Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

**ESTUDO EXPERIMENTAL DA PARTICIPAÇÃO DO
SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA-
ALDOSTERONA NAS ADAPTAÇÕES
HEMODINÂMICAS E MORFOFUNCIONAIS
CARDÍACAS PROVOCADAS PELA FALÊNCIA
OVARIANA – EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO
AERÓBIO**

Thauane Hanna Fares
Dissertação de Mestrado

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Ciências da Saúde
Programa de pós-graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional
Laboratório de Fisiologia do Exercício e Fisioterapia Cardiovascular

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

“ESTUDO EXPERIMENTAL DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA RENINA
ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA NAS ADAPTAÇÕES
HEMODINÂMICAS E MORFOFUNCIONAIS CARDÍACAS
PROVOCADAS PELA FALÊNCIA OVARIANA – EFEITO DO
TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO”

Aluna: Thauane Hanna Fares

Orientador: Hugo Celso Dutra de
Souza

Programa: Reabilitação e Desempenho
Funcional, da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto/USP.

Apoio Financeiro: Fundação de
Amparo à Pesquisa do Estado de São
Paulo

Ribeirão Preto – SP

2021

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

Fares, Thauane Hanna

Estudo experimental da participação do sistema renina angiotensina-aldosterona nas adaptações hemodinâmicas e morfofuncionais cardíacas provocadas pela falência ovariana – efeito do treinamento físico aeróbio. Ribeirão Preto, 2021.

p. 105

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Reabilitação e Desempenho Funcional.

Orientador: Souza, Hugo Celso Dutra.

1. Falência Ovariana. 2. Angiotensina. 3. Calpaína-1. 4. Metaloproteinase-2. 5. Treinamento Físico.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Thauane Hanna Fares

Estudo experimental da participação do sistema renina angiotensina-aldosterona nas adaptações hemodinâmicas e morfofuncionais cardíacas provocadas pela falência ovariana – efeito do treinamento físico aeróbio.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Reabilitação e Desempenho
Funcional, da Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto/USP, para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Hugo Celso Dutra de Souza

- Orientador -

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar,
divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais
bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua
misterioso diante de meus olhos”.*

Isaac Newton

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

*Aos meus pais, Ramon e Paula, por sempre acreditarem em mim e
por terem abdicado de suas vidas em prol das realizações e da
felicidade de seus filhos.*

*Ao meu irmão Leonardo, por sua preocupação, carinho e
incentivo.*

*À minha peludinha Floquinha,
por ser sinônimo de lealdade e alegria.*

*Ao meu namorado Renan,
meu companheiro e porto seguro.*

AGRADECIMENTOS

*Aos meus amados pais, **Ramon e Paula**, pelo eterno apoio e infinita inspiração em absolutamente todos os momentos da minha vida.*

*Ao meu irmão **Leonardo**, que embora esteja morando longe, é, e sempre vai ser meu melhor amigo. Você é minha maior fonte de garra e inspiração*

*Ao meu namorado **Renan**, que me presenteia todos os dias com seu carinho e amor.
Obrigada por fazer parte de cada momento da minha vida.*

*Ao **Prof. Dr. Hugo Celso Dutra de Souza**, pela orientação neste trabalho e por estar sempre disposto a me ajudar. Agradeço também a confiança e paciência durante esses 2 anos.*

*As minhas queridas amigas do Laboratório, **Jhennyfer, Tábata, Stella e Ana Catarine**, por todos os momentos agradáveis que passamos juntas.*

*As minhas grandes e eternas amigas, **Geovanna, Nayara, Raquel e Júlia**, por todos os conselhos e apoio ao longo desses anos.*

*A todos meus familiares, em especial a minha avó **Idaliria**, aos meus tios e tias, primos e primas, que são parte da minha vida e que torceram por esta conquista.*

*À **CAPES, CNPq, FAEPA e FAPESP (2019/03431-9)**, pelo apoio financeiro essencial para o desenvolvimento deste trabalho.*

*À **Deus**, por abençoar minha vida e iluminar os meus caminhos.*

RESUMO

FARES, T.H. Estudo experimental da participação do sistema renina angiotensina-aldosterona nas adaptações hemodinâmicas e morfofuncionais cardíacas provocadas pela falência ovariana – efeito do treinamento físico aeróbio. 105p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A privação dos hormônios ovarianos em ratas Wistar promove aumento na expressão da fibrose cardíaca, que pode resultar em prejuízos funcionais. Por sua vez, o exercício físico aeróbio impede esse aumento. Os mecanismos envolvidos nesse processo ainda são incertos. Nossa hipótese é que seja decorrente do aumento da expressão das proteínas de matriz mitocondrial. O objetivo foi investigar se o aumento na fibrose cardíaca decorrente da privação dos hormônios ovarianos está relacionado com o aumento da MMP-2 e calpaína-1, e se o exercício físico aeróbio modula a expressão dessas proteínas. Na metodologia foram utilizadas ratas Wistar fêmeas com 12 semanas de idade (N= 40) foram divididas em dois grupos: ovariectomizadas (OVX) e submetidas à cirurgia sham (SHAM). A metade de cada grupo foi submetida ao treinamento físico aeróbio por 12 semanas. Na 24ª semana de vida os animais foram submetidos à análise da morfologia e funcionalidade cardíaca por meio da ecocardiografia bidimensional; análise histológica para quantificação da fibrose cardíaca; e quantificação da expressão da Calpaína-1 e MMP-2. Os resultados foram principais que os grupo treinado OVX obteve menores valores de fração de ejeção e índice cardíaco, quando comparados com o grupo treinado SHAM. Sobre os valores de Capain1/GAPDH, o grupo OVX obteve um valor maior quando comparados com os grupos SHAM e SHAM treinado. Enquanto o grupo OVX treinado teve um menor valor quando comparado com o OVX. Concluímos que os hormônios ovarianos influenciam a expressão de calpaína 1 e o treinamento físico aeróbio modula a atividade e expressão dessa proteína.

Palavras-chave: falência ovariana, angiotensina, calpaína-1, metaloproteinase-2, treinamento físico.

ABSTRACT

FARES, T.H. **Experimental study of the participation of the renin-angiotensin-aldosterone system in cardiac hemodynamic and morphofunctional adaptations caused by ovarian failure - effect of aerobic exercise training.** 105p. Dissertation (Masters) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, 2021.

Deprivation of ovarian hormones in Wistar rats promotes increased expression of cardiac fibrosis, which can result in incorrect damage. In turn, aerobic exercise prevents this increase. The mechanisms involved in this process are still uncertain. Our hypothesis is that it is due to the increased expression of mitochondrial matrix proteins. The objective was to investigate whether the increase in cardiac fibrosis resulting from the deprivation of ovarian hormones is related to the increase in MMP-2 and calpain-1, and whether aerobic physical exercise modulates the expression of these proteins. The methodology used was Wistar at 12 weeks of age (N = 40) were divided into two groups: ovariectomized (OVX) and undergoing sham surgery (SHAM). Half of each group underwent aerobic physical training for 12 weeks. In the 24th week of life, the animals were found for the analysis of cardiac morphology and functionality through two-dimensional echocardiography; histological analysis for quantification of cardiac fibrosis; and quantification of Calpain-1 and MMP-2 expression. The main results were that the OVX trained groups had lower ejection fraction and cardiac index values when compared to the SHAM trained group. About Capain1 / GAPDH values, the OVX group obtained a higher value when compared to the SHAM and trained SHAM groups. While the trained OVX group had a lower value when compared to the OVX. We conclude that ovarian hormones influence the expression of calpain 1 and aerobic physical training modulates the activity and expression of this protein.

Keywords: ovarian failure, angiotensin, calpain-1, metalloproteinase-2, physical training.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores médios da pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e pressão arterial média aferidas por meio da pletismografia de cauda em todos os animais com 10 semanas de vida, após a divisão dos grupos experimentais, e antes dos procedimentos cirúrgicos e realização dos protocolos	59
Tabela 2 - Valores médios de pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e pressão arterial média obtidos por meio da pletismografia de cauda realizada na 4ª semana (14ª semana de vida) após os procedimentos cirúrgicos e após o início do treinamento físico aeróbio e/ou tratamento com maleato de enalapril	60
Tabela 3 - Valores médios de pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e pressão arterial média obtidos por meio da pletismografia de cauda realizada na 8ª semana (18ª semana de vida) após os procedimentos cirúrgicos e após o início do treinamento físico aeróbio e/ou tratamento com maleato de enalapril	61
Tabela 4 - Valores médios de pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e pressão arterial média obtidos por meio da pletismografia de cauda realizada na 12ª semana (22ª semana de vida) após os procedimentos cirúrgicos e após o início do treinamento físico aeróbio e/ou tratamento com maleato de enalapril	62
Tabela 5 - Peso corporal final e pesos absoluto e relativo cardíaco, nos grupos SHAM e OVX, sedentários e treinados	64
Tabela 6 - Efeitos da ovariectomia e do treinamento físico aeróbio sobre o remodelamento cardíaco	66
Tabela 7 - Efeitos da ovariectomia e do treinamento físico aeróbio sobre a função cardíaca.....	68
Tabela 8 - Peso corporal final e pesos absoluto e relativo cardíaco, nos grupos SHAM e OVX, sedentários e treinados	70
Tabela 9 - Parâmetros morfológicos cardíacos obtidos nos grupos ovariectomizados e tratados com maleato de Enalapril, sedentários e treinados	71
Tabela 10: Parâmetros funcionais cardíacos obtidos nos grupos ovariectomizados (OVX) e tratados com maleato de Enalapril (OVX-ME), sedentários e treinados	73
Tabela 11: Parâmetros funcionais cardíacos obtidos nos grupos ovariectomizados (OVX) e tratados com maleato de Enalapril (OVX-ME), sedentários e treinados	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. À esquerda, valores referentes ao percentual de fibrose nos grupos controle (SHAM; N=12) e ovariectomizado (OVX; N=12), sedentários e treinados. *P<0,05 comparado ao grupo SHAM sedentário; #P<0,05 comparado ao grupo OVX sedentário. À direita, corte histológico representativo de cada grupo estudando, evidenciando a fibrose cardíaca pela coloração com Picro Sírius, utilizando um filtro polarizador. A) SHAM sedentário B) SHAM treinado C) OVX sedentário D) OVX treinado. *J Appl Physiol* 118: 1276–1285, 2015..... **29**

Figura 2 – Valores de pressão arterial média aferidas através da pletismografia de cauda ao longo de 12 semanas, nos grupos submetidos à cirurgia SHAM, sedentários e treinados, tratados com veículo ou maleato de enalapril **54**

Figura 3 – Valores de pressão arterial média aferidas através da pletismografia de cauda ao longo das 12 semanas, nos grupos submetidos à ovariectomia, sedentários e treinados, tratados com veículo ou maleato de enalapril **55**

Figura 4 – Valores de pressão arterial média aferidas através da pletismografia de cauda ao longo das 12 semanas, obtidos nos grupos submetidos à cirurgia SHAM ou ovariectomizados sedentários, tratados com veículo ou maleato de enalapril **56**

Figura 5 – Valores de pressão arterial média aferidas através da pletismografia de cauda ao longo das 12 semanas, obtidos nos grupos submetidos à cirurgia SHAM ou ovariectomizados treinados, tratados com veículo ou maleato de enalapril **57**

Figura 6 - Imagens histológicas representativas (barra de escala: 100 µm) da fibrose cardíaca de cada grupo experimental. (A) Grupo sham não treinado; (B) Grupo sham treinado; (C) Grupo ovariectomizado não treinado; (D) Grupo ovariectomizado treinado. A Figura mostra a média do percentual de fibrose cardíaca de cada grupo experimental **76**

Figura 7 - Imagens histológicas representativas (barra de escala: 100 µm) da fibrose cardíaca de cada grupo experimental. (A) Grupo ovariectomizado não treinado; (B) Grupo ovariectomizado treinado; (C) Grupo ovariectomizado não treinado e tratado com maleato de enalapril; (D) Grupo ovariectomizado treinado e tratado com maleato de enalapril. A Figura mostra a média do percentual de fibrose cardíaca de cada grupo experimental **77**

Figura 8 - Expressão proteica da calpaína-1 (A) e MMP-2 realizada pela técnica de *Western blot* em ventrículo esquerdo dos animais sham e ovariectomizados submetidos ao treinamento físico aeróbio **79**

Figura 9 - Expressão proteica da calpaína-1 (A) e MMP-2 realizada pela técnica de *Western blot* em ventrículo esquerdo dos animais ovariectomizados, tratados com maleato de enalapril e submetidos ao treinamento físico aeróbio **80**

LISTA DE ABREVIATURAS

ANF	Fator Natriurético Atrial
ANOVA	Análise de Variância
bpm	Batimentos por Minuto
Ca ⁺⁺	Cálcio
CT	Ciclo Limiar
DC	Débito Cardíaco
DCVs	Doenças Cardiovasculares
DDFVE	Diâmetro Diastólico Final do Ventrículo Esquerdo
DSFVE.....	Diâmetro Sistólico Final do Ventrículo Esquerdo
ECA	Enzima Conversora da Angiotensina
EPP	Espessura da Parede Posterior
EPM	Erro Padrão da Média
ERP	Espessura Relativa da Parede
FC.....	Frequência Cardíaca
FE	Fração de Ejeção
FSH	Hormônios Folículo Estimulante
g	Grama
HAS.....	Hipertensão Arterial Sistêmica
HE	Hematoxilina Eosina
HPCL	Cromatografia Líquida de Alta Performance
IC	Índice Cardíaco
ieCA.....	Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina
kg.....	Quilograma
LH	Hormônio luteinizante
ME	Maleato de Enalapril
MMPs	Metaloproteinases da Matriz

MVE	Massa do Ventrículo Esquerdo
mmHg	Milímetros de Mercúrio
mm	Milímetros
m-	Mili
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitros
ms ²	Oscilações em Unidades Absolutas
μ-	Micro
Na ⁺	Sódio
OVX	Ovariectomia
O ₂	Oxigênio
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAM	Pressão Arterial Média
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PAI-I	Inibidor da Ativação do Plasminogênio
RT	Transcrição Reversa
SIV	Septo Interventricular
SHR	Ratos Espontaneamente Hipertensos
SRA	Sistema renina-angiotensina
SRAA	Sistema Renina Angiotensina-Aldosterona
TIMP	Inibidor Tecidual de Metaloproteinase
TGF-β	Fator de Crescimento Transformante Beta

un Unidades Normalizadas

μL Microlitros

VE Ventrículo Esquerdo

VDFVE Volume Diastólico Final do Ventrículo Esquerdo

VSFVE Volume Sistólico Final do Ventrículo Esquerdo

SUMÁRIO

Sumário

INTRODUÇÃO	26
OBJETIVOS	Error! Bookmark not defined. <u>1</u>
MATERIAL E MÉTODOS.....	Error! Bookmark not defined.
Animais.....	43
Grupos Experimentais	43
Cirurgia para Retirada dos Ovários	43
Administração do Maleato de Enalapril.....	44
Treinamento dos Animais.....	44
Protocolo Experimental.....	45
Pletismografia de Cauda.....	45
Ecocardiografia	46
Expressão e Atividade da Calpaína-1 e MMP-2	47
Histologia Cardíaca	49
Análise Estatística	Error! Bookmark not defined.
RESULTADOS	53
DISCUSSÃO	82
CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS	91

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A menopausa (mensis = mês; pausis = pausa), definida pela Organização Mundial da Saúde como o a fase da vida da mulher que ocorre durante o climatério, em que a capacidade reprodutiva chega ao fim, é 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 amenorreia (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 assim como na menopausa fisiológica, 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, comparada à menopausa fisiológica, proporciona riscos cardiovasculares ainda maiores (PARKER et al, 2009; LOBO, 2007; ATSMAS et al, 2006).

