KARINA SANTOS TEIXEIRA

**EFEITOS DA OOFORECTOMIA E DO DESIDROEPIANDROSTERONA
(DHEA) SOBRE A MASSA CARDÍACA DE RATAS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2011

KARINA SANTOS TEIXEIRA

**EFEITOS DA OOFORECTOMIA E DO DESIDROEPIANDROSTERONA
(DHEA) SOBRE A MASSA CARDÍACA DE RATAS.**

Dissertação apresentada ao
Departamento de Fisiologia e Biofísica
do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia
Humana

Orientadora: Dra. Carla Roberta de
Oliveira Carvalho
Versão original

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Teixeira, Karina Santos.

Efeitos da ooforectomia e do desidroepiandrosterona (DHEA) sobre a massa cardíaca de ratas / Karina Santos Teixeira. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Carla Roberta de Oliveira Carvalho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Investigação da regulação da transmissão do sinal da insulina em tecidos alvo.

Versão do título para o inglês: Effects of oophorectomy and dehydroepiandrosterone (DHEA) on cardiac mass in rats

Descritores: 1. Menopausa 2. Desidroepiandrosterona 3. Coração
4. Receptor de insulina I. Carvalho, Carla Roberta de Oliveira
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0213/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Karina Santos Teixeira.

Título da Dissertação: Efeitos da ooforectomia e do desidroepiandrosterona (DHEA) sobre a massa cardíaca de ratas.

Orientador(a): Carla Roberta de Oliveira Carvalho.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091-7438 e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL</p>
---	--

Decl. CEEA.047.09

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 27/08/CEEA datado de 24.03.08, por solicitação da Profa. Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna Karina Santos Teixeira ao projeto de pesquisa "*Menopausa e deidroepiandrosterona (DHEA): Efeitos sobre a resistencia periférica à insulina e função vascular*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 14 de agosto de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador -CEEA- ICB/USP

EXPEDIÇÃO
DATA 20/08/09
REL. N.º 4006

A minha família pelo incentivo e apoio
constante.
Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre colocou no meu caminho as pessoas e as situações que eu precisava.

Aos animais que sem escolha contribuíram para realização deste trabalho.

Aos meus pais José Teixeira e Maria do Socorro que sempre me incentivaram e me apoiaram em todas as escolhas, me deram segurança e certeza de que não estou sozinha. Aos meus irmãos Alex e Katarine e sobrinhos Igor e Maria Laura pela compreensão na minha ausência, carinho e alegria nos momentos em que estamos juntos.

Ao Celso, pessoa com quem divido todas as minhas “agonias” e que multiplica todas as minhas alegrias, pela parceria, paciência, cuidado e incentivo que deixam minha vida muito mais leve e feliz.

A minha orientadora Prof. Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho que abriu as portas do Laboratório de Sinalização Intracelular e permitiu meu aprendizado e agradável convivência com as pessoas que intensamente fizeram parte da minha vida nos 2 últimos anos. A Teca, pelo ensinamento técnico e amizade. Ao João Paulo que me direcionou para o modelo estudado, como disse Platão “O começo é a parte mais importante do trabalho”. A Gabriela, Cristiane, Mário e Felipe pelo conhecimento volátil, disposição e alegria e a todos que fazem parte desta equipe.

A Prof. Dra. Luciana Venturine Rossoni do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular pela dedicação, benevolência e competência. A todas as suas alunas, Gisele muito obrigada!

Ao laboratório e ao Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti pelo inestimável auxílio. A Martinha e Soninha pelo conhecimento técnico.

A Prof. Dra. Maria Tereza Nunes pelo conhecimento dividido e amizade. Ao Prof. Dr. Fernando Rodrigues de Moraes Abdulkader pelas dúvidas que prontamente são discutidas e solucionadas.

A Thaís e ao Daniel por serem meus irmãos escolhidos. A Ana Carla, Clara, Devaneide e Stela pelo convívio, muitas vezes com muita emoção, compreensão e incentivo à minha escolha. A Fernanda Jatte pelos ombros e ouvidos emprestados quando eu estava cansada.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.
Obrigada por tudo!

