodelling of the heart in NO-deficient hypertension: the effect of captopril. *J Mol Cell Cardiol.* 29:3365-3374; 1997.
63. Pechánová, O.; Zicha, J.; Paulis, L.; Zenebe, W.; Dobesová, Z.; Kojsová, S.; Jendeková, L.; Sládková, M.; Dovinová, I.; Simko, F.; Kunes, J. The effect of N-acetylcysteine and melatonin in adult spontaneously hypertensive rats with established hypertension. *Eur J Pharmacol.* 561:129-136; 2007.
64. Pedram, A.; Razandi, M.; Narayanan, R.; Dalton, J.T.; McKinsey, T.A.; Levin, E.R. Estrogen regulates histone deacetylases to prevent cardiac hypertrophy. *Mol Biol Cell.* 24:3805-3818; 2013.
65. Pedram, A.; Razandi, M.; O'Mahony, F.; Lubahn, D.; Levin, E.R. Estrogen receptor-beta prevents cardiac fibrosis. *Mol Endocrinol.* 24:2152-2165; 2010.
66. Pereira, M.G.; Ferreira, J.C.; Bueno, C.R.; Mattos, K.C.; Rosa, K.T.; Irigoyen, M.C.; Oliveira, E.M.; Krieger, J.E.; Brum, P.C. Exercise training reduces cardiac angiotensin II levels and prevents cardiac dysfunction in a genetic model of sympathetic hyperactivity-induced heart failure in mice. *Eur J Appl Physiol.* 105:843-850; 2009.
67. Pierce, G.N.; Sekhon, P.S.; Meng, H.P.; Maddaford, T.G. Effects of chronic swimming training on cardiac sarcolemmal function and composition. *J Appl Physiol* (1985).

66:1715-1721; 1989.

68. Portes, L.A.; Magalhães Saraiva, R.; Alberta Dos Santos, A.; Tucci, P.J. Swimming training attenuates remodeling, contractile dysfunction and congestive heart failure in rats with moderate and large myocardial infarctions. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 36: 394-399; 2009.
69. Qu, P.; Hamada, M.; Ikeda, S.; Hiasa, G.; Shigematsu, Y.; Hiwada, K. Time-course changes in left ventricular geometry and function during the development of hypertension in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertens Res*. 23:613-623; 2000.
70. Robles, N.R.; Cerezo, I.; Hernandez-Gallego, R. Renin-angiotensin system blocking drugs. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 19:14-33; 2014.
71. Rodriguez, M.; Shoupe, D. Surgical Menopause. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 44:531-542; 2015.
72. Rossouw, J.E.; Anderson, G.L.; Prentice, R.L.; LaCroix, A.Z.; Kooperberg, C.; Stefanick, M.L.; Jackson, R.D.; Beresford, S.A.; Howard, B.V.; Johnson, K.C.; Kotchen, J.M.; Ockene, J.; Investigators, W.G.f.t.W.s.H.I. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 288:321-333; 2002.
73. Sahn, D.J.; DeMaria, A.; Kisslo, J.; Weyman, A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation*. 58:1072-1083; 1978.
74. Sassarini, J.; Lumsden, M.A. Oestrogen replacement in postmenopausal women. *Age Ageing*. 44:551-558; 2015.
75. Sigusch, H.H.; Campbell, S.E.; Weber, K.T. Angiotensin II-induced myocardial fibrosis in rats: role of nitric oxide, prostaglandins and bradykinin. *Cardiovasc Res*. 31:546-554; 1996.
76. Silveira, L.C.; Tezini, G.C.; Schujmann, D.S.; Porto, J.M.; Rossi, B.R.; Souza, H.C. Comparison of the effects of aerobic and resistance training on cardiac autonomic adaptations in ovariectomized rats. *Auton Neurosci*. 162:35-41; 2011.
77. Skrzypiec-Spring, M.; Grotthus, B.; Szelag, A.; Schulz, R. Isolated heart perfusion according to Langendorff---still viable in the new millennium. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 55:113-126; 2007.
78. Souza, H.C.; Tezini, G.C. Autonomic Cardiovascular Damage during Post-menopause: the Role of Physical Training. *Aging Dis*. 4:320-328; 2013.
79. Sükür, Y.E.; Kıvançlı, I.B.; Ozmen, B. Ovarian aging and premature ovarian failure. *J Turk Ger Gynecol Assoc*. 15:190-196; 2014.
80. Taddei, S. Blood pressure through aging and menopause. *Climacteric*. 12 Suppl 1:36-40; 2009.