Portanto, independente da época da falência ovariana, diversos estudos sugerem que a proteção cardiovascular, observada na mulher antes da menopausa, é decorrente da ação cardioprotetora exercida pelos hormônios sexuais femininos, sobretudo os estrogênios (KNOWTON & LEE, 2012; VITALE et al, 2010; ARNAL et al, 2007). Por sua vez, os

mecanismos envolvidos nessa ação cardioprotetora, bem como o papel dos estrogênios, ainda não estão bem estabelecidos. O que é postulado 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).

Hormônios ovarianos e o sistema cardiovascular

Mais precisamente, a redução dos níveis de estrogênios parece estar intimamente relacionada 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). Entretanto, os mecanismos responsáveis por essas observações ainda são controversos. Com relação às outras ações dos estrogênios no sistema cardiovascular, há evidências de que também protejam a integridade estrutural dos vasos, influenciando na regulação da musculatura vascular por meio da inibição de substâncias pró-inflamatórias causadoras de lesão e apoptose celular, como por exemplo, as citocinas inflamatórias e as moléculas de adesão (XING et al, 2009; CUTINI et al, 2012). Também parecem atuar na modulação do tônus vascular por favorecer a produção de óxido nítrico pelo endotélio, importante fator de relaxamento vascular, e por inibir as vias celulares envolvidas na produção de substâncias vasoconstritoras, como espécies reativas ao oxigênio, endotelina I e a angiotensina II (ANTONICELLI et al, 2008; WU et al, 2009; DUCKLES & MILLER, 2010; PEDRAM et al, 2010). Essas evidências são apoiadas em observações que mostraram que os mecanismos de ação anti-inflamatória e a proteção vascular estariam reduzidos em mulheres após a falência hormonal ovariana (XING et al, 2009).

Em relação à morfologia e funcionalidade cardíaca, estudos sugerem que a redução dos hormônios femininos parece intimamente relacionada com a disfunção ventricular esquerda (OZDEMIR et al, 2004; DUNZELI et al, 2007; HAINES et al, 2012), causando prejuízos no remodelamento cardíaco, facilitando o desenvolvimento de hipertrofia concêntrica (HINDERLITER et al, 2002; TIVESTEN et al, 2006; DONALDSON et al, 2009), além do aumento desproporcional da síntese de colágeno, culminando com o aumento da fibrose cardíaca (VOLOSHENYUK & GARDNER, 2010; PEDRAM et al, 2010; CABANELAS et al, 2012). Resultados recentes obtidos em nosso laboratório (FELIX et al, 2015), em animais experimentais, também demonstraram um expressivo aumento da fibrose cardíaca, que foi evitado pelo concomitante treinamento físico aeróbio iniciado na segunda semana após a cirurgia para a retirada dos ovários (Figura 1).

O aumento da fibrose cardíaca é preocupante, porque muitas vezes é acompanhada de hipertrofia da parede cardíaca, resultando em consequências importantes sobre os cardiomiócitos, como a redução da eficiência do acoplamento excitação-contração e a diminuição da contratilidade (GÓMEZ et al, 1997; MILAN et al, 2010; BERNARDO et al, 2010; FILHO, 2013), ou seja, o aumento expressivo de fibrose pode provocar alterações nas propriedades mecânicas do coração (BROWER et al, 2006; BAUM & DUFFY, 2011; KNOWTON & LEE, 2012; THAM et al, 2015;), o que também resulta em prejuízos na oxigenação e no metabolismo local, como consequência da barreira física imposta pelas fibras colágenas entre as células (BAUM & DUFFY, 2011; KNOWTON & LEE, 2012; KONG et al, 2014). 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 (LEVY et al, 1990; KOREN et al, 1991; GOSSE, 2005).

Figura 1. À esquerda, valores referentes ao percentual de fibrose nos grupos controle (SHAM; N=12) e ovariectomizado (OVX; N=12), sedentários e treinados. * $P < 0,05$ comparado ao grupo SHAM sedentário; † $P < 0,05$ comparado ao grupo OVX sedentário. À direita, corte histológico representativo de cada grupo estudando, evidenciando a fibrose cardíaca pela coloração com Picro Sírius, utilizando um filtro polarizador. A) SHAM sedentário B) SHAM treinado C) OVX sedentário D) OVX treinado. *J Appl Physiol* **118**: 1276–1285, 2015.

Corroborando com as informações acima, foi demonstrado que os estrogênios possuiriam atividade anti-hipertrofica em cardiomiócitos, uma vez que estudos comparativos entre mulheres, antes e após da falência ovariana, identificaram maior incidência de hipertrofia ventricular esquerda naquelas após a ocorrência da menopausa

(HINDERLITER et al, 2002; DUNZELI et al, 2007; BELL et al, 2013). Do mesmo modo, modelos experimentais envolvendo a privação dos hormônios ovarianos mostraram aumento da massa ventricular esquerda e do peso cardíaco (JAZBUTYTE et al, 2006; FABRIS et al, 2011; HAINES et al, 2012).

Hormônios Ovarianos e Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

Outro aspecto importante é a relação direta entre a redução dos hormônios ovarianos e o aumento da atividade do sistema renina-angiotensina aldosterona (SRAA). De fato, foi demonstrado que a angiotensina II estaria envolvida em adaptações inadequadas na morfometria cardíaca e redução da angiogênese, acompanhadas pelo aumento na expressão cardíaca dos receptores AT₁ e AT₂. Todos esses fatores acarretariam prejuízos para a hemodinâmica cardíaca (BARBAGALLO et al, 1995; PRIME et al, 2007; HERNÁNDEZ et al, 1998; PATTEN & KARAS, 2006; YAMADA et al, 2006; KEIDAR et al, 2007). No entanto, a participação do SRAA nesse processo apresenta resultados contraditórios. Estudos apontaram que os estrogênios estimulariam o SRAA, aumentando os níveis plasmáticos de renina e, conseqüentemente, da angiotensina II (WEBBER & BRILLA, 1991; TOSTES et al, 2003). Logo, a reposição dos hormônios ovarianos poderia ser considerada como um fator de risco para o sistema cardiovascular, uma vez que promoveria o aumento dos níveis de angiotensina-II (TOSTES et al, 2003; KEIDAR et al, 2007; PRIME et al, 2007). Por outro lado, estudos experimentais em ratas ovariectomizadas, assim como, estudos clínicos em mulheres após a menopausa também demonstraram que a reposição estrogênica reduziria a atividade da enzima conversora da angiotensina e, conseqüentemente, a angiotensina II (KEIDAR et al, 2007; BROSNIHAN et al, 1997; HERNÁNDEZ et al, 1998; KOMUKAI et al, 2010). Adicionalmente, outro estudo também mostrou que a reposição estrogênica modularia os efeitos da angiotensina II ao inibir a expressão gênica de seus receptores,

principalmente o AT₁ (BROSNIHAN et al, 1997). Baseados em todos esses resultados, a relação entre os hormônios ovarianos e o SRAA necessita ser melhor investigada, principalmente porque a angiotensina-II pode afetar a homeostase corporal de diversas formas, a exemplo do seu efeito vasoconstrictor que ocorre de forma direta, por meio da ativação dos receptores AT₁, ou indiretamente, mediado pelo aumento da liberação de noradrenalina e potencializando o componente simpático do sistema nervoso autonômico. Em ambos os casos, manifesta seus maiores efeitos sobre o sistema arterial e menores efeitos sobre o sistema venoso. Desse modo, promove a constrição arteriolar por meio da produção e liberação de substâncias endoteliais vasoativas, como exemplo, a endotelina I, além da diminuição da ação vasodilatadora mediada pela bradicinina. A angiotensina-II também funciona como um modulador da inflamação e da aterosclerose; regula as respostas às citocinas nos vasos; inibe a fibrinólise; estimula diretamente a hiperplasia miocárdica e hipertrofia; provoca aumento das proteínas da matriz extracelular, como o colágeno e fibronectina e ainda, aumenta a proliferação de fibroblastos nas células vasculares do coração e do músculo liso (UNGER, 2003; CROWLEY et al, 2005; HERICHOVA & SZANTOOVA, 2013; SAYER & BHAT, 2014). Adicionalmente, a formação excessiva da angiotensina-II pode promover maior geração de espécies reativas de oxigênio, ativação de vias de sinalização apoptóticas e promoção da inflamação, trombose e remodelamento (OLKOWICKS et al, 2015). Ademais, no sistema nervoso central, a angiotensina-II parece aumentar a atividade do sistema nervoso simpático e inibir a resposta barorreflexa (MCKINLEY et al, 2003).

Por sua vez, em relação à hipertrofia e aumento da fibrose cardíaca diversos mecanismos podem contribuir para o desenvolvimento. A sobrecarga hemodinâmica cardíaca decorrente da hipertensão arterial sugere uma predominância de fatores mecânicos, tais como a tensão e o estiramento de parede, como os principais estímulos para a

manutenção da hipertrofia dos cardiomiócitos e aumento da fibrose. No entanto, estudos mostram a participação dos sistemas neuro-humorais, tais como o sistema renina-angiotensina-aldosterona e o sistema nervoso autônomo simpático, tanto na evolução da hipertrofia quanto no aumento da fibrose cardíaca, muitas vezes associadas à sobrecarga pressórica (AKERS et al., 2000; BARKI-HARRINGTON; PERRINO; ROCKMAN, 2004; DOSTAL; BAKER, 1999; TE RIET et al., 2015; WEBER; BRILLA, 1991). Nesse caso, o desequilíbrio existente entre os sistemas de síntese e proteólise, que são importantes na manutenção da integridade tecidual e homeostase celular, se configuram como um dos principais responsáveis por estas transformações cardíacas observadas após a privação dos hormônios ovarianos, principalmente quando ocorrem alterações hemodinâmicas caracterizadas, principalmente, pelo aumento da pressão arterial. Nesse caso, a atividade acentuada das metaloproteinases da matriz (MMPs) e das calpaínas são exemplos importantes destes sistemas que merecem ser investigadas (SCHULZ, 2007).

Papel das MMPs e das calpaínas no remodelamento cardíaco adverso

As MMPs pertencem a uma família de proteases dependentes de zinco que estão relacionadas significativamente ao remodelamento da matriz extracelular em vários tecidos, contribuindo diretamente para processos fisiológicos de adaptação e embriogênese e também para algumas condições patológicas, como a hipertensão arterial (BELO; GUIMARÃES; CASTRO, 2015). Dentre as diferentes isoformas das MMPs, a MMP-2 e a MMP-9 participam do remodelamento cardíaco mal adaptativo em modelos experimentais de hipertensão arterial e indução de hipertrofia cardíaca por sobrecarga pressórica. A MMP-2 é geralmente constitutiva e expressa nos cardiomiócitos e fibroblastos na sua forma latente (proMMP-2), em um complexo com seu principal inibidor endógeno, o inibidor tecidual de metaloproteinase do tipo-2 (TIMP-2). Entretanto, também pode ser induzida e ativada por

estresse oxidativo e agentes inflamatórios. A MMP-9 é mais comumente expressa em leucócitos, induzida por citocinas pró-inflamatórias (SCHULZ, 2007) e pode ser encontrada em tecidos cardiovasculares após a infiltração leucocitária.

Estudos também demonstram que as mudanças temporais na estrutura e função do ventrículo esquerdo cardíaco, induzidas por sobrecarga pressórica, estão associadas ao aumento na expressão e atividade de MMP-2 e -14. Essas MMPs apresentam um papel importante na ativação das vias bioquímicas pró-fibróticas, como integrinas e fator de crescimento transformante (TGF- β), que resultam em deposição cardíaca de colágeno e o remodelamento cardíaco. Além disto, estas MMPs contribuem para amplificação de MMP-2 solúveis, resultando em instabilidade de matriz extracelular e anormalidade de arquitetura tecidual (ZILE et al., 2014).

A inibição da atividade de MMPs como alvo farmacológico tem sido desenvolvida para o tratamento do câncer e doenças inflamatórias (STORR et al., 2011). Fármacos da classe das tetraciclinas, como a doxíciclina, podem inibir a atividade das MMPs por ligar-se ao zinco do sítio catalítico, e assim, preservam a estrutura ventricular esquerda e a função cardíaca total de corações isolados de ratos submetidos a modelo de reperfusão pós-isquêmica (KANDASAMY et al., 2010). No entanto, a participação das MMPs no aumento da fibrose cardíaca decorrente da privação dos hormônios ovarianos ainda não foi investigada.

Outro sistema proteolítico associado às modificações hipertróficas do músculo cardíaco é o das calpaínas. Proteases semelhantes à papaína e dependentes de íons cálcio, as calpaínas são membros da família de cisteína proteases não lisossomais, ativadas por cálcio em pH neutro, que são mediadoras críticas das ações do cálcio no compartimento intracelular (PATTERSON et al., 2011). A família pode ser dividida em dois grupos: ubíquas e tecido-específicas. As izoenzimas ubíquas das calpaínas, que estão mais envolvidas na

fisiopatologia de doenças cardiovasculares, diferem-se entre si em duas isoformas, micro-(μ -) e mili-(m-) calpaína, dependendo da quantidade de cálcio necessária para suas ativações (PERRIN; VERGELY; ROCHETTE, 2004).