“O tempo corre veloz e a vida
escapa das nossas mãos. Mas pode
escapar como areia ou como
semente.”

Thomas Merton

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Introdução e revisão de literatura	12
1.2 Justificativa e objetivos	17
2 MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1 Animais	19
2.2 Modelo experimental	19
2.3 Caracterização dos animais	20
2.4 Constante de decaimento da glicose (K_{ITT}) e teste de tolerância a glicose (GTT)	22
2.5 Dosagem hormonal	22
2.6 Medidas hemodinâmicas	22
2.7 Histologia	23
2.8 Extração de proteínas totais do músculo cardíaco e <i>immunoblotting</i>	24
2.9 Análise estatística	25
3 RESULTADOS	27
3.1 Evolução ponderal	27
3.2 Teste de tolerância a glicose (GTT) e teste de tolerância à insulina (ITT)	28
3.3 Dosagem hormonal	29
3.4 Massa dos órgãos e tecidos	30
3.5 Medidas hemodinâmicas	31
3.6 Morfologia dos cardiomiócitos	32
3.7 <i>Immunoblotting</i>	34
4 DISCUSSÃO	37
5 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43

RESUMO

Teixeira KS. Efeitos da ooforectomia e do desidroepiandrosterona (DHEA) sobre a massa cardíaca de ratas. [dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A redução dos hormônios gonadais seja pelo processo natural de falência folicular denominado nas humanas de menopausa, seja pela ooforectomia, está associado com aumento da incidência de doença cardiovascular em mulheres no período pós menopausa. O objetivo desse estudo é avaliar o efeito da ooforectomia e a suplementação com DHEA sobre a morfologia dos cardiomiócitos, a expressão de proteínas celulares envolvidas com crescimento e apoptose celular e a função cardíaca. A ooforectomia induz maior ganho de massa corporal e do coração, no entanto, a avaliação morfológica do VE mostrou que há uma redução da espessura dos cardiomiócitos e do número de núcleos. Ademais, o *immunoblotting* demonstrou uma diminuição na expressão das proteínas IR, IRS1 e AKT nos corações das ratas ooforectomizadas e os parâmetros hemodinâmicos foram semelhantes entre os grupos. O tratamento com DHEA impediu a redução do número de núcleos sem interferir nos demais parâmetros avaliados. Os dados obtidos nos permite concluir que a ausência dos esteroides gonadais por si só resulta em modificações morfológicas dos cardiomiócitos que podem estar relacionados ao processo de apoptose sem afetar a função de bomba do coração e o uso do DHEA é capaz de impedir a redução numérica dos núcleos.

Palavras-chave: Menopausa. Desidroepiandrosterona. Coração. Receptor de Insulina.

ABSTRACT

Teixeira KS. Effects of oophorectomy and dehydroepiandrosterone (DHEA) on the cardiac mass in rats. [Masters Thesis] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The reduction of gonadal hormones by menopause, the natural process of failure in the human follicle, or by surgical removal, is associated with increased incidence of cardiovascular disease in postmenopause women. The aim of this study is to evaluate the effect of oophorectomy and the DHEA supplementation on the morphology of cardiomyocytes, on the expression of proteins involved in cell growth, on apoptosis (IGF-1R, IR, IRS-1, PI3K, AKT, MAPKp42/44, JAK2) and on the cardiac function. Oophorectomy enhances both the body mass e heart weight, however the left ventricle showed a reduction in cardiomyocyte thickness by 15% and in the number of nuclei by 20%. Moreover the immunoblotting showed a decrease from 25 to 50% in the expression of IR, IRS-1 and AKT proteins in the hearts of oophorectomized rats. The hemodynamic parameters were similar between groups. Treatment with DHEA reversed the reduction in the number of nuclei with no change in the other parameters evaluated. Our data allow us to conclude that the absence of gonadal steroids per se induces morphological changes in the cardiomyocytes that may be related to apoptosis with no change on the heart pump function. The DHEA supplementation is able to reverse the reduced number of nuclei.