81. Takeda, N.; Dominiak, P.; Türck, D.; Rupp, H.; Jacob, R. The influence of endurance training on mechanical catecholamine responsiveness, beta-adrenoceptor density and myosin isoenzyme pattern of rat ventricular myocardium. *Basic Res Cardiol.* 80:88-99; 1985.
82. Teichholz, L.E.; Kreulen, T.; Herman, M.V.; Gorlin, R. Problems in echocardiographic volume determinations: echocardiographic-angiographic correlations in the presence of absence of asynergy. *Am J Cardiol.* 37:7-11; 1976.
83. Tezini, G.C.; Becari, C.; Zanotto, C.Z.; Salgado, M.C.; Passaglia, R.e.C.; Souza, H.C. Ageing is the main determinant of haemodynamics and autonomic cardiac changes observed in post-menopausal female rats. *Auton Neurosci.* 174:36-41; 2013.
84. Tezini, G.C.; Silveira, L.C.; Villa-Clé, P.G.; Jacinto, C.P.; Di Sacco, T.H.; Souza, H.C. The effect of aerobic physical training on cardiac autonomic control of rats submitted to ovariectomy. *Menopause.* 16:110-116; 2009.
85. van der Schouw, Y.T.; van der Graaf, Y.; Steyerberg, E.W.; Eijkemans, J.C.; Banga, J.D. Age at menopause as a risk factor for cardiovascular mortality. *Lancet.* 347:714-718; 1996.
86. Voloshenyuk, T.G.; Gardner, J.D. Estrogen improves TIMP-MMP balance and collagen distribution in volume-overloaded hearts of ovariectomized females. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 299:R683-693; 2010.
87. Wend, K.; Wend, P.; Krum, S.A. Tissue-Specific Effects of Loss of Estrogen during Menopause and Aging. *Front Endocrinol (Lausanne).* 3:19; 2012.
88. Werle, E.O.; Strobel, G.; Weicker, H. Decrease in rat cardiac beta 1- and beta 2-adrenoceptors by training and endurance exercise. *Life Sci.* 46:9-17; 1990.
89. Wichi, R.; Malfitano, C.; Rosa, K.; De Souza, S.B.; Salemi, V.; Mostarda, C.; De Angelis, K.; Irigoyen, M.C. Noninvasive and invasive evaluation of cardiac dysfunction in experimental diabetes in rodents. *Cardiovasc Diabetol.* 6:14; 2007.
90. Wisløff, U.; Loennechen, J.P.; Currie, S.; Smith, G.L.; Ellingsen, Ø. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca²⁺ sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 54:162-174; 2002.
91. Wisløff, U.; Loennechen, J.P.; Falck, G.; Beisvag, V.; Currie, S.; Smith, G.; Ellingsen, O. Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. *Cardiovasc Res.* 50:495-508; 2001.
92. Xing, D.; Nozell, S.; Chen, Y.F.; Hage, F.; Oparil, S. Estrogen and mechanisms of vascular protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29:289-295; 2009.
93. Xu, X.; Zhao, W.; Lao, S.; Wilson, B.S.; Erikson, J.M.; Zhang, J.Q. Effects of exercise and L-arginine on ventricular remodeling and oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc.* 42:346-354; 2010.

94. Yung, L.M.; Wong, W.T.; Tian, X.Y.; Leung, F.P.; Yung, L.H.; Chen, Z.Y.; Yao, X.; Lau, C.W.; Huang, Y. Inhibition of renin-angiotensin system reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in estrogen deficient rats. *PLoS One*. 6:e17437; 2011.
95. Zicha, J.; Dobesová, Z.; Kunes, J. Antihypertensive mechanisms of chronic captopril or N-acetylcysteine treatment in L-NAME hypertensive rats. *Hypertens Res*. 29:1021-1027; 2006.