A homeostase do cálcio é particularmente importante nos cardiomiócitos, já que há intensa circulação de cálcio a cada batimento cardíaco. Para que a homeostase ocorra, a mesma quantidade de cálcio que entra na membrana plasmática através dos canais do tipo L durante a contração pode ser removida pelo trocador de sódio/cálcio durante o relaxamento. Um mecanismo similar acontece para a liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático no meio intracelular com a participação dos receptores de rianodina tipo 2 e da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarco/endoplasmático (SERCA). A força de contração do músculo cardíaco, dessa forma, pode ser ajustada pela variação da concentração de cálcio que circula durante o funcionamento do coração. O remodelamento cardíaco hipertrófico, portanto, pode ser controlado por várias vias de sinalização dependentes de cálcio, como é o caso da ativação das calpaínas (BERRIDGE; BOOTMAN; RODERICK, 2003). A calpaína-1 também está relacionada ao aumento da produção de colágeno, fibrose e calcificação distrófica teciduais. Em modelo de hipertensão pulmonar induzida por fármacos ou por hipóxia in vivo e em cultura de células musculares lisas de artérias pulmonares, a atividade aumentada de calpaína-1 foi associada ao aumento da síntese de colágeno a partir da ativação intrácrina da via de sinalização de TGF- β (MA et al., 2011). A inibição-alvo da calpaína-1 em modelo de hipertrofia cardíaca induzida por diabetes também contribuiu para a diminuição da expressão proteica de colágeno III e TGF- β na parede ventricular (LI et al., 2011). Por outro lado, apesar de todo o conhecimento acerca da participação da calpaína-1 em diferentes processos fisiológicos também se desconhece o seu papel na fibrose cardíaca decorrente da privação hormonal ovariana.

Essa afirmação é importante uma vez que muitos dos efeitos cardiovasculares causados pela calpaína-1 também podem ser mediados por outras proteases, como as MMPs. A interação entre os sistemas proteolíticos, calpaína-1 e MMP-2, foi observada em artérias de roedores velhos pela infusão de angiotensina II, que resulta em hipertensão arterial e remodelamento vascular (JIANG et al., 2008). A inibição da atividade da calpaína-1 pelo seu inibidor endógeno, calpastatina, reduziu a atividade aumentada da MMP-2 e a migração celular do tipo mesenquimal (POSTOVIT et al., 2002), por modificar a razão de ativação MMP-14/TIMP-2. Além disto, a superexpressão de calpaína-1 em células musculares lisas vasculares diminuiu as quantidades proteicas de TIMP-2 e aumentou as de MMP-14, o que elevou a razão de ativação da MMP-2. Isto permite sugerir que a calpaína-1 possa contribuir para migração celular de forma dependente da MMP-14. A ativação da calpaína-1 também altera o estado de polimerização da vimentina, uma proteína que compõe os filamentos intermediários do citoesqueleto celular. Esta proteína pode se complexar com a MMP-14 e estimular sua translocação para a membrana plasmática. Assim, a MMP-14 facilita a ativação de MMP-2, como descrito anteriormente, e contribui para a proteólise do colágeno pela MMP-2, permitindo a migração celular (KANG et al., 2011; KWAK et al., 2012).

Por outro lado, a superexpressão de TIMP-2 em células musculares lisas vasculares foi capaz de inibir a atividade de MMP-2 e aumentar a expressão proteica de calpaína-1. Além disso, o tratamento com PD166793, um inibidor de MMP, também foi capaz de aumentar a expressão proteica de calpaína-1 em aorta de ratos jovens, embora tenha reduzido a atividade da MMP-2. De forma geral, todos esses dados mostram que a inibição da calpaína-1 parece reduzir os níveis proteicos e a ativação de MMP-2, enquanto a inibição de MMP-2 parece levar a um aumento na expressão de calpaína-1 como um evento compensatório, sugerindo que a ativação da MMP-2 é um evento de sinalização secundário à ativação da calpaína-1 (JIANG et al., 2012).

Ademais, durante o processo de isquemia e reperfusão cardíaca utilizando a metodologia de Langendorff, foi constatada redução significativa da função cardíaca associada ao aumento da atividade de calpaínas e MMPs. A utilização do inibidor inespecífico de MMPs, doxíciclina, atenuou a disfunção cardíaca sem afetar a atividade aumentada de calpaína-1. Por outro lado, o uso de inibidores de calpaína foi associado à redução significativa da atividade de MMPs nesses corações, sugerindo que a ativação das MMPs pode ser, em parte, explicada pela ativação da calpaína-1 (SINGH et al., 2012). Por sua vez, em modelo de hipertrofia cardíaca induzida por diabetes tipo 1 em camundongos, o aumento da atividade de calpaína-1 foi associado à expressão gênica aumentada de marcadores de hipertrofia celular como o fator natriurético atrial (ANF) e a cadeia pesada de miosina. Foi demonstrado nesse estudo que esses fatores estavam associados ao aumento da atividade de NF- κ B e NFAT. Além disso, os autores observaram aumento da expressão proteica e atividade de MMP-2 e MMP-9 e diminuição do TIMP-2 nos diferentes modelos de indução de diabetes, o que contribuiu para a disfunção cardíaca observada. A utilização de camundongos que superexpressam calpastatina e knock out para calpaína-4, a subunidade reguladora de calpaína-1, e o tratamento farmacológico com inibidor de calpaína-1 contribuíram para a diminuição de todos os parâmetros pró-hipertróficos e, dessa forma, para a melhora do remodelamento e da função cardíaca. Esses dados sugerem que a calpaína-1 contribui para o aumento da expressão proteica e atividade de MMP-2 durante a hipertrofia cardíaca induzida por diferentes modelos (LI et al., 2011). Apesar do aumento da atividade de calpaína-1 e MMP-2 já terem sido observados durante o remodelamento vascular e cardíaco em modelos animais de hipertensão arterial, pouco se sabe sobre a possível interação entre estes sistemas proteolíticos, e se de fato a calpaína modula a atividade da MMP-2 no remodelamento cardíaco hipertrófico concêntrico. Dessa forma, a hipótese desse trabalho é que o aumento da atividade da calpaína-1 em coração de ratas submetidas à

privação dos hormônios ovarianos contribua para o aumento da atividade da MMP-2, resultando em fibrose cardíaca, hipertrofia ventricular esquerda e disfunção celular.

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 falência ovariana, 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) (ROSSOUW et al, 2002), ambos apontando que a terapia de reposição hormonal, quando aplicada, 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 do declínio da produção 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 ampla, 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; GARCIARENA 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 (IECA) como forma de terapia farmacológica devem ser considerados para a prevenção e o tratamento dos prejuízos na morfologia e funcionalidade cardíaca decorrentes da falência ovariana. Nessa linha, estudos experimentais têm demonstrado que o tratamento com ECA promove redução da massa ventricular esquerda e melhora de parâmetros hemodinâmicos em ratos hipertensos (NUNEZ et al, 1999) e da função endotelial em ratas jovens ovariectomizadas (YUNG et al, 2011), além da 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 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 perante à privação dos hormônios ovarianos ainda não estão esclarecidas, principalmente com relação aos mecanismos intracelulares fibróticos e hipertróficos. Diante do exposto, nossa primeira hipótese é de que a privação dos hormônios ovarianos promova um remodelamento cardíaco adverso, prejudicando a função cardíaca, e que esse processo envolva o aumento da MMP-2 e da calpaína-1. Nossa segunda hipótese é que o treinamento físico aeróbio, bem como o tratamento crônico com um inibidor da ECA isolados e em conjunto possam interferir nesses mecanismos e atenuar os prejuízos cardíacos morfológicos e funcionais.

OBJETIVOS

Objetivos Gerais:

Investigar a participação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) sobre as adaptações hemodinâmicas, morfométricas e funcionais cardíacas decorrentes da privação dos hormônios ovarianos por meio da ovariectomia.

Verificar se a hipertrofia e a fibrose cardíaca induzidas pela privação dos hormônios ovarianos estão relacionadas ao aumento das atividades e expressões proteicas de MMP-2 e calpaína-1.

Avaliar o papel do treinamento físico aeróbio na atenuação e/ou prevenção das alterações hemodinâmicas, morfométricas e funcionais cardíacas.

Objetivos específicos:

Investigar se o tratamento com maleato de enalapril, bem como o treinamento físico aeróbio modulam a atividade e expressão proteica de calpaína-1, e consequentemente modulam a atividade e expressão de MMP-2, reduzindo as alterações morfofuncionais observadas no coração de ratas submetidas à privação dos hormônios ovarianos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais: Foi utilizado ratas da linhagem Wistar (N=64), provenientes do Biotério da PCARP/USP, com 10 semanas de idade. Durante o período experimental os animais foram acondicionados no Biotério do Departamento de Ciências da Saúde, 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).

Grupos experimentais: Como descrito acima, 64 ratas Wistar foram submetidas à ovariectomia na 10^a semana de vida e distribuídas em dois grandes grupos: grupo de ratas sedentárias com 22 semanas de vida (N=32) e grupo de ratas treinadas (N=32) por meio da natação durante as últimas 10 semanas (entre a 12^a e 22^a semanas de vida). Cada grande grupo foi subdividido em dois menores grupos; tratado somente com veículo (N=16) e tratado com maleato de enalapril (N=16), um inibidor da enzima conversora da angiotensina II. Os detalhes dos procedimentos e protocolos estão descritos a seguir.

Cirurgia para Retirada dos Ovários: Após um período de 12h de jejum, os animais foram submetidos à primeira intervenção cirúrgica. Sob anestesia de quetamina e xilazina (80 mg/kg e 10 mg/kg, i.p., respectivamente), as ratas foram submetidas à ovariectomia bilateral. Para realização da OVX, foi realizada 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. 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 (ALVES et al,

2011). Este último teve o tratamento estendido por 1 semana. A cirurgia sham (retirada fictícia dos ovários) foi realizada seguindo os mesmos procedimentos descritos para a ovariectomia, com exceção da ligadura das trompas uterinas e retirada dos ovários. Nos 10 dias subsequentes à realização da ovariectomia, ou à cirurgia sham, os animais permaneceram em caixas individuais para adequada recuperação pós-cirúrgica. Durante os últimos 15 dias do protocolo, a fase do ciclo estral das ratas foi monitorada por meio de coleta diária de material vaginal e análise histológica.

Administração de maleato de enalapril: O maleato de enalapril foi administrado diariamente após o procedimento cirúrgico, na dose de 10mg/kg, por via oral, durante 10 semanas (YUNG et al., 2011).

Treinamento dos Animais: As ratas foram submetidas a um protocolo de treinamento aeróbio por meio da natação em 2 aquários de vidro (comprimento=120cm; largura=80cm; profundidade=80cm) contendo água aquecida (33°C), divididos em 4 compartimentos (comprimento=60cm; largura=40cm; profundidade=80cm), permitindo o treinamento de 4 animais em cada aquário, entretanto, de forma individualizada. As duas primeiras semanas corresponderam a um período de adaptação ao treinamento, onde os animais foram treinados sem sobrecarga, 6 vezes por semana, em tempos crescentes (incremento de 5 min por dia), até atingirem 45 min de treinamento diário. Em seguida, os animais nadaram durante 45 min diariamente, 6 vezes por semana, durante 8 semanas com sobrepesos crescentes (2% do peso corporal na 3ª e 4ª semanas, 4% do peso corporal na 5ª e 6ª semanas, 6% do peso corporal na 7ª e 8ª semanas e 8% do peso corporal na 9ª e 10ª semanas) fixados na região peitoral (cinta impermeável com fecho em velcro contendo chumbo), se necessário. A escolha do peso das sobrecargas foi baseada na

avaliação da curva da concentração do lactato por meio do protocolo descrito por Gobatto et al, 2001. Essa avaliação ocorreu em quatro momentos, ou seja, na 3^a, 6^a e 8^a semanas de treinamento físico, cujo objetivo foi avaliar a intensidade do treinamento físico que deverá promover concentrações de lactato por volta de 5,8 mmol/L.

PROTOSCOLOS EXPERIMENTAIS

Pletismografia de cauda para avaliação da evolução da pressão arterial e frequência cardíaca.

Todos os grupos tiveram a evolução da PAS, PAD e PA média (PAM) registradas através da pletismografia de cauda utilizando o sistema CODA®, *Kent Scientific Corporation*. Este é um sistema de registro indireto de pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em que os ratos são acondicionados em um tubo cilíndrico de acrílico, no qual são aquecidos e ventilados de maneira adequada para a realização das medidas de PA.

Assim, os ratos foram acoplados na região proximal de sua cauda um manguito de borracha que possui a função de insuflar e desinflar automaticamente em intervalos fixos de 15 segundos. Próximo ao manguito foi acoplado um transdutor de pulso (sensor) que capta os sinais que são enviados e registrados em sistema de computador. Todos os animais passaram por um período de adaptação ao experimento através de 3 medidas que não foram consideradas. Em seguida, 12 novas medidas foram realizadas, e assim, a PA foi considerada como a média de no mínimo dez medidas. Este procedimento foi realizado com o objetivo de avaliar a evolução da pressão arterial e frequência cardíaca em todos as ratas, além de garantir que os grupos possuam médias de PA semelhantes antes de iniciarem qualquer protocolo. Todos os grupos foram acompanhados por 12

semanas e as aferições foram realizadas em quatro momentos distintos. Antes do início dos procedimentos, ou seja, antes da ovariectomia ou cirurgia sham (ratas com 10 semanas de idade), 4 semanas após o início do tratamento (ratas com 14 semanas de vida), 8 semanas após o início do tratamento (ratas com 18 semanas de vida) e ao final de 12 semanas de tratamento (ratas com 22 semanas de idade).

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

Este protocolo foi realizado no Laboratório Multiusuário de Ecocardiografia de pequenos animais, localizado na Cirurgia Experimental 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).

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 realizadas 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 foram realizadas sempre pelo mesmo observador sem conhecimento prévio da identificação do animal. 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 representaram 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 (μL) = $[\text{DDFVE}^3 \times (7 \div 2.4 + \text{DDFVE})]$ e volume sistólico final do ventrículo esquerdo; VSFVE(μL)= $[\text{DSFVE}^3 \times (7 \div 2.4 + \text{DSFVE})]$ (TEICHHOLZ et al, 1976).