Key words: Menopause. Dehydroepiandrosterone. Heart. Insulin Receptor.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Introdução e revisão de literatura

O processo de senescência do sistema reprodutor da mulher envolve o SNC, hipotálamo, hipófise e ovários e é caracterizado clinicamente e bioquimicamente por alterações na ciclicidade ovulatória, modificações no intervalo do ciclo menstrual, diminuição na sensibilidade dos folículos ovarianos ao FSH, diminuição e perda da capacidade reprodutora (Medeiros e Medeiros, 2007). No Brasil as mulheres entram na menopausa aproximadamente aos 51 anos (Otero et al., 2010; Pedro et al., 2003).

Com a baixa atividade folicular dos ovários na menopausa, o DHEA adrenal, DHEAS e androstenediona tornam-se os maiores precursores extragonadais para produção de estrógenos e andrógenos na mulher (Simpson e Davis, 2001).

O DHEA foi descrito pela primeira vez em 1934 por Butenandt e Dannenbaum que o identificaram na urina, já em 1954 Migeon e Plager o isolaram pela primeira vez no plasma humano e dois anos depois Symington et al. descobriram a produção do DHEA pelo córtex adrenal, que já foi identificado nos testículos, ovários e no cérebro (Aakvaag et al., 1964; Baulieu 1998; Hall et al., 1964; Labrie et al., 2011).

Tem sido proposto que o DHEA é um importante precursor para produção dos estrógenos e andrógenos e que o tratamento de reposição com DHEA é uma estratégia fisiológica para o alívio dos sintomas da mulher no período pós-menopausa, principalmente porque no seu declínio não ocorre o mecanismo de feedback negativo para aumentar sua secreção (Labrie et al., 2011). Sua utilização na pós-menopausa está associada principalmente com a melhora cognitiva, bem-estar e prevenção de doenças cardiovasculares (Raven e Hinson, 2007).

Desde que os níveis plasmáticos de DHEA e DHEAS foram mensurados e encontrados em baixa concentração por mulheres jovens e pós-menopausadas a partir do uso de DHEA percutâneo, são fortes os indícios que o DHEA pode ser usado por longo tempo em mulheres sem causar efeitos prejudiciais na glândula mamária, além de servir como um protetor contra o câncer de mama (Labrie et al., 2003, 2007; López-Marure et al., 2011; Pelletier et al. 2008). Embora Cappola et al. (2006) em um estudo de coorte com 539 mulheres de 65-100 anos, tenham concluído que mulheres com níveis elevados de DHEAS apresentam alta

mortalidade por câncer, enquanto que mulheres com baixo nível de DHEAS apresentam maior incidência de mortalidade por DCV.

Doenças cardiovasculares (DCV) e Diabetes Mellitus (DM) têm fatores de risco comuns, tais como estilo de vida pouco saudável, incluindo sobrepeso e obesidade, ausência de atividade física moderada e dieta inadequada (World Health Organization (WHO), 2002).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado nove fatores de risco potencialmente modificáveis que estão diretamente relacionados com mais de 90% dos infartos agudos do miocárdio: tabagismo, dislipidemia, hipertensão arterial, Diabetes Mellitus, obesidade abdominal, estresse, falta de ingestão de frutas e vegetais diariamente e falta de atividade física regular. Destes fatores 4% a mais são atribuídos a mulheres em comparação aos homens, independente da idade e região do mundo (Yusuf et al., 2004).

Além disso, dados da Finlândia mostraram que o risco de DM tipo 2 foi equivalente a presença de sinais anteriores de doença coronariana e que mulheres estavam sob maior risco do que homens (Juutilainen et al., 2005). O abuso de álcool e a hipertensão arterial são dois outros fatores preditores independentes, enquanto que o hábito alimentar é considerado o determinante modificável maior de doenças crônicas, tendo um efeito prolongado na gênese das doenças cardiovasculares e DM com o envelhecimento (Moraes et al., 2003).