Figure 1. Reactivity of the Coronary Bed (A) and the Left Ventricular Systolic Pressure (B) flow-induced in the ovariectomized (OVX) and OVX treated with Enalapril Maleate sedentary (OVX-EM), and trained (OVX-EMT). All values are presented as the mean $\pm$ SEM. # $P < 0.05$ vs. OVX-T. + $P < 0.05$ vs. OVX-EM. † $P < 0.05$ vs. OVX-EMT.

Figure 2. Values of the $dP/dT_{(max)}$ (A) and $dP/dT_{(min)}$ (B) flow-induced in the ovariectomized (OVX) and OVX treated with Enalapril Maleate sedentary (OVX-EM), and trained (OVX-EMT). All values are presented as the mean $\pm$ SEM. [#] $P < 0.05$ vs. OVX-T. ⁺ $P < 0.05$ vs. OVX-EM. [†] $P < 0.05$ vs. OVX-EMT.

Figure 3. (A) Dose Response Curve and (B) Maximum Intraventricular Contractile Response (100nmol) obtained after administration of Dobutamine (C) Dose Response Curve (D) and Maximum Intraventricular Contractile Response (15nmol) obtained after administration of Salbutamol, in the ovariectomized (OVX) and OVX treated with Enalapril Maleate sedentary (OVX-EM), and trained (OVX-EMT). All values are presented as the mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ vs. OVX. # $P < 0.05$ vs. OVX-T. + $P < 0.05$ vs. OVX-EM. † $P < 0.05$ vs. OVX-EMT

Table 1. General characteristics and cardiac morphology parameters for the ovariectomized (OVX) and OVX treated with Enalapril Maleate sedentary (OVX-EM), and trained (OVX-EMT).

	Experimental Groups				Physical Training Factor	Enalapril Maleate Factor	Interaction
	OVX	OVX-T	OVX-EM	OVX-EMT	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>
Parameters							
Body weight, g	483 ± 56	485 ± 35	494 ± 51	473 ± 48	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>
Heart weight, g	1.38 ± 0.04	1.42 ± 0.07	1.41 ± 0.07	1.40 ± 0.05	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>
Relative heart weight, mg/kg	2.86 ± 0.14	2.92 ± 0.17	2.85 ± 0.22	2.95 ± 0.43	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>
Cardiac Morphology							
PWT, mm	1.9 ± 0.04	1.6 ± 0.12*	1.5 ± 0.15*	1.5 ± 0.12*	0.018	<0.001	0.034
IVST, mm	2.0 ± 0.27	1.5 ± 0.11*	1.3 ± 0.16*	1.5 ± 0.11*	0.019	<0.001	<0.001
RWT, mm	0.49 ± 0.05	0.40 ± 0.05*	0.38 ± 0.05*	0.38 ± 0.03*	0.014	<0.001	0.043
LVEDD, mm	7.6 ± 0.76	8.1 ± 0.43	7.8 ± 0.41	7.9 ± 0.43	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>
LVESD, mm	5.0 ± 0.52	5.5 ± 0.31	5.2 ± 0.60	4.9 ± 0.37	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>
LV mass, mg	1186 ± 305	944 ± 37*	822 ± 74*	871 ± 135*	0.04	0.002	0.03

All values are presented as the mean ± SD. g, grams; mg, milligrams; kg, kilograms; mm, millimeters; PWT, posterior wall thickness; IVST, interventricular septum thickness; RWT, relative wall thickness; LVEDD, left ventricular end-diastolic diameter; LVESD, left ventricular end-systolic diameter; LV, left ventricular. * P<0.05 vs. OVX group, # P<0.05 vs. OVX-T, + P<0.05 vs. OVX-EM group. NS: not significant.

Table 2. Cardiac morphology parameters normalized for body weight for the ovariectomized (OVX) and OVX treated with Enalapril Maleate sedentary (OVX-EM), and trained (OVX-EMT).