Expressão da Calpaína-1 e MMP-2

Imunofluorescência

Os corações foram crio-seccionados ($5\mu\text{m}$) e fixados em acetona gelada por 5 minutos. As secções de coração foram lavadas com PBS (0.1M) seguida de duas lavagens com Triton-X 100 (0.3%, v/v, pH 7.3). As amostras foram bloqueadas com soro de burro (10%, v/v, #S-30, Millipore, EUA) por 1 hora. Em seguida, foram incubadas com anticorpos primários anti-calpaína-1 de coelho e anti-MMP-2 de camundongo por 1 hora em câmara escura úmida. Os anticorpos secundários anti- coelho Alexa 488 (1:250, A21206, Life technologies, EUA) e anti-camundongo Cy3 (dilução 1:250, AP192C, Millipore, EUA) foram usados por 1 hora nas mesmas condições anteriores e seguidas de duas lavagens com PBS e Triton-X 100. As imagens foram obtidas com microscopia de fluorescência (Leica DMI6000B, Heerbrugg, Suíça) e capturadas no aumento de 40x. Secções de coração do grupo Sham + veículo que foram incubadas somente com anticorpos primários ou com anticorpos secundários foram utilizadas como controle negativo.

Western Blot

As amostras de ventrículo esquerdo foram previamente trituradas e foi obtido o sobrenadante por centrifugação (13000 rpm, 10 min, 4°C). A quantidade de proteínas

obtidas no sobrenadante foi mensurada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). 5µg/ml de proteína, misturados em tampão desnaturante 2X, foram aplicados em gel SDS-PAGE 10% por eletroforese. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham Protran 0,45µm, 10600002, GE Healthcare, Suécia) em tampão de transferência (Tris 48mM, ácido aminoacético 39mM, dodecilsulfato de sódio 0,04%, v/v, álcool metílico 20%, v/v). As membranas foram incubadas com anticorpos primários contra calpaína-1 (diluição 1:5000, ab39170, Abcam, Reino Unido), após bloqueio da membrana com leite desnatado (5%, p/v, Blotting-Grade Blocker, #170-6404, BioRad, EUA) por 1 hora, por um período de 16 a 20 horas. As membranas foram lavadas 3 vezes com solução tampão Tris- Salina + Tween (0,1%) para posterior incubação com anticorpo secundário, anti- coelho (diluição 1:6000, #12-348, Millipore, EUA). As bandas foram identificadas por quimioluminescência (Amersham Imager 600, GE Healthcare, Suécia) com reagente ECL (Immobilon Western, WBKLS0500, Millipore, EUA) e quantificadas através do software Image J®. As bandas foram normalizadas a partir da marcação de bandas para anticorpo para proteína ribossomal S6 (diluição 1:5000, #2217S, Cell Signaling, EUA).

Histologia cardíaca

Coleta e processamento do material:

Os corações foram fixados em formaldeído a 10%, e fotografados. A morfometria macroscópica foi realizada através do software Image J (NIH, 2004), seguindo o guia disponível eletronicamente (ABDALLA *et al.*, 2004). Posteriormente, os corações foram seccionados transversalmente em duas regiões: a primeira na altura da inserção da veia cava inferior no átrio direito; a segunda no terço médio do ventrículo, ambas secções com

3 mm de espessura. Após a coleta, os dois fragmentos obtidos foram processados para rotina de inclusão em parafina.

Métodos histoquímicos:

Foram utilizadas as colorações da Hematoxilina–eosina (HE) para a quantificação das áreas de fibrose cardíaca.

Análise morfolométrica:

Após a coloração pela HE e pelo Picro-sírius, foi quantificada a fibrose cardíaca. As medidas e a quantificação foram realizadas utilizando-se uma câmara de vídeo acoplada a microscópio de luz comum que enviará as imagens do microscópio a um sistema analisador de imagens (KS 300 Kontron-Zeiss®). Esse sistema é constituído basicamente por um microscópio de luz acoplado a uma câmara de vídeo colorida, um monitor de vídeo de alta definição e uma unidade de processamento, com uma placa capturadora de vídeo.

A espessura do ventrículo esquerdo de cada caso foi estimada, fazendo-se quatro medidas distribuídas uniformemente pela área visível no vídeo, abrangendo o lado direito, esquerdo, superior e inferior do corte na lâmina. A lâmina foi colocada em uma posição antes do condensador e utilizada uma objetiva com aumento 5x para estas medidas.

Para a quantificação da fibrose cardíaca, utilizamos o método do cálculo da média acumulada (WILLIAMS, 1977) para estimar o número de campos representativos. Que foram quantificados oito campos em cada caso, e para o cálculo da fibrose foi determinada a média aritmética dos oito campos. Utilizamos um microscópio de luz comum e um filtro polarizador para que as áreas de fibrose sejam evidenciadas pela coloração Picro-sírius e quantificadas morfometricamente.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foram elaboradas planilhas eletrônicas, e as informações foram analisadas utilizando o programa eletrônico Sigma-Stat[®], versão 2.03. As variáveis normais, homocedásticas foram analisadas utilizando-se testes paramétricos ou não paramétricos quando requeridos. Na comparação entre dois grupos foi utilizado o teste "t" de Student para medidas independentes; na comparação intra-grupos, antes e depois do treinamento físico e/ou maleato de enalapril, foi utilizado o teste "t" para amostras pareadas; e na comparação entre três ou mais grupos, nos usamos a análise de variância (ANOVA), com o pós-teste de Tukey. Caso os dados não se encontrem na curva de normalidade e variância, utilizamos a análise de variância ranqueada (ANOVA OnRanks) com o pós-teste de Kruskal-Wallis. As proporções foram comparadas pelo teste do χ^2 , acompanhado do teste exato. Foi considerado uma diferença estatística quando o valor de p for menor que 0,05

RESULTADOS

RESULTADOS

Valores da pressão arterial sistólica, diastólica e média ao longo das 12 semanas do protocolo experimental, obtidos por meio da pletismografia de cauda.

As Figuras a seguir mostram a evolução da pressão arterial média, obtida por meio da pletismografia de cauda, nos grupos SHAM (Figura 2), OVX (Figura 3), SHAM & OVX sedentários (Figura 4) e SHAM & OVX treinados (Figura 5). Os resultados demonstraram que a ovariectomia, assim como os tratamentos com maleato de enalapril e treinamento físico não interferiram nos parâmetros da pressão arterial.

Figura 2 – Valores de pressão arterial média (PAM) aferidas através da pletismografia de cauda ao longo de 12 semanas, nos grupos submetidos à cirurgia SHAM, sedentários e treinados, tratados com veículo ou maleato de enalapril (ME). Os valores estão expressos em médias $\pm$ E.P.M.

Figura 3 – Valores de pressão arterial média (PAM) aferidas através da pletismografia de cauda ao longo das 12 semanas, nos grupos submetidos à ovariectomia (OVX), sedentários e treinados, tratados com veículo ou maleato de enalapril (ME). Os valores estão expressos em médias $\pm$ E.P.M.

Figura 4 – Valores de pressão arterial média (PAM) aferidas através da pletismografia de cauda ao longo das 12 semanas, obtidos nos grupos submetidos à cirurgia SHAM ou ovariectomizados (OVX) sedentários, tratados com veículo ou maleato de enalapril (ME). Os valores estão expressos em médias $\pm$ E.P.M.

Figura 5 – Valores de pressão arterial média (PAM) aferidas através da pletismografia de cauda ao longo das 12 semanas, obtidos nos grupos submetidos à cirurgia SHAM ou ovariectomizados (OVX) treinados, tratados com veículo ou maleato de enalapril (ME). Os valores estão expressos em médias $\pm$ E.P.M.

As Tabelas a seguir apresentam os valores dos parâmetros da pressão arterial (sistólica, diastólica e média) em todos os grupos experimentais nos quatro distintos momentos. A Tabela 1 mostra os valores obtidos antes do início dos procedimentos experimentais, ou seja, antes da ovariectomia ou cirurgia sham (ratas com 10 semanas de idade). A Tabela 2 apresenta os valores após 4 semanas do início dos procedimentos experimentais (ratas com 14 semanas de vida), ou seja, após a ovariectomia ou cirurgia sham. Na Tabela 3 estão demonstrados os valores da pressão arterial 8 semanas após o início dos procedimentos experimentais (ratas com 18 semanas de vida). Por sua vez, a Tabela 4 mostra os valores obtidos 12 semanas após o início dos procedimentos experimentais (ratas com 22 semanas de vida), ou seja, na última semana do protocolo experimental. Como apontado anteriormente, os resultados demonstraram que a ovariectomia, assim como o tratamento com maleato de enalapril e treinamento físico não interferiram nos parâmetros da pressão arterial.

Tabela 1: Valores médios da pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial média (PAM) aferidas por meio da pletismografia de cauda em todos os animais com 10 semanas de vida, após a divisão dos grupos experimentais, e antes dos procedimentos cirúrgicos (ovariectomia ou cirurgia sham) e realização dos protocolos.

	GRUPOS SHAM				GRUPOS OVX			
	Sedentário		Treinado		Sedentário		Treinado	
	Veículo	ME	Veículo	ME	Veículo	ME	Veículo	ME
Valores Hemodinâmicos								
PAS, mmHg	121,6 ± 5,3	117,5 ± 4,1	127 ± 6,5	119,4 ± 2,1	129 ± 4,8	126 ± 3,5	122,5 ± 7,9	125,9 ± 6,6
PAD, mmHg	81,3 ± 9,9	77,6 ± 2,2	75,5 ± 4	78,1 ± 2,9	84,1 ± 5,8	79,3 ± 3,5	88 ± 6,5	88,4 ± 5,8
PAM, mmHg	96,5 ± 5,1	90,9 ± 1,6	92,6 ± 2,3	91,2 ± 2,1	99,1 ± 4,9	94, 9 ± 3	99,5 ± 6,5	100,9 ± 5,2

Os valores estão expressos em médias ± E.P.M. SHAM, cirurgia fictícia; OVX, ovariectomia; Veículo (água); ME, maleato de enalapril; mmHg, milímetro de mercúrio.

Tabela 2: Valores médios de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial média (PAM) obtidos por meio da pletismografia de cauda realizada na 4ª semana (14ª semana de vida) após os procedimentos cirúrgicos (ovariectomia ou cirurgia sham) e após o início do treinamento físico aeróbico e/ou tratamento com maleato de enalapril.

	GRUPOS SHAM				GRUPOS OVX			
	Sedentário		Treinado		Sedentário		Treinado	
	Veículo	ME	Veículo	ME	Veículo	ME	Veículo	ME
Valores Hemodinâmicos								
PAS, mmHg	120,3 ± 6,5	113,6 ± 4,1	117,5 ± 3,7	111,9 ± 2,4	126,2 ± 9	110 ± 2,7	128 ± 2,1	109 ± 3,4
PAD, mmHg	85,2 ± 5,3	72,7 ± 3,2	80,2 ± 3,2	74,2 ± 4,4	81,9 ± 5,2	75,9 ± 3,1	72,4 ± 6,1	74 ± 2,2
PAM, mmHg	96,9 ± 5,3	86,3 ± 2,5	92,6 ± 3,2	86,7 ± 3	96,7 ± 5	87,2 ± 2,5	90,9 ± 4,5	85,7 ± 1,9

Os valores estão expressos em médias ± E.P.M. SHAM, cirurgia fictícia; OVX, ovariectomia; Veículo (água); ME, maleato de enalapril; mmHg, milímetro de mercúrio.

Tabela 3: Valores médios de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial média (PAM) obtidos por meio da pletismografia de cauda realizada na 8ª semana (18ª semana de vida) após os procedimentos cirúrgicos (ovariectomia ou cirurgia sham) e após o início do treinamento físico aeróbio e/ou tratamento com maleato de enalapril.

	GRUPOS SHAM				GRUPOS OVX			
	Sedentário		Treinado		Sedentário		Treinado	
	Veículo	ME	Veículo	ME	Veículo	ME	Veículo	ME
Valores Hemodinâmicos								
PAS, mmHg	118,3 ± 3,5	119,4 ± 4	120 ± 5,1	117,2 ± 4,6	118,6 ± 1,9	120,4 ± 1,9	114,9 ± 5,9	109,4 ± 3,2
PAD, mmHg	80,4 ± 4,4	78,2 ± 3,4	76,7 ± 2,3	81,1 ± 4,9	78,7 ± 2,4	75,3 ± 3,6	78,8 ± 2,5	78 ± 2,1
PAM, mmHg	93 ± 3,6	92 ± 2,8	91,1 ± 1,8	93,1 ± 4,2	92 ± 1,7	90,3 ± 2,2	90,8 ± 3,2	88,5 ± 2,3

Os valores estão expressos em médias ± E.P.M. SHAM, cirurgia fictícia; OVX, ovariectomia; Veículo (água); ME, maleato de enalapril; mmHg, milímetro de mercúrio.

Tabela 4: Valores médios de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial média (PAM) obtidos por meio da pletismografia de cauda realizada na 12ª semana (22ª semana de vida) após os procedimentos cirúrgicos (ovariectomia ou cirurgia sham) e após o início do treinamento físico aeróbico e/ou tratamento com maleato de enalapril.

	GRUPOS SHAM				GRUPOS OVX			
	Sedentário		Treinado		Sedentário		Treinado	
	Veículo	ME	Veículo	ME	Veículo	ME	Veículo	ME
Valores Hemodinâmicos								
PAS, mmHg	114 ± 3,8	110,1 ± 3,9	117,9 ± 4,1	106,6 ± 4,7	112,6 ± 4,4	117,9 ± 3,4	116,2 ± 6,9	115,5 ± 4,2
PAD, mmHg	77,8 ± 3,3	75,8 ± 2,8	77,5 ± 3,4	75,3 ± 2,5	80,4 ± 4,6	72,7 ± 2,2	70,8 ± 3,3	76 ± 3
PAM, mmHg	89,8 ± 3,1	87,2 ± 2,9	91 ± 1,7	85,7 ± 3	91,2 ± 4,2	87,8 ± 1,4	86 ± 4,3	91,8 ± 3

Os valores estão expressos em médias ± E.P.M. SHAM, cirurgia fictícia; OVX, ovariectomia; Veículo (água); ME, maleato de enalapril; mmHg, milímetro de mercúrio.

Peso Corporal, Peso Cardíaco e Peso Cardíaco Relativo dos grupos SHAM e ovariectomizados (OVX), sedentários e treinados.

A Tabela 5 mostra o peso corporal dos animais e os pesos absoluto e relativo do coração (Peso do coração/Peso corporal) em todos os grupos estudados. O grupo OVX sedentário apresentou maior peso corporal quando comparado ao grupo SHAM sedentário. No entanto, os pesos absoluto e relativo do coração mantiveram-se semelhante entre os dois grupos. O treinamento físico aeróbio, por sua vez, aumentou o peso corporal no grupo OVX, e também foi responsável por promover aumento no peso cardíaco absoluto e relativo, tanto no grupo SHAM quanto no grupo OVX. Quando os grupos treinados foram comparados, o grupo OVX apresentou maiores valores de peso corporal total e peso cardíaco absoluto em relação ao grupo SHAM, entretanto, o peso cardíaco relativo não foi diferente.