Em 2007 mais de 2.200 americanos morreram por dia por DCV, uma morte a cada 39 segundos, destes 33% morreram antes dos 75 anos, idade menor que a expectativa de vida de 77,9 anos (Roger et al., 2011). No Brasil as doenças do aparelho circulatório estão em primeiro lugar nas causas de morte. Enquanto que as doenças isquêmicas do coração ocupam o 2º lugar e em 2008 o Diabetes Mellitus passou do 4º para o 3º lugar (Ministério da Saúde, 2010).

Em mulheres, a privação dos hormônios sexuais na menopausa aumenta a incidência de hipertensão arterial. De fato, a partir dos 55 anos de idade os valores da pressão arterial sistólica e diastólica aumentam significativamente em mulheres comparando-as com homens (Posner et al., 1993; Staessen et al., 1989; Wenger, 1995). A hipertensão torna-se mais prevalente em mulheres a partir dos 60 anos de idade, e em conjunto com DM tipo 2, representa um dos maiores fatores de risco cardiovascular para mulheres na pós-menopausa (Mercuro et al., 1997; Staessen et al., 1989).

Em 2004 Mercurio et al., publicaram um artigo demonstrando que a perda do perfil estrogênico induzido pela ooforectomia bilateral em mulheres com idade entre 46 a 51 anos está associada ao aumento da pressão arterial sistólica e diastólica, comparando-as antes do procedimento cirúrgico. Ademais, detectaram que a reposição hormonal feita com estrógenos induziu o retorno aos níveis pressóricos detectados antes da cirurgia.

Estrógenos reduzem a pressão arterial através de efeitos diretos sobre os vasos sanguíneos (Mendelsohn e Karas, 1999) e sobre os centros nervosos moduladores da função autonômica cardiovascular (Huikuri et al., 1996; Pamidimukkala et al., 2003). Seu efeito antioxidante pode contribuir no sentido de tornar a disfunção endotelial menos evidente em fêmeas hipertensas ooforectomizadas, enquanto que a sua deficiência secundária a ooforectomia, aumenta os níveis de gonadotrofinas levando a ativação da via das prostaglandinas que impedem a vasodilatação, em artéria mesentérica (Dantas et al., 2002, 2004). Em ratas SHR a privação dos hormônios sexuais femininos devido à ooforectomia induz o aumento da pressão arterial e parece envolver, pelo menos em parte a ativação do sistema renina-angiotensina cerebral (Ito et al., 2006) e estresse oxidativo (Fortepiani et al., 2003; Recklhooff e Fortepiani, 2004). Além de o estradiol inibir o crescimento de fibroblastos no coração, através do receptor de estrógeno protegendo-o contra a remodelação associada a doença cardíaca (Dubey et al., 2002).

Além disso, o envelhecimento ou a menopausa induzida por ooforectomia aumenta o peso corporal em roedores (Chen e Heiman, 2001; Diemen et al., 2006; Kimura et al., 2002), e está associada a resistência à insulina (Lemieux et al., 2003), assim como leve aumento da pressão arterial em ratas Sprague Dawley (Liu et al., 2005). Outras evidências mostram que a resistência à insulina está associada com aumento no risco de doença cardiovascular mesmo sem hiperglicemia (Giles, 2003; Uwaifo e Ratner, 2003).

Um processo adaptativo do miocárdio frente às sobrecargas hemodinâmicas crônicas é a hipertrofia cardíaca. Decorrente do aumento das dimensões dos cardiomiócitos, que na impossibilidade de se dividir na fase adulta e frente a sobrecarga, constitui um fator de risco de morbi-mortalidade cardiovascular (Franchini, 2001).

Na matriz extracelular há fibras colágenas e elásticas. De modo geral, o colágeno é responsável pela tensão do tecido, enquanto que a elastina é responsável pela elasticidade (Montes, 1996). Há uma reciprocidade entre as mudanças na matriz extracelular e hipertrofia dos cardiomiócitos. Várias vias intracelulares tem sido caracterizadas como transdutores de respostas hipertróficas incluindo isoformas de proteínas G específicas, GTPases de baixo peso molecular – Ras, RhoA e Rac -, cascatas das MAPK, proteína kinase C, calcineurina, ativador de transcrição e transdução de sinais gp130 e a via do IGF-1 (Molkentin e Dorn, 2001). Além dessas, a via intracelular denominada PI3K/Akt tem um papel central na regulação do crescimento, sobrevivência, função e metabolismo dos cardiomiócitos (Shiojima et al., 2002). Alterações na atividade da PI3K foram identificadas em condições que variam desde hipertrofia até falência cardíaca (Naga Prasad et al., 2003).