	Experimental Groups				Physical Training Factor	Enalapril Maleate Factor	Interaction
	OVX	OVX-T	OVX-EM	OVX-EMT	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>
Cardiac Morphology							
PWT, mm/kg	3.8 ± 0.48	3.2 ± 0.55	3.0 ± 0.38*	3.2 ± 0.28*	<i>NS</i>	<i>0.006</i>	<i>NS</i>
IVST, mm/kg	4.26 ± 0.82	3.09 ± 0.35*	2.63 ± 0.26*	3.22 ± 0.42*	<i>0.006</i>	<i><0.001</i>	<i><0.001</i>
RWT, mm/kg	1.03 ± 0.14	0.82 ± 0.18*	0.76 ± 0.11*	0.81 ± 0.10*	<i>0.04</i>	<i>0.01</i>	<i>0.04</i>
LVEDD, mm/kg	16.1 ± 2.6	16.7 ± 0.7	16.1 ± 1.9	16.9 ± 1.6	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>
LVESD, mm/kg	10.6 ± 2.0	11.4 ± 0.5	10.8 ± 1.9	10.5 ± 1.2	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>
LV mass, mg/g	2.4 ± 0.64	1.9 ± 0.12	1.6 ± 0.16*	1.8 ± 0.21*	<i>NS</i>	<i>0.002</i>	<i>0.01</i>

All values are presented as the mean ± SD. kg, kilograms; g, grams; mg, milligrams; mm, millimeters; PWT, posterior wall thickness; IVST, interventricular septum thickness; RWT, relative wall thickness; LVEDD, left ventricular end-diastolic diameter; LVESD, left ventricular end-systolic diameter; LV, left ventricular. *P<0.05 vs. OVX, # P<0.05 vs. OVX-T. + P<0.05 vs. OVX-EM. NS: not significant.

Table 3. Parameters hemodynamics and values of cardiac function obtained in the ovariectomized (OVX) and OVX treated with Enalapril Maleate sedentary (OVX-EM), and trained (OVX-EMT).

	Experimental Groups				Physical Training Factor	Enalapril Maleate Factor	Interaction
	OVX	OVX-T	OVX-EM	OVX-EMT	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>
Arterial Pressure							
SAP, mmHg	139 ± 6	136 ± 5	110 ± 10 ^{*,#}	105 ± 7 ^{*,#}	<i>NS</i>	<0.001	<i>NS</i>
DAP, mmHg	91 ± 4	92 ± 6	85 ± 8	87 ± 8	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>
MAP, mmHg	110 ± 3	109 ± 5	95 ± 8 ^{*,#}	94 ± 8 ^{*,#}	<i>NS</i>	<0.001	<i>NS</i>
Cardiac Function							
HR, bpm	309 ± 23	317 ± 18	311 ± 22	314 ± 25	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>
LVEDV (μL)	498 ± 170	594 ± 108	533 ± 105	558 ± 107	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>
LVESV (μL)	106 ± 36	143 ± 28 [*]	127 ± 51	96 ± 26 [#]	0.04	<i>NS</i>	0.019
Stroke Volume, μL	382 ± 138	451 ± 82	406 ± 66	461 ± 103	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>
Ejection Fraction, %	78 ± 2.9	76 ± 1.3	77 ± 5.9	82 ± 5.5 ^{*,+}	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>
Shortening Fraction, %	34 ± 2.5	31 ± 1.0	33 ± 4.9	38 ± 5.1 ^{*,+}	<i>NS</i>	<i>NS</i>	0.03
Cardiac Output, mL/ min	120 ± 41	143 ± 28	126 ± 16	145 ± 32	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>
Cardiac Index, mL/g	0.25 ± 0.09	0.29 ± 0.04	0.26 ± 0.03	0.30 ± 0.05	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>

All values are presented as the mean ± SD. mmHg, millimeters of mercury; bpm, beats per minute; μL, milliliter; %, percentage; mL, milliliters; min, minute; g, grams; SAP, systolic arterial pressure; DAP, diastolic arterial pressure; MAP, mean arterial pressure; HR, heart rate; LVEDV, left ventricular end-diastolic volume; LVESV, left ventricular end-systolic volume. * P<0.05 vs. OVX, # P<0.05 vs. OVX-T. + P<0.05 vs. OVX-EM. NS: not significant.