Tabela 5: Peso corporal final e pesos absoluto e relativo cardíaco, nos grupos SHAM e OVX, sedentários e treinados.

	SHAM		OVX		Fator Ovariectomia		Fator Treinamento físico		Interação	
	Sedentário	Treinado	Sedentário	Treinado	F _(DF)	P	F _(DF)	P	F _(DF)	P
Peso corporal final, g	352 ± 7,0	378 ± 13,5	402 ± 13,6*	480 ± 18,0 ^{#,+}	F _{(1,20):30,5}	<0,001	F _{(1,20):14,9}	<0,001	F _{(1,20):3,9}	>0,05
Peso cardíaco, g	0,98 ± 0,01	1,32 ± 0,03*	1,04 ± 0,02	1,64 ± 0,01 ^{#,+}	F _{(1,20):12,9}	0,002	F _{(1,20):81,6}	<0,001	F _{(1,20):6,4}	0,02
Peso cardíaco relativo, mg/g	2,81 ± 0,05	3,51 ± 0,08*	2,60 ± 0,08	3,38 ± 0,1 [#]	F _{(1,20):3,8}	>0,05	F _{(1,20):73,3}	<0,001	F _{(1,20):0,2}	>0,05

Todos os valores estão apresentados como média ± E.P.M. g, gramas; mg, miligramas. *P<0,05 comparado ao grupo SHAM sedentário;

[#]P<0,05 comparado ao grupo ovariectomizado (OVX) sedentário; ⁺P<0,05 comparado ao grupo SHAM treinado.

A Tabela 6 mostra os valores morfológicos cardíacos, obtidos em todos os grupos estudados, por meio de ecocardiografia bidimensional convencional. Os resultados mostram que a espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo dos grupos sedentários, SHAM e OVX, apresentaram valores semelhantes. Por outro lado, o grupo SHAM treinado apresentou valores inferiores em relação ao grupo SHAM sedentário, enquanto o grupo OVX treinado apresentou aumento na espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo em relação ao grupo SHAM treinado.

Os grupos OVX, sedentário e treinado, apresentaram valores superiores da espessura do septo interventricular quando comparados aos respectivos grupos SHAM. Por outro lado, o treinamento físico não alterou os valores observados nos grupos sedentários, SHAM e OVX.

Quanto à espessura relativa da parede, a Tabela 6 mostra que o grupo OVX sedentário apresentou valores inferiores ao grupo SHAM, também sedentário. Por sua vez, os grupos treinados não diferiram dos respectivos grupos sedentários. Em relação a razão da massa do ventrículo esquerdo/peso corporal total os resultados mostram que os grupos OVX, sedentário e treinado, apresentaram maiores valores quando comparados aos respectivos grupos SHAM. Adicionalmente, os grupos treinados, SHAM e OVX, não diferiram dos respectivos grupos sedentários.

A Tabela 6 também mostra os valores médios dos diâmetros diastólico e sistólico de todos os grupos estudados. Os grupos OVX, sedentário e treinado, apresentaram maiores valores quando comparados aos respectivos grupos SHAM. Por sua vez, os grupos treinados não diferiram dos seus respectivos grupos sedentários.

Tabela 6: Efeitos da ovariectomia e do treinamento físico aeróbico sobre o remodelamento cardíaco.

	SHAM		OVX		Fator Ovariectomia		Fator Treinamento físico		Interação	
	Sedentário	Treinado	Sedentário	Treinado	F _(DF)	P	F _(DF)	P	F _(DF)	P
Morfologia Cardíaca										
Espessura Parede Posterior (mm)	1,56 ± 0,04	1,41 ± 0,04*	1,59 ± 0,03	1,69 ± 0,05 ⁺	F _(1,17) :11,2	0,004	F _(1,17) :0,2	>0,05	F _(1,17) :7,4	0,01
Espessura Septo Interventricular (mm)	1,52 ± 0,05	1,53 ± 0,05	1,69 ± 0,06*	1,70 ± 0,08 ⁺	F _(1,17) :7,1	0,01	F _(1,17) :0,1	>0,05	F _(1,17) :0,1	>0,05
Espessura Relativa do VE (mm)	0,68 ± 0,01	0,63 ± 0,04	0,56 ± 0,02*	0,57 ± 0,04	F _(1,17) :5,7	0,02	F _(1,17) :0,1	>0,05	F _(1,17) :0,6	>0,05
Diâmetro Diastólico Final (mm)	4,5 ± 0,1	4,8 ± 0,3	5,6 ± 0,3*	5,9 ± 0,4 ⁺	F _(1,17) :17,5	<0,001	F _(1,17) :0,1	>0,05	F _(1,17) :0,3	>0,05
Diâmetro Sistólico Final (mm)	2,3 ± 0,1	2,1 ± 0,2	3,1 ± 0,2*	3,3 ± 0,2 ⁺	F _(1,17) :10,9	0,004	F _(1,17) :0,1	>0,05	F _(1,17) :0,1	>0,05
Massa do VE (mg/g)	0,83 ± 0,04	0,82 ± 0,06	1,23 ± 0,01*	1,15 ± 0,01 ⁺	F _(1,17) :13,3	0,002	F _(1,17) :0,1	>0,05	F _(1,17) :0,1	>0,05

Todos os valores estão apresentados como média ± E.P.M. % (percentual de fibrose); mm, milímetros por metro quadrado; mg, miligramas; g, gramas. *P<0,05 versus SHAM sedentário; #P<0,05 versus Ovariectomia (OVX) sedentário; ⁺P<0,05 versus SHAM treinados.

Na Tabela 7 estão representados os valores da fração de encurtamento e da fração de ejeção, e mostra que não houve diferenças entre os grupos estudados. Também mostra os valores médios dos volumes diastólico e sistólico final do ventrículo esquerdo de todos os grupos estudados. O grupo OVX sedentário apresentou maiores volumes, tanto sistólico, quanto diastólico, em relação ao grupo SHAM sedentário. Por sua vez, os grupos treinados não diferiram dos seus respectivos grupos sedentários.

Tabela 7: Efeitos da ovariectomia (OVX) e do treinamento físico aeróbio sobre a função cardíaca.

	SHAM		OVX		Fator Ovariectomia		Fator treinamento físico		Interação	
	Sedentário	Treinado	Sedentário	Treinado	F _(DF)	P	F _(DF)	P	F _(DF)	P
Função Cardíaca										
Fração de Ejeção (%)	84 ± 2,2	83,5 ± 3,5	80 ± 2,2	84 ± 3,8	F _(1,17) :0,3	>0,05	F _(1,17) :0,0	>0,05	F _(1,17) :0,5	>0,05
Fração de Encurtamento (%)	48,4 ± 2,7	50 ± 5,4	44,6 ± 2,2	50,6 ± 7,1	F _(1,17) :0,1	>0,05	F _(1,17) :0,5	>0,05	F _(1,17) :0,1	>0,05
Volume Diastólico Final do VE (mm ³)	0,24 ± 0,02	0,28 ± 0,05	0,44 ± 0,06*	0,52 ± 0,1 ⁺	F _(1,17) :15,1	0,001	F _(1,17) :0,2	>0,05	F _(1,17) :0,3	>0,05
Volume Sistólico Final do VE (mm ³)	0,03 ± 0,004	0,03 ± 0,011	0,09 ± 0,021 *	0,08 ± 0,011	F _(1,17) :7,9	0,01	F _(1,17) :0,2	>0,05	F _(1,17) :0,2	>0,05

Todos os valores são expressos como Média ± EPM. %, percentual. *P<0,05 versus SHAM sedentário; #P<0,05 versus Ovariectomia (OVX) sedentário; ⁺P<0,05 versus SHAM treinados.

Peso Corporal, Peso Cardíaco e Peso Cardíaco Relativo dos grupos ovariectomizados (OVX), sedentários e treinados, tratados com maleato de enalapril (ME).

A Tabela 8 mostra que todos os grupos apresentavam pesos semelhantes no início do protocolo experimental. O grupo OVX-ME sedentário apresentou menores valores do peso corporal final e menor valor de peso cardíaco relativo quando comparado ao grupo OVX também sedentário. Quanto ao efeito do treinamento físico, observamos que tanto o grupo OVX, quanto o grupo OVX-ME apresentaram maiores valores de peso cardíaco e peso cardíaco relativo que seus respectivos grupos sedentários.

Morfologia cardíaca – valores corrigidos pelo peso

A Tabela 9 também mostra que o grupo OVX-ME sedentário apresentou maiores valores da espessura do septo interventricular (SIV) em relação ao grupo OVX também sedentário. Os grupos sedentários e treinados não apresentaram diferenças significativas. No entanto, quando os grupos treinados foram comparados, o grupo OVX-ME apresentou maiores valores da espessura da parede posterior (EPP), espessura relativa da parede (ERP) e espessura do SIV em relação ao grupo OVX.

Quanto aos valores da massa do ventrículo esquerdo (MVE), diâmetros diastólicos (DDFVE) e sistólicos finais (DSFVE) nos grupos OVX e OVX-ME, sedentários e treinados, os resultados mostram que os grupos OVX e OVX-ME sedentários não diferiram. Por outro lado, os grupos treinados, OVX e OVX-ME, apresentaram maiores valores do diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo em relação aos respectivos grupos sedentários.

Tabela 8: Peso corporal final e pesos absoluto e relativo cardíaco, nos grupos SHAM e OVX, sedentários e treinados.

	OVX		OVX-ME		Fator Treinamento Físico	Fator Maleato de Enalapril	Interação
	Sedentário	Treinado	Sedentário	Treinado	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>
Morfologia Cardíaca							
Peso Corporal, g	437 ± 7	444 ± 15	406 ± 16 ^a	424 ± 10	<i>NS</i>	0.020	<i>NS</i>
Peso Cardíaco, g	1.03 ± 0.03	1.20 ± 0.03 ^a	1.02 ± 0.04	1.19 ± 0.01 ^c	<0.001	<i>NS</i>	<i>NS</i>
Peso Cardíaco Relativo, mg/kg	2.35 ± 0.05	2.78 ± 0.07 ^a	2.60 ± 0.07 ^a	2.79 ± 0.09 ^c	<0.001	0.017	<i>NS</i>

Todos os valores estão apresentados como média ± E.P.M. g, gramas; mg, miligramas. ^aP<0,05 comparado ao grupo OVX sedentário; ^bP<0,05 comparado ao grupo ovariectomizado (OVX) treinado; ^cP<0,05 comparado ao grupo OVX-ME sedentário. *NS*: não significativo.

Tabela 9: Parâmetros morfológicos cardíacos obtidos nos grupos ovariectomizados (OVX) e tratados com maleato de Enalapril (OVX-ME), sedentários e treinados.

	OVX		OVX-ME		Fator Treinamento Físico	Fator Maleato de Enalapril	Interação
	Sedentário	Treinado	Sedentário	Treinado	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>
Morfologia Cardíaca							
Espessura Parede Posterior (mm)	4.14 ± 0.22	3.54 ± 0.23	4.29 ± 0.07	4.77 ± 0.28 ^b	<i>NS</i>	0.014	0.049
Espessura Septo Interventricular	3.42 ± 0.09	3.12 ± 0.13	4.20 ± 0.27 ^a	3.87 ± 0.13 ^b	<i>NS</i>	<0.001	<i>NS</i>
Espessura Relativa do VE (mm)	1.04 ± 0.06	0.86 ± 0.05	1.19 ± 0.10	1.23 ± 0.04 ^b	<i>NS</i>	0.002	<i>NS</i>
Diâmetro Diastólico Final (mm)	17.8 ± 0.69	18.9 ± 0.52	18.5 ± 0.55	19.5 ± 0.80	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>
Diâmetro Sistólico Final (mm)	11.3 ± 0.43	13.1 ± 0.40 ^a	10.9 ± 0.70	12.8 ± 0.86 ^c	0.008	<i>NS</i>	<i>NS</i>
Massa do VE (mg/g)	2.15 ± 0.13	1.98 ± 0.15	2.17 ± 0.08	2.49 ± 0.22	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>

Espessura da parede posterior (EPP) do ventrículo esquerdo, septo interventricular (SIV), espessura relativa da parede (ERP), diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DDFVE), diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (DSFVE) e massa do ventrículo esquerdo (MVE). g, grama; mg, miligrama; kg, quilograma; mm, milímetro. Os valores estão apresentados como médias ± EPM. ^a P<0.05 vs. OVX sedentário; ^b P<0.05 vs. OVX treinado; ^c P<0.05 vs. OVX-ME sedentário. *NS*: não significativo.

Função cardíaca

A Tabela 11 mostra os valores funcionais cardíacos obtidos por meio da ecocardiografia bidimensional nos grupos OVX e OVX-ME, sedentários e treinados. Os grupos OVX e OVX-ME sedentários não apresentam diferenças significativas em relação à fração de ejeção, fração de encurtamento, débito cardíaco e índice cardíaco. A única diferença foi que o grupo OVX-ME sedentário apresentou uma maior FC em relação ao grupo OVX sedentário durante o exame ecocardiográfico. Por outro lado, os grupos OVX e OVX-ME treinados apresentaram menores valores da fração de ejeção e fração de encurtamento em relação aos seus respectivos grupos sedentários.

A Tabela 10 também mostra que os grupos sedentários OVX e OVX-ME não diferiram em relação ao volume de ejeção, volume diastólico final do ventrículo esquerdo (VDFVE) e volume sistólico final do ventrículo esquerdo (VSFVE). No entanto, os grupos treinados OVX e OVX-ME apresentaram aumentos no VSFVE em relação aos seus respectivos grupos sedentários.

Tabela 10: Parâmetros funcionais cardíacos obtidos nos grupos ovariectomizados (OVX) e tratados com maleato de Enalapril (OVX-ME), sedentários e treinados.

	OVX		OVX-ME		Fator Treinamento Físico	Fator Maleato de Enalapril	Interação
	Sedentário	Treinado	Sedentário	Treinado	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>
Função Cardíaca							
FC, bpm	285 ± 5	296 ± 6	338 ± 8 ^a	298 ± 5 ^c	0.029	<0.001	<0.001
VDFVE (μL)	539 ± 48	565 ± 46	420 ± 63	501 ± 45	NS	NS	NS
VSFVE (μL)	105 ± 14	150 ± 12 ^a	67 ± 15	111 ± 48 ^c	0.010	0.025	NS

Parâmetros funcionais cardíacos. Frequência cardíaca (FC), volume diastólico final do ventrículo esquerdo (VDFVE), volume sistólico final do ventrículo esquerdo (VSFVE). bpm, batimentos por minuto; μL, microlitros. Os valores estão apresentados como médias ± EPM. ^a P<0.05 vs. OVX sedentário; ^c P<0.05 vs. OVX-ME sedentário. NS: não significativo.