A insulina é um hormônio central no controle do balanço metabólico do miocárdio e tem efeitos diretos sobre o transporte de glicose, glicólise e síntese de glicogênio. Efeitos esses que regulam a atividade dos transportadores de glicose, GLUT-1 e GLUT-4, mudam a atividade de enzimas cardíacas do metabolismo glicídico e suprimem a utilização de ácidos graxos livres pelo coração (Abel, 2004; Belke et al., 2002). Além disso, ações desse hormônio sobre a expressão gênica pode contribuir para o crescimento dos miócitos cardíacos tanto em corações normais quanto hipertróficos.

Os eventos celulares relacionados à ação da insulina no coração incluem a fosforilação em resíduos de tirosina do receptor de insulina (IR) e sua ativação, culminando na fosforilação dos substratos do IR, IRS-1 e IRS-2, e a consequente ativação da enzima PI3K e Akt (Taniguchi et al, 2006; Velloso et al., 1998).

Camundongos transgênicos com deleção específica do receptor de insulina em músculos estriados esquelético (MIRKO) e cardíaco (CIRKO) apresentam corações menores que seus controles sem deleção (Belke et al., 2002; Kim et al., 2000).

O receptor de insulina no coração parece ter um papel determinante no tamanho deste órgão ao atingir a fase adulta, na participação do desenvolvimento da expressão gênica da miosina e no uso preferencial de substratos energéticos, fazendo uma passagem entre utilização de glicose e ácidos graxos (Brüning et al., 1998).

A pouca alteração funcional cardíaca detectada em ambos os animais transgênicos, MIRKO e CIRKO, induziu duas possibilidades de interpretação. A primeira consideraria o receptor de insulina não crítico para o desenvolvimento e função cardíaca; e a segunda levanta a possibilidade de haver outros mecanismos de sinalização ativados compensando a falta do receptor de insulina. Então, Laustsen et al. (2007) demonstraram em outro camundongo transgênico, agora apresentando dupla deleção de IR e do receptor de IGF-1, pertencente à mesma família do receptor de insulina, em músculo estriado. Esses animais com dupla deleção apresentaram desenvolvimento precoce de cardiomiopatia dilatada e morte devido a insuficiência cardíaca no primeiro mês de vida, com homeostase glicídica normal. Os animais sem IR apresentam uma disfunção cardíaca aos 6 meses de vida, enquanto camundongos com deleção do IR e heterozigotos para IGF-1R apresentam discreto aumento da mortalidade. Desta maneira, ficou demonstrado que ambos os receptores, insulina e IGF-1 no tecido muscular estriado, não são essenciais para homeostase glicídica no primeiro mês de vida, no entanto, são importantes para o desenvolvimento normal do coração, principalmente o IR.

Liu et al. (2005) detectaram que em ratas ooforectomizadas o leve aumento da pressão arterial estava associado à redução na expressão do IRS-1 em tecido cardíaco, que foi recuperado após reposição com estradiol.

Assim, a reposição dos esteroides sexuais tem sido descrita como capaz de reduzir os valores da pressão arterial aos precedentes à menopausa induzida por ooforectomia em mulheres (Mercuro et al., 2004) e até como na redução de peso corporal (Gruppo di Studio Progetto Menopausa Italia, 2006) em mulheres e em modelos animais (Dean et al., 2005; Garcia et al., 2005; Giménez et al., 2006; Nuedling et al., 2003).