Tabela 11: Parâmetros funcionais cardíacos obtidos nos grupos ovariectomizados (OVX) e tratados com maleato de Enalapril (OVX-ME), sedentários e treinados.

	OVX		OVX-ME		Fator Treinamento Físico	Fator Maleato de Enalapril	Interação
	Sedentário	Treinado	Sedentário	Treinado	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>
Função Cardíaca							
Volume de Ejeção, μL	430 $\pm$ 37	415 $\pm$ 42	352 $\pm$ 50	389 $\pm$ 27	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>
Fração de Ejeção, %	80 $\pm$ 2	75 $\pm$ 2 ^a	85 $\pm$ 3	78 $\pm$ 2 ^c	0.006	0.046	<i>NS</i>
Fração de Encurtamento, %	35 $\pm$ 2	31 $\pm$ 1	41 $\pm$ 3	34 $\pm$ 2 ^c	0.015	0.045	<i>NS</i>
Débito Cardíaco, mL/ min	121 $\pm$ 11	124 $\pm$ 12	119 $\pm$ 16	116 $\pm$ 8	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>
Índice Cardíaco, mL/g	0.26 $\pm$ 0.02	0.29 $\pm$ 0.20	0.29 $\pm$ 0.03	0.29 $\pm$ 0.02	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>

Parâmetros funcionais cardíacos. Volume de ejeção (VE), fração de ejeção (FE), fração de encurtamento (F_{enc}), débito cardíaco (DC), índice cardíaco (IC). bpm, batimentos por minuto; μL , microlitros; mL, mililitros; min, minuto; g, grama. Os valores estão apresentados como médias $\pm$ EPM. ^a $P < 0.05$ vs. OVX sedentário; ^c $P < 0.05$ vs. OVX-ME sedentário. *NS*: não significativo.

Percentual de fibrose cardíaca

A Figura 6 mostra o aumento expressivo da fibrose cardíaca induzido pela ovariectomia (grupo OVX). Também mostra que o treinamento físico impediu o aumento da fibrose (grupo OVX-T).

Por sua vez, os grupos OVX-ME, sedentário e treinado, apresentaram maiores percentuais de fibrose em relação aos grupos OVX sedentário e treinado, respectivamente. Quando treinados, ambos os grupos apresentaram redução do percentual de fibrose em relação aos seus respectivos grupos sedentários (Figura 7). Entretanto, o grupo ovariectomizado treinado e tratado com maleato de enalapril (OVX-ME) apresentou maiores percentuais de fibrose em relação ao grupo ovariectomizado treinado (OVX-T).

Figura 6. Imagens histológicas representativas (barra de escala: 100 μm) da fibrose cardíaca de cada grupo experimental. (A) Grupo sham não treinado (SHAM); (B) Grupo sham treinado (SHAM-T); (C) Grupo ovariectomizado não treinado (OVX); (D) Grupo ovariectomizado treinado (OVX-T). A Figura logo abaixo mostra a média do percentual de fibrose cardíaca de cada grupo experimental. Os valores estão apresentados como média ± EPM. ^a $P < 0.05$ vs. grupo SHAM; ^b $P < 0.05$ vs. grupo SHAM-T; e ^c $P < 0.05$ vs. grupo OVX.

Figura 7. Imagens histológicas representativas (barra de escala: 100 μ m) da fibrose cardíaca de cada grupo experimental. (A) Grupo ovariectomizado não treinado (OVX); (B) Grupo ovariectomizado treinado (OVX-T); (C) Grupo ovariectomizado não treinado e tratado com maleato de enalapril (OVX-EM); (D) Grupo ovariectomizado treinado e tratado com maleato de enalapril (OVX-EMT). A Figura logo abaixo mostra a média do percentual de fibrose cardíaca de cada grupo experimental. Os valores estão apresentados como média $\pm$ EPM. ^a $P < 0.05$ vs. grupo OVX; ^b $P < 0.05$ vs. grupo OVX-T; e ^c $P < 0.05$ vs. grupo OVX-EM.

Expressão da calpaína-1 e MMP-2.

As Figuras 8A e 8B mostram os valores da expressão proteica de calpaína-1 (Figura 9A) e MMP-2 (Figura 9B) em ratas sham (grupos SHAM) e ovariectomizadas (grupos OVX) não treinadas e submetidas ao treinamento físico aeróbio. Os resultados mostram que a ovariectomia (grupo OVX) aumentou a expressão da calpaína-1 e MMP-2. Por sua vez, o treinamento físico aeróbio reduziu a expressão de ambas.

Por sua vez, as Figuras 9A e 9B mostram os valores da expressão proteica de calpaína-1 (Figura 10A) e MMP-2 (Figura 10B) em ratas ovariectomizadas (grupos OVX) e tratadas com maleato de enalapril (grupos OVX-ME) não treinadas e submetidas ao treinamento físico aeróbio. Os resultados mostram que a ovariectomia (grupo OVX) aumentou a expressão da calpaína-1 e MMP-2 independentemente do tratamento com maleato de enalapril. Por sua vez, o treinamento físico aeróbio reduziu a expressão de calpaína-1 (9A) e MMP-2 (9B) em ambos os grupos.

Figura 8. Expressão proteica da calpaína-1 (A) e MMP-2 realizada pela técnica de *Western blot* em ventrículo esquerdo dos animais sham (SHAM) e ovariectomizados (OVX) submetidos ao treinamento físico aeróbio. Todos os valores estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). ^a $P < 0,05$ vs. SHAM; ^b $P < 0,05$ vs. SHAM treinado; ^c $P < 0,05$ vs. OVX.

Figura 9. Expressão proteica da calpaína-1 (A) e MMP-2 realizada pela técnica de *Western blot* em ventrículo esquerdo dos animais ovariectomizados (OVX), tratados com maleato de enalapril (OVX-ME) e submetidos ao treinamento físico aeróbio. Todos os valores estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). ^a $P < 0,05$ vs. OVX; ^b $P < 0,05$ vs. OVX treinado; ^c $P < 0,05$ vs. OVX-ME.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram que a privação dos hormônios ovarianos aumenta a fibrose cardíaca associada ao aumento da expressão de calpaína -1 e MMP-2. Ambos aumentos foram evitados pelo treinamento físico aeróbio. Ademais, o treinamento físico atenuou o remodelamento cardíaco adverso observado no grupo submetido à privação dos hormônios ovarianos, entretanto ao exame ecocardiográfico somente foram notadas discretas alterações nos parâmetros funcionais cardíacos. Por sua vez, o tratamento com maleato de enalapril potencializou o aumento da fibrose cardíaca em ratas ovariectomizadas, e não interferiu na expressão de calpaína-1 e MMP-2. Também foram observadas discretas alterações morfológicas, entretanto, sem maiores prejuízos na função cardíaca. O treinamento físico, embora tenha impedido o aumento da fibrose cardíaca nos animais ovariectomizados, quando associado ao tratamento com maleato de enalapril (grupo OVX-ME), promoveu efeitos mais modestos.

Estudo prévio realizado em nosso laboratório demonstrou que ratas jovens, quando submetidas à ovariectomia, apresentavam importante aumento de fibrose cardíaca (FELIX et al, 2015). Esse aumento, relacionado com a síntese desproporcional de colágeno, poderia ser decorrente de alguns fatores, inclusive o aumento na produção de Ang-II (CABANELAS et al, 2012; MILAN et al, 2010; PEDRAM et al, 2010; BERNARDO et al, 2010; WU et al, 2009; BRILLA et al, 1995a, BRILLA et al, 1995b). Nesse contexto, nossa hipótese era de que o tratamento com um inibidor da enzima conversora da Ang-II pudesse evitar ou atenuar o aumento da fibrose. No entanto, nossos resultados mostraram que o tratamento crônico com maleato de enalapril durante 12 semanas em ratas ovariectomizadas provocou o efeito inverso, ou seja, o aumento na fibrose cardíaca, contrariando estudos prévios que demonstraram a importância da participação da Ang-II no processo de desenvolvimento da fibrose cardíaca nessas condições (MILAN et al, 2010; PIOTRKOWSKI et al, 2009; FUNABIKI et al, 2004;

SANTOS et al, 2004; BRILLA et al, 1995a; BRILLA et al, 1995b; BRILLA et al, 1995c; SADOSHIMA et al, 1993a; SADOSHIMA et al, 1993b). De fato, esses estudos sugeriam que o estímulo de fibroblastos, via receptores AT1, aumentaria a síntese de colágeno I e III, e reduziria a atividade da metaloproteinase de matrix-1 (colagenase intersticial), que é a enzima chave para a degradação de colágeno fibrilar no interstício, levando ao acúmulo excessivo de colágeno (BRILLA et al, 1995a; BRILLA et al, 1995b; BRILLA et al, 1995c). Inclusive, estudos clínicos e experimentais também sugeriam a utilização de drogas que inibem o sistema renina-angiotensina (SRA), como forma de prevenção e reversão da fibrose e do remodelamento cardíaco adverso em diferentes situações fisiopatológicas (FABRIS et al, 2011; GARCÍA et al, 2006; SANTOS et al, 2004).

De fato, existem poucos estudos que investigaram o efeito do tratamento crônico da inibição da enzima conversora da angiotensina (iECA) sobre o remodelamento cardíaco em ratas jovens submetidas à privação dos hormônios ovarianos, a não ser alguns que investigaram seus efeitos em ratas espontaneamente hipertensas (SHR). Esses estudos mostraram que a iECA, além de reduzir a pressão arterial, também atenuava o remodelamento cardíaco adverso (FABRIS et al, 2011; GARCIA et al, 2006; VAN EICKELS et al, 2005; SANTOS et al, 2004). A causa dos nossos achados controversos ainda é incerta, entretanto, algumas hipóteses podem ser formuladas. É possível que o aumento expressivo da fibrose cardíaca, induzida pelo tratamento crônico com maleato de enalapril, seja decorrente do aumento da atividade do componente autonômico simpático para o coração. A causa desse aumento é desconhecida, entretanto, já foi demonstrado que a elevação dos níveis de bradicinina, que ocorre após a inibição da ECA, pode promover o aumento na liberação reflexa de noradrenalina (MINISI & THAMES, 1993). Contudo, essa hipótese precisa ser melhor investigada, principalmente com ferramentas que permitam a avaliação da função autonômica cardíaca, uma vez que no presente estudo não realizamos tal avaliação. No entanto, uma outra hipótese é a possível ativação ou hiperativação de outra via de formação da Ang-II não dependente da enzima conversora da

angiotensina (ECA) (ROBLES et al, 2012; LÓPEZ-SENDÓN et al, 2004; MACFAYDEN et al, 1999). Nesse sentido, alguns estudos mostraram que a Ang-II formada por vias alternativas independentes da ECA, incluindo quimases, catepsina G, elastase-2, ativador de plasminogênio tecidual (TPA) e tonina, agiriam sobre os cardiomiócitos e endotélio vascular (UEHARA et al, 2013; ROBLES et al, 2012; BECARI et al, 2011a; BECARI et al, 2011b; CHOU et al, 2008; RIBEIRO & FLORÊNCIO, 2000; BALCELLS et al, 1997; JUILLERATI et al, 1990). Entretanto, estas vias de formação de Ang-II ainda necessitam de investigações mais aprofundadas, inclusive porque além do aumento da fibrose também observamos discretas alterações morfológicas e funcionais cardíacas nos animais ovariectomizados não treinados. Essas alterações, embora não significativas, a não ser pelo aumento da espessura do septo interventricular, sugerem um processo inicial de remodelamento cardíaco adverso, apontando a necessidade de um seguimento desses animais por um período mais longo, a fim de identificar as possíveis consequências morfológicas e funcionais cardíacas desse processo. Outros achados, não menos importantes, também precisam ser investigados, como a redução do peso corporal observado nos animais tratados com maleato de enalapril. Nesse caso, a literatura sugere que essa redução no ganho de peso corporal seria decorrente do aumento da adiponectina circulante, afetando o perfil lipídico (DOST et al, 2014; WEISINGER et al, 2009; SANTOS et al, 2004; CARTER et al, 2004).

Por outro lado, o treinamento físico aeróbio foi capaz de reduzir a fibrose cardíaca em ambos os grupos, corroborando com resultados prévios na literatura (FELIX et al, 2015; KWAK et al, 2011; GARCIARENA et al, 2009; PEREIRA et al, 2009; MARQUES et al, 2006), entretanto, de forma atenuada no grupo OVX-EM. Apesar de os mecanismos pelos quais o treinamento físico aeróbio reduz a fibrose cardíaca ainda não tenham sido completamente identificados, nosso estudo mostra um efeito sobre a produção de calpaína-1 e MMP-2. No entanto, a literatura aponta que o exercício físico agudo aumenta a atividade da calpaína da musculatura esquelética e cardíaca (BELCASTRO 1993, BELCASTRO et al. 1996), entretanto,

o efeito crônico do treinamento físico sobre a atividade proteolítica da calpaína -1 e MMP-2 não é completamente entendido. A ação proteolítica da calpaína-1 induz a degradação de proteínas da matriz específicas, resultando na produção de quimioatrativos neutrófilos (TIDDUS et al. 2002), o que possivelmente resulta em aumento da fibrose cardíaca. De fato, a fibrose cardíaca é caracterizada por um excesso de deposição da matriz extracelular, que se deve a um desequilíbrio entre a síntese e a degradação do colágeno (LIN et al. 2020). No entanto, o treinamento físico crônico parece ser fundamental para reduzir a fibrose cardíaca por reduzir a expressão da atividade proteolítica da calpaína -1e MMP-2, e um dos possíveis mecanismos protetores advindos do treinamento físico é por meio da atuação sobre a modulação do tônus vascular e/ou inibindo as vias celulares envolvidas na produção de substâncias vasoconstritoras, como espécies reativas ao oxigênio, endotelina I e a angiotensina II (ANTONICELLI et al, 2008; WU et al, 2009; DUCKLES & MILLER, 2010; PEDRAM et al, 2010). Em adição, estudos demonstraram que a MMP-2 está expressa nos cardiomiócitos e fibroblastos na sua forma latente (proMMP-2) e apresentam papel importante na ativação das vias bioquímicas pró-fibróticas, como integrinas e o fator de crescimento transformante (TGF- β) que resultam em deposição cardíaca de colágeno e remodelamento cardíaco (Zile et al. 2014). Por sua vez, a calpaína1 também foi associada ao aumento da síntese de colágeno a partir da ativação intrácrina da via de sinalização de TGF- β (MA et al. 2011).

Em relação aos efeitos do exercício físico sobre a atividade das MMPs e calpaína1, tem sido sugerido uma importante atuação sobre a regulação destas proteases. Recentemente foi demonstrado que ratas Wistar ovariectomizadas, expostas a uma dieta rica em triglicérides, mas submetidas a 12 semanas de exercício físico aeróbico, apresentaram alterações na atividade da MMP-2 e na deposição de colágeno. Nesse caso, foi observado redução da deposição de colágeno e aumento concomitante da atividade da MMP-2 via aumento das concentrações de glutatona e peroxinitrito (SZABÓ et al, 2018). No entanto, a complexidade das propriedades de ativação das MMPs não é uniformemente concordante, especialmente em patologias

cardiovasculares. Outro aspecto importante é que a terapia hormonal parece não prevenir o agravamento da função cardíaca em ratas ovariectomizadas após infarto do miocárdio e ainda alteraria negativamente os parâmetros envolvidos no remodelamento cardíaco. Esse resultado foi acompanhado pelo aumento da deposição de colágeno e hipertrofia cardíaca, o que pode ser explicado, pelo menos em parte, pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e concomitante redução da atividade das enzimas antioxidantes, causando aumento do estresse oxidativo no coração (DE ALMEIDA et al, 2018). A ativação das calpaínas, principalmente a isoforma tipo-1, pode ser afetada por espécies reativas do oxigênio, sugerindo que a calpaína-1 atua como um elo molecular entre o estresse oxidativo e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. De fato, espécies reativas do oxigênio podem iniciar a ativação da calpaína-1 indiretamente pelo aumento do cálcio intracelular ou diretamente pela indução da modificação oxidativa das próprias proteases (RANDRIAMBOAVONJY et al, 2019).

No entanto, outros mecanismos também podem estar envolvidos nesse processo. Um estudo recente apontou que o exercício físico parece inibir os fatores TGF- β 1 (fator transformador de crescimento beta) e TIMP-1 (inibidor tecidual de metaloproteinases), que são elementos envolvidos diretamente na síntese e acúmulo de colágeno (KWAK et al, 2011). Nesse caso, nossos resultados sugerem uma menor ação do exercício físico nesse processo perante a inibição da ECA. Esse achado é intrigante, e sugere uma importante interação entre a privação dos hormônios ovarianos, o aumento da produção de Ang-II por vias alternativas e os mecanismos indutores de fibrose cardíaca nessa condição. Apesar de o treinamento físico ter sido pouco efetivo no presente estudo sobre a fibrose cardíaca em ratas ovariectomizadas e tratadas com maleato de enalapril, mas efetivo sobre a modulação da calpaína-1 e MMP-2, a literatura aponta fortemente seus efeitos sobre o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas do SRA e sua relação com as respostas hemodinâmicas e cardiovasculares, como a vasodilatação, ação antifibrótica e antihipertrófica, antiarrítmica e como inibidor do crescimento dos

cardiomiócitos, atuando como contrarregulador das ações da Ang-II (BERTAGNOLLI et al, 2014; PETRIZ et al, 2013; SILVA et al, 2011; FERNADES et al, 2011).

No entanto, embora o treinamento físico tenha promovido pouco efeito sobre a fibrose cardíaca nos animais ovariectomizados tratados com maleato de enalapril, promoveu alterações morfológicas e funcionais, como o aumento no peso cardíaco, peso cardíaco relativo e volume sistólico final do ventrículo esquerdo (VSFVE). O aumento do peso cardíaco absoluto e relativo pode ser decorrente da sobrecarga de volume imposta pelo treinamento físico aeróbio (LAZAR et al, 2013; BERNARDO et al, 2010) enquanto o aumento da VSFVE não interferiu no débito cardíaco e índice cardíaco, como observado no grupo OVX. Adicionalmente, o grupo OVX-EM também apresentou aumento do débito sistólico final do ventrículo esquerdo (DSFVE) e redução na fração de ejeção, fração de encurtamento e FC. Embora tenha ocorrido um aumento do VSFVE e tendência ao aumento do VDFVE, o volume de ejeção permaneceu constante. Desta forma, observase uma redução da fração de ejeção, entretanto sem afetar o débito cardíaco e o índice cardíaco. Contudo, não podemos afirmar que essas alterações são benéficas ou deletérias, uma vez que são necessários mais estudos para justificar a causa desses efeitos.

Por sua vez, os possíveis efeitos benéficos induzidos pelo treinamento físico sobre a morfologia e funcionalidade cardiovascular já foram descritos na literatura, entretanto, os estudos são mais frequentemente reportados a atletas ou em estudos clínicos. Em modelos experimentais, os poucos encontrados foram realizados em diferentes modelos de doenças, modalidade de exercício, intensidade e frequência de treinamento físico empregado, o que dificulta a comparação dos nossos resultados (MAHDIABADI et al, 2013; NUNES et al, 2013; LAZAR et al, 2013; KRALJEVIC et al, 2013; XU et al, 2008; DUMANOIR et al, 2007; GOODMAN et al, 2005; PLUIM et al, 2000; PELLICIA & MARON, 1997).

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Os resultados da presente investigação indicam que o tratamento crônico com maleato de enalapril em ratas submetidas à falência ovariana potencializa o aumento de fibrose cardíaca, sem interferir nos níveis já aumentados da calpaína-1 e MMP-2. Apesar desses achados, não houve repercussões significativas na função cardíaca. O treinamento físico aeróbio não impediu o aumento da fibrose cardíaca quando os animais eram tratados com maleato de enalapril, mas a atenuou. O treinamento físico também reduziu a calpaína-1 e MMP-2, mas pouco interferiu na função cardíaca. Por fim, os resultados sugerem que o maleato de enalapril não impede a formação de fibrose cardíaca induzida pela privação dos hormônios ovarianos. Esses achados apontam para a necessidade de novos estudos para a identificação da participação das vias de sinalização fisiológica envolvidas nessa resposta.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABDALLA GK, SILVEIRA MR, LAZO JE. Guia rápido de utilização do software de morfometria Image J. [acessado em Nov/2018]. Disponível em: <<http://www.fmtm.br/instpub/fmtm/discbiologiacelular/guiarapidodeutilizacaodoimagej.pdf>>.
- AKERS, W. S. et al. Renin-angiotensin system and sympathetic nervous system in cardiac pressure-overload hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000; 279(6): H2797-806.
- ALVES FH, CRESTANI CC, RESSEL LB, CORREA FM. Cardiovascular effects of noradrenaline microinjected into the insular cortex of unanesthetized rats. *Auton Neurosci*. 2011; 24, 160 (1-2):90-8, 2011.
- 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.
- 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*. 86(7):912-23.
- AT SMA 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.
- BARBAGALLO CM, AVERNA MR, FRADA G. et al. Plasma lipid, apolipoprotein and Ip(a) levels in elderly normolipidemic women: relationships with coronary heart disease and longevity. *Gerontology*. 1995; 41(5): 260.

BARKI-HARRINGTON, LIZA; PERRINO, CINZIA; ROCKMAN, HOWARD A. Network integration of the adrenergic system in cardiac hypertrophy. *Cardiovascular Research*. 2004 15;63(3):391-402.

BARTON, M; MEYER, MR. Postmenopausal hypertension: mechanisms an therapy. *Hypertension*. 2009; 54(1): 11-8.

BAUM J, DUFFY HS. Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about? *J Cardiovasc Pharmacol*. 2912; v. 57, n. 4, p. 376-9.

BECARI C, OLIVEIRA EB, SALGADO MC. Alternative pathways for angiotensin II generation in the cardiovascular system. **Braz J Med Biol Res** 44(9):914-9, 2011a.

BECARI C, TEIXEIRA FR, OLIVEIRA EB, SALGADO MC. Angiotensin-converting enzyme inhibition augments the expression of rat elastase-2, an angiotensin II-forming enzyme. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 301(2):H565-70, 2011b.

BELL, J.R.; BERNASOCHI, G.B.; VARMA, U.; RAAIJMAKERS, A.J.; DELBRIDGE, L.M. Sex and sex hormones in cardiac stress--mechanistic insights. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2013; 137:124-35.

BELO, V. A.; GUIMARÃES, DANIELLE A.; CASTRO, MICHELE MAZZARON. Matrix Metalloproteinase 2 as a Potential Mediator of Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Chronic Vascular Remodeling in Hypertension. *Journal of vascular research*. 2015; 52 (4), 221–31.

BELO, VANESSA DE ALMEIDA et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 decreases calponin-1 levels and contributes to arterial remodeling in early hypertension. *Biochemical Pharmacology*. 2016 15;118:50-58.

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.

BERRIDGE, MICHAEL J.; BOOTMAN, MARTIN D.; RODERICK, H. LLEWELYN. Calcium signaling: dynamics, homeostasis and remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Jul;4(7):517-29.

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.

BRADFORD, MARION M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.

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 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.

BALCELLS E, MENG QC, JOHNSON WH JR, OPARIL S & DELL'ITALIA LJ. Angiotensin II formation from ACE and chymase in human and animal hearts: methods and species considerations. *Am J Physiol* 273: H1769-H1774, 1997.

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.

BELCASTRO AN. Skeletal muscle calcium-activated neutral protease (calpain) with exercise. *J Appl Physiol* (1985). 1993 Mar;74(3):1381-6.

BELCASTRO AN, ALBISSER TA, LITTLEJOHN B. Role of calcium-activated neutral protease (calpain) with diet and exercise. *Can J Appl Physiol*. 1996 Oct;21(5):328-46.

BERTAGNOLLI M, CASALI KR, DE SOUSA FB, RIGATTO K, BECKER L, SANTOS SH, DIAS LD, PINTO G, DARTORA DR, SCHAAAN BD, MILAN RD, IRIGOYEN MC & SANTOS RA (2014). An orally active angiotensin-(1-7) inclusion compound and exercise training produce similar cardiovascular effects in spontaneously hypertensive rats. *Peptides* **51**, 65-73.

BRILLA CG, RUPP H, FUNCK R, MAISCH B. The renin-angiotensin-aldosterone system and myocardial collagen matrix remodelling in congestive heart failure. *Eur Heart J* 16 Suppl O:107-9, 1995a.

BRILLA CG, MAISCH B, RUPP H, FUNCK R, ZHOU G & WEBER KT. Pharmacological modulation of cardiac fibroblast function. *Herz* 20: 127-134,1995b.

BRILLA CG, ZHOU G, RUPP H, MAISCH B & WEBER KT. Role of angiotensin II and prostaglandin E2 in regulating cardiac fibroblast collagen turnover. *Am J Cardiol* 76: 8D-13D, 1995c.

- 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.
- CARTER JB, BANISTER EW, BLABER AP. Effect of endurance exercise on autonomic control of heart rate. **Sports Med** 33:33-46, 2004.
- CHOU HC, WANG LF, LU KS & CHEN CM. Effects of maternal undernutrition on renal angiotensin II and chymase in hypertensive offspring. **Acta Histochem** 110: 497504, 2008.
- 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.
- 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.
- 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.
- CROALL, DOROTHY E.; MOFFETT, Katherin; HATCH, Harold. Casein zymography of calpains using a 4-(2- hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid-imidazole buffer. *Analytical Biochemistry.* 2002 304; 1: 129–132.
- CROWLEY, S.D.; et al. Distinct roles for the kidney and systemic tissues in blood pressure regulation by the renin-angiotensin system. *J Clin Invest.* v. 115, n. 4, p. 1092-9, 2005.
- 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.
- DE ALMEIDA SA, CLAUDIO ERG, MENGAL V, BRASIL GA, MERLO E, PODRATZ PL, GRACELI JB, GOUVEA SA, DE ABREU GR. Estrogen Therapy Worsens Cardiac Function and Remodeling and Reverses the Effects of Exercise Training After Myocardial Infarction in Ovariectomized Female Rats. *Front Physiol.* 2018 Sep 5;9:1242.
- DUCKLES SP, MILLER VM. Hormonal modulation of endothelial NO production. **Pflugers Arch.** 2010;459(6):841-51.
- DUMANOIR GR, HAYKOWSKY MJ, SYROTUIK DG, TAYLOR DA, BELL GJ. The effect of high-intensity rowing and combined strength and endurance training on left ventricular systolic function and morphology. **Int J Sports Med** 28(6):488-94, 2007.

DOST T, KAFKAS S, GOKALP F, KARUL A & BIRINCIOGLU M (2014). Effects of angiotensin converting enzyme inhibition on adiponectin levels and lipid profile in the ovariectomized-aged rats. *J Pharmacol Pharmacother* **5**, 21-26.

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.

DOSTAL, D. E.; BAKER, K. M. The cardiac renin-angiotensin system: Conceptual, or a regulator of cardiac function? *Circulation Research*, [s. l.], 1999.

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.

FABRIS, B.; CANDIDO, R.; BORTOLETTO, M.; TOFFOLI, B.; et al. Stimulation of cardiac apoptosis in ovariectomized hypertensive rats: potential role of the reninangiotensin system. *J Hypertens*. 2011; 29: 2, 273-81.

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.

FERNADES T, HASHIMOTO NY, MAGALHÃES FC, FERNANDES FB, CASARINI DE, CARMONA AK, KRIEGER JE, PHILLIPS MI & OLIVEIRA EM (2011). Aerobic exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves regulatory MicroRNAs, decreased angiotensin-converting enzyme-angiotensin II, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7). *Hypertension* **58**, 182-189.

FUNABIKI K, ONISHI K, DOHI K, KOJI T, IMANAKA-YOSHIDA K, ITO M, WADA H, ISAKA N, NOBORI T & NAKANO T. Combined angiotensin receptor blocker and ACE inhibitor on myocardial fibrosis and left ventricular stiffness in dogs with heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H2487-H2492, 2004.

FILHO AG, KINOTE A, PEREIRA DJ, RENNÓ A, DOS SANTOS RC, FERREIRA-MELO SE, VELLOSO LA, BORDIN S, ANHÊ GF, MORENO JUNIOR H. Infliximab prevents increased systolic blood pressure and upregulates the AKT/eNOS pathway in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*. 2013 Jan 30;700(1-3):201-9.

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, QUESADA T, HERNÁNDEZ I. Effect of estrogen and angiotensin-converting enzyme inhibitor on vascular remodeling in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. **Menopause** 13(3):397-403, 2006.

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

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.

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.

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*. 1998;279(5):R1599-605.

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.

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.

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*. 2007;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.