Em modelos animais, a administração de DHEA reduz o acúmulo de gordura visceral induzida por dieta hiperlipídica (Cleary e Zisk, 1986; Hansen et al., 1997; Mohan et al., 1990; Yen et al., 1977), aumenta a sensibilidade à insulina em animais envelhecidos (Han et al., 1998) e melhora a sinalização da insulina em tecido muscular e hepático (Campbell et al., 2004). Ainda em ratos envelhecidos, a administração de dose única de DHEA, aumenta a secreção de insulina estimulada por glicose em ilhotas pancreáticas isoladas (Medina et al., 2006). Além disso, a redução da resistência à ação da insulina acompanhada de redução da gordura subcutânea abdominal foram verificadas em mulheres que receberam creme

contendo DHEA por 12 meses (Diamond et al., 1996) e a administração diária de 50 mg de DHEA por 6 meses a homens com idade entre 65-78 anos reduziu a gordura subcutânea e visceral abdominal, além de aumentar a resposta de secreção de insulina frente a sobrecarga de glicose e melhora da sensibilidade à insulina (Villareal e Holloszy, 2004).

Sobre o sistema cardiovascular e o uso do DHEA também foram descritos resultados benéficos. Em modelos de ratos obesos e diabéticos, a administração de DHEA reduz o estresse oxidativo no coração, através da redução de NFkB, receptores de produtos finais de glicação e receptores de TNF- α (Aragno et al., 2006); melhora a função vascular e neural (Yorek et al., 2002); reduz a resposta inflamatória induzida por TNF- α em células endoteliais (Gutiérrez et al., 2007), o efeito apoptótico (Liu et al., 2007) e aumenta a produção de NO por essas células (Formoso et al., 2006) através da via PI3K/Akt.

Nosso laboratório tem estudado o efeito da administração de DHEA em ratos envelhecidos sobre a ação e secreção de insulina. Vimos que esse esteróide é capaz de melhorar a sensibilidade à insulina e sua secreção em ratos com 12 meses de idade (Campbel et al, 2004; Medina et al., 2006). Mais recentemente, detectamos que em ratas ooforectomizadas o DHEA é capaz de atenuar de modo significativo as repercussões sobre a resistência vascular em anéis de aorta, inclusive reduzindo a produção de superóxido nesses tecidos (Camporez et al., 2011).

1.2 Justificativa e objetivos

Segundo a Organização Mundial de Saúde 60% dos diabéticos morrem por DCV, o risco é 2 a 3 vezes maior em diabéticos do tipo 1 e 2 e desproporcionalmente maior em mulheres, contando ainda com pior prognóstico após um evento cardiovascular que os não diabéticos (WHO,2007). O Brasil hoje apresenta uma elevação no excedente feminino na população total, no ano 2000 eram 2,5 milhões de mulheres, podendo atingir 7 milhões em 2050, além do país estar em um acelerado processo de envelhecimento podendo chegar em 2040 com a população idosa 18% superior as crianças, exigindo dessa forma planejamento e reestruturação no sistema de saúde para que esta população envelheça com manutenção na qualidade das condições de saúde e vida, assim como no sistemas de previdência e de assistência social (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

(IBGE), 2008). Baseado em tais fatos, é de grande relevância investigar mais detalhadamente os mecanismos associados a menopausa e DCV, para no futuro poder contribuir com estratégias que possam minimizar, prevenir ou tratar aquelas transformações. Assim, o objetivo desse estudo é avaliar o efeito da administração do DHEA em ratas privadas dos hormônios sexuais gonadais, secundariamente a ooforectomia bilateral, sobre o músculo cardíaco. Mais especificamente foram avaliados a morfologia dos miócitos do VE e a expressão de proteínas celulares envolvidas com crescimento e apoptose celular (IGF-1R, IR, IRS-1, PI3K, Akt, MAPKp42/44, JAK2 e SERCA2) por “immunoblotting” típico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Neste estudo foram utilizadas ratas Wistar com 60 dias de vida. Os animais foram adquiridos do biotério de ratos do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP), e mantidos em gaiolas, sob condições de controle de temperatura e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso a água e alimentação no biotério de experimentação animal do Departamento de Fisiologia e Biofísica (ICB/USP).