JIANG, LIQUN et al. Calpain-1 regulation of matrix metalloproteinase 2 activity in vascular smooth muscle cells facilitates age-associated aortic wall calcification and fibrosis. *Hypertension*. 2012 60(5):1192–1199.

JIANG, LIQUN et al. Increased aortic calpain-1 activity mediates age-associated angiotensin II signaling of vascular smooth muscle cells. *PLoS ONE*. 2008;3(5):e2231.

JUILLERAT L, NUSSBERGER J, MÉNARD J, MOOSER V, CHRISTEN Y, WAEBER B, GRAF P & BRUNNER HR (1990). Determinants of angiotensin II generation during converting enzyme inhibition. *Hypertension* **16**, 564-572.

KRALJEVIC J, MARINOVIC J, PRAVDIC D, ZUBIN P, DUJIC Z, WISLOFF U, LJUBKOVIC M. Aerobic interval training attenuates remodelling and mitochondrial dysfunction in the post-infarction failing rat heart. **Cardiovasc Res** 1;99(1):55-64, 2013.

KWAK HB, KIM JH, JOSHI K, YEH A, MARTINEZ DA, LAWLER JM. Exercise training reduces fibrosis and matrix metalloproteinase dysregulation in the aging rat heart. **FASEB J** 25(3):1106-17, 2011.

KWAK, HYEONG IL et al. Calpain-mediated vimentin cleavage occurs upstream of MT1- MMP membrane translocation to facilitate endothelial sprout initiation. *Angiogenesis*. 2012 Jun;15(2):287-303.

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.

KANDASAMY, ARULMOZHI D. et al. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: Beyond the matrix. *Cardiovascular Research*. 2010 Feb 1;85(3):413-23.

KANG, HOJIN et al. Fluid shear stress and sphingosine 1-phosphate activate calpain to promote Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP) membrane translocation and endothelial invasion into three-dimensional collagen matrices. *Journal of Biological Chemistry*. 2011 Dec 9;286(49):42017-26.

KEIDAR S, KAPLAN M, GAMLIEL-LAZAROVICH A. ACE 2 of the heart: From angiotensin I to angiotensin (1-7). *Cardiovasc Res*. 2007;73: 463-9.

KOMUKAI K, MOCHIZUKI S, YOSHIMURA M. Gender and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Fundam Clin Pharmacol*. 2010; 24(6):687-98.

KONG P, CHRISTIA P, FRANGOIANNIS NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(4):549-74.

KOREN MJ, DEVEREUX RB, CASALE PN, SAVAGE DD, LARAGH JH. Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension. *Ann Intern Med*. 1991; 114(5):345-52.

LAZAR JM, KHANNA N, CHESLER R & SALCICCIOLI L (2013). Swimming and the heart. *Int J Cardiol* **168**, 19-26.

LIN YY, HONG Y, ZHOU MC, HUANG HL, SHYU WC, CHEN JS, TING H, CHENG YJ, YANG AL, LEE SD. Exercise training attenuates cardiac inflammation and fibrosis in hypertensive ovariectomized rats. *J Appl Physiol* (1985). 2020 Apr 1;128(4):10331043.

LÓPEZ-SENDÓN J, SWEDBERG K, MCMURRAY J, TAMARGO J, MAGGIONI AP, DARGIE H, TENDERA M, WAAGSTEIN F, KJEKSHUS J, LECHAT P & TORP-PEDERSEN C. Task Force on ACE-inhibitors of the European Society of Cardiology. Expert consensus document on angiotensin converting enzyme inhibitors in cardiovascular disease. *Eur Heart J* 25: 1454-1470, 2004.

LEVY D, GARRISON RJ, SAVAGE DD, KANNEL WB, CASTELLI WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med*. 1990; 322(22):1561-6.

LI, YING et al. Targeted inhibition of calpain reduces myocardial hypertrophy and fibrosis in mouse models of type 1 diabetes. *Diabetes*. 2011 Nov;60(11):2985-94.

LOBO RA. Surgical menopause and cardiovascular risks. *Menopause*. 2007;14(3 Pt 2):562-6.

MACFADYEN RJ, LEE AF, MORTON JJ, PRINGLE SD & STRUTHERS AD. How often are angiotensin II and aldosterone concentrations raised during chronic ACE inhibitor treatment in cardiac failure? *Heart* 82: 57-61, 1999.

MAHDIABADI J, GAEINI AA, KAZEMI T & MAHDIABADI MA (2013). The effect of aerobic continuous and interval training on left ventricular structure and function in male non-athletes. *Biol Sport* **30**, 207-211.

MARQUES CM, NASCIMENTO FA, MANDARIM-DE-LACERDA CA, AGUILA MB. Exercise training attenuates cardiovascular adverse remodeling in adult ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Menopause*. 2006;13(1):87-95.

MILAN A, CASERTA MA, AVENATTI E, ABRAM S & VEGLIO F (2010). Anti-hypertensive drugs and left ventricular hypertrophy: a clinical update. *Intern Emerg Med* **5**, 469-479.

MINISI AJ & THAMES MD (1993). Distribution of left ventricular sympathetic afferents demonstrated by reflex responses to transmural myocardial ischemia and to intracoronary and epicardial bradykinin. *Circulation* **87**, 240-246.

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*. 2003 Jun;35(6):901-18.

MICHELINI LC, STERN JE. Exercise-induced neuronal plasticity in central autonomic networks: role in cardiovascular control. *Exp Physiol*. 2009;94(9):947-60.

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.

NUNES RB, ALVES JP, KESSLER LP, DAL LAGO P. Aerobic exercise improves the inflammatory profile correlated with cardiac remodeling and function in chronic heart failure rats. *Clinics* 68(6):876-82, 2013.

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.

OLKOWICZ M, CHLOPICKI S, SMOLENSKI RT. Perspectives for angiotensin profiling with liquid chromatography/mass spectrometry to evaluate ACE/ACE2 balance in endothelial dysfunction and vascular pathologies. *Pharmacol Rep.* 2015;67(4):778-85.

OZDEMIR K, CELIK C, ALTUNKESER BB, IÇLI A, ALBENI H, DÜZENLİ A, et al. Effect of postmenopausal hormone replacement therapy on cardiovascular performance. *Maturitas.* 2004;47(2):107-13.

PEREIRA MG, FERREIRA JC, BUENO CR, MATTOS KC, ROSA KT, IRIGOYEN MC, OLIVEIRA EM, KRIEGER JE & BRUM PC (2009). 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**, 843850.

PEDRAM A, RAZANDI M, O'MAHONY F, LUBAHN D, LEVIN ER. Estrogen receptor-beta prevents cardiac fibrosis. *Mol Endocrinol.* 2010;24(11):2152-65.

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.

PELLICIA A & MARON BJ (1997). Outer limits of the athlete's heart: the effect of gender and relevance to the differential diagnosis with primary cardiac diseases. *Cardiol Clin* **15**, 381-396.

PETRIZ BA, E ALMEIDA JA, MIGLIOLO L & FRANCO OL (2013). Pharmacological potential of exercise and RAS vasoactive peptides for prevention of diseases. *Curr Protein Pept Sci* **14**, 459-471.

PIOTRKOWSKI B, KOCH OR, DE CAVANAGH EM & FRAGA CG. Cardiac mitochondrial function and tissue remodelling are improved by a non-antihypertensive dose of enalapril in spontaneously hypertensive rats. *Free Radic Res* 43: 390-399, 2009.

PLUIM BM, ZWINDERMAN AH, VAN DER LAARSE A, VAN DER WALL EE. The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation* 25;101(3):336-44, 2000.

PARDINI D. [Hormone replacement therapy in menopause]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2014;58(2):172-81.

PARENTE, JULIANA M. et al. Matrix Metalloproteinase-2 Activity is Associated with Divergent Regulation of Calponin-1 in Conductance and Resistance Arteries in Hypertension-induced Early Vascular Dysfunction and Remodelling. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology.* 2017;121(4):246-256.

PARKER WH, JACOBY V, SHOUPÉ D, ROCCA W. Effect of bilateral oophorectomy on women's long-term health. *Womens Health (Lond)*. 2009;5(5):565-76.

PATTEN RD, KARAS RH. Estrogen Replacement and Cardiomyocyte Protection. *Trends Cardiovas Med*. 2006;16: 69-75.

PATTERSON, CAM et al. Tear me down: Role of calpain in the development of cardiac ventricular hypertrophy. *Circulation Research*. 2011; 5, 109(4):453-62.

PERRIN, C.; VERGELY, C.; ROCHETTE, L. Les calpaïnes : Implication en pathologie cardiaque. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*. 2004;53(5):259-266.

POSTOVIT, LYNNE MARIE et al. Calpain is required for MMP-2 and u-PA expression in SV40 large T-antigen-immortalized cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002, 20;297(2):294-301.

PRIME DD, BROSNIHAN KB, HERRINGTON DM. Effects of hormone replacement therapy on blood pressure and the renin - angiotensin system in postmenopausal women. *Minerva Cardioangiol*. 2007; 55(4): 447-485.

RODRIGUEZ M, SHOUPÉ 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.

ROBLES NR, CEREZO I, HERNANDEZ-GALLEGO R. Renin-angiotensin system blocking drugs. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 19(1):14-33, 2012.

RANDRIAMBOAVONJY V, KYSELOVA A, FLEMING I. Redox Regulation of Calpains: Consequences on Vascular Function. *Antioxid Redox Signal*. 2019 Mar 1;30(7):1011-1026.

RIBEIRO JM & FLORÊNCIO LP. Bloqueio farmacológico do sistema reninaangiotensina-aldosterona: inibição da enzima de conversão e antagonismo do receptor AT1. **Rev Bras Hipertens** 3: 293-302, 2000.

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.

SADOSHIMA J & IZUMO S. Molecular characterization of angiotensin II induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts: Critical role of the AT1 receptor subtype. **Circ Res** 73: 413-423, 1993a.

SADOSHIMA J, XU Y, SLAYTER HS & IZUMO S. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vivo. **Cell** 75: 977-984, 1993b.

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.

SILVA DM, GOMES-FILHO A, OLIVON VC, SANTOS TM, BECKER LK, SANTOS RA & LEMOS VS (2011). Swimming training improves the vasodilator effect of angiotensin-(1-7) in the aorta of spontaneously hypertensive rat. **J Appl Physiol** **111**, 1272-1277.

SOUZA HC & TEZINI GC (2013). Autonomic Cardiovascular Damage during Postmenopause: the Role of Physical Training. **Aging Dis** **4**, 320-328.

SZABÓ R, KARÁCSONYI Z, BÖRZSEI D, JUHÁSZ B, AL-AWAR A, TÖRÖK S, BERKÓ AM, TAKÁCS I, KUPAI K, VARGA C, PÓSA A. Role of Exercise-Induced Cardiac Remodeling in Ovariectomized Female Rats. **Oxid Med Cell Longev**. 2018 Feb 13;2018:6709742.

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.

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.

SCHULZ, RICHARD. Intracellular Targets of Matrix Metalloproteinase-2 in Cardiac Disease: Rationale and Therapeutic Approaches. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. 2007;47:211-42.

SINGH, RAJA B. et al. Activation of proteolytic enzymes and depression of the sarcolemmal Na⁺/K⁺-ATPase in ischemia-reperfused heart may be mediated through oxidative stress. **Can J Physiol Pharmacol**. 2012 Feb;90(2):249-60.

SKRZYPIEC-SPRING M, GROTHUS 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.

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.

STORR, SARAH J. et al. The calpain system and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011 May;11(5):364-74.

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.

TAKAHASHI TA, JOHNSON KM. Menopause. *Med Clin North Am*. 2015;99(3):521-34.

TE RIET, LUUK et al. Hypertension: Renin-Angiotensin-Aldosterone System Alterations. *Circ Res*. 2015 Mar 13;116(6):960-75.

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.

THAM YK, BERNARDO BC, OOI JY, WEEKS KL, MCMULLEN JR. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Arch Toxicol*. 2015;89(9):1401-38.

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.

TOMANEK RJ, ZIMMERMAN MB, SUVARNA PR, et al. A thyroid hormone analog stimulates angiogenesis in the post-infarcted rat heart. *J Mol Cell Cardiol*. 30(5): 923-32, 1998.

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.

UEHARA Y, MIURA S, YAHIRO E, SAKU K. Non-ACE pathway-induced angiotensin II production. **Curr Pharm Des** 19(17):3054-9, 2013.

UNGER T. Blood pressure lowering and renin-angiotensin system blockade. *J Hypertens Suppl*. v. 21, n. 6, p. S3-7, 2003.

VAN EICKELS M, SCHRECKENBERG R, DOEVENDANS PA, MEYER R, GROHÉ C, SCHLÜTER KD. The influence of oestrogen-deficiency and ACE inhibition on the progression of myocardial hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. **Eur J Heart Fail** 7(7):1079-84, 2005.

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.

WEISINGER RS, STANLEY TK, BEGG DP, WEISINGER HS, SPARK KJ & JOIS M (2009). Angiotensin converting enzyme inhibition lowers body weight and improves glucose tolerance in C57BL/6J mice maintained on a high fat diet. *Physiol Behav* **98**, 192197.

WERLE EO, STROBEL G, WEICKER H. Decrease in rat cardiac beta 1- and beta 2adrenoceptors by training and endurance exercise. *Life Sci*. 1990;46(1):9-17.

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.

WEBER KT, BRILLA CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*. 1991; 83(6):1849-65.

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.

WHO. Research on the menopause in the 1990s. Report of a WHO Scientific Group World Health Organ Tech Rep Ser. 1996;866:1-107.

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.

WILLIAMS WH. Management of congenital ventricular septal defect. *J Med Assoc Ga*. 1977;66(3):167-70.

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.

XU X, WAN W, JI L, LAO S, POWERS AS, ZHAO W, ERIKSON JM & ZHANG JQ (2008). Exercise training combined with angiotensin II receptor blockade limits postinfarct ventricular remodelling in rats. *Cardiovasc Res* **78**, 523-532.

YUNG LM, WONG WT, TIAN XY, et al. Inhibition of renin-angiotensin system reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in estrogen deficient rats. **PLoS One**. 2011;6(3):e17437.

YAMADA K, ISOBE S, HIRAI M, et al. Changes with age in left ventricular function and volumes at rest and postexercise in postmenopausal women. *Ann Nucl Med*. 2006;20(10):677-81.

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.

ZILE, MICHAEL R. et al. Mechanistic relationship between membrane type-1 matrix metalloproteinase and the myocardial response to pressure overload. **Circulation: Heart Failure**, 2014;7(2):340–350.

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.