O projeto foi autorizado para inclusão ao projeto de pesquisa “Menopausa e desidroepiandrosterona (DHEA): efeitos sobre a resistência periférica à insulina e função vascular.”, uma vez que se trata da utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao protocolo registrado sob o n.027 nas fls.55 do livro 02 aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEa) e de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

2.2 Modelo Experimental

Os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos experimentais:

- a) Cirurgia fictícia (sham, S);
- b) Sham + DHEA (SD);
- c) Ooforectomizada (ovx, O);
- d) Ooforectomizada + DHEA (OD).

As ratas com 60 dias foram pesadas e anestesiadas com uma injeção intraperitoneal contendo Acepromazina 2% 0,05mg/100g Acepran® (Univet S.A., São Paulo, SP, Brasil), Cloridrato de ketamina 1% 5mg/100g Dopalen® (Vetbrands Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil) e Cloridrato de xilaxina 2% 1mg/100g Xilazin® (Syntec Brasil LTDA, São Paulo, SP, Brasil). Uma vez constatada a anestesia por ausência de resposta a pressão da pata, foi realizada a tricotomia e assepsia do abdome e as ratas foram posicionadas em decúbito dorsal para permitir a incisão na linha alba. Após a localização dos ovários direito e esquerdo, estes foram clampeados e removidos. Houveram ratas submetidas aos mesmos procedimentos

operatórios, porém sem remoção dos ovários, denominadas sham (S). Ao final, a parede abdominal foi suturada em dois planos separados, muscular e pele, e os animais ficaram em recuperação e observação por 4 horas. Para analgesia pós-operatória foi oferecido na água de beber Carprofeno 25mg 25mg/1L Carproflan® (Agenes União, São Paulo, SP, Brasil) por 48h.

Após 60 dias da cirurgia, as ratas foram novamente anestesiadas com Acepran® Dopalen® e Xilazin® e através de uma pequena incisão subcutânea no dorso dos animais foi implantado um pellet (50mg/pellet) de liberação lenta de desidroepiandrosterona (DHEA) (Innovative Research of America, Flórida, USA) nos subgrupos controle com pellet (SD) e ooforectomizada com pellet (OD). Nos demais grupos as ratas foram submetidas ao mesmo procedimento, porém sem a implantação do pellet de DHEA subcutâneo, são os grupos denominados S e O.

Vinte e um dias após o segundo procedimento cirúrgico para colocação do pellet, as ratas foram utilizadas para os estudos funcionais e retirada dos órgãos e sangue sob anestesia profunda.

Figura 01 – Modelo Experimental

Fonte: Teixeira (2011). O início representa a data de nascimento até a idade de 60 dias quando há a cirurgia para remoção dos ovários. Após 60 dias os animais são novamente submetidos a procedimento sob anestesia para implantação subcutânea do pellet de DHEA. No 21º dia após o implante os animais foram submetidos aos testes funcionais e subsequente eutanásia.

2.3 Caracterização dos animais

Após uma semana do procedimento cirúrgico, as ratas foram acompanhadas quanto a evolução ponderal semanalmente. No dia da eutanásia foram coletados os dados para o cálculo do Índice de Lee (Bernardis, 1970), através do peso corporal (g) e comprimento naso-anal (cm):

$$\text{Índice de Lee} = \text{raiz cúbica (g)} * (\text{cm}^{-1})$$

Os pesos do coração, do útero, dos tecidos adiposos periuterino, perirenal, retroperitoneal e subcutâneo, foram mensurados e o comprimento da tíbia direita foi aferido através do uso de paquímetro.

O primeiro órgão ressecado e pesado foi o coração, que através de uma incisão abdominal para expor o apêndice xifóide foi exposto e seccionado totalmente. O tecido adiposo que o recobre foi retirado e o coração foi exsanguinado através da pressão com a pinça antes de ser pesado. Em alguns corações o peso seco também foi avaliado para o cálculo do percentual de H₂O, esses corações após aferido o peso úmido foram deixados em estufa à 50°C até que seus pesos não oscilassem mais (isto se deu no 14º dia). Para calcular o percentual de água, foi utilizada a razão:

$$\text{Percentual de água} = (\text{Peso úmido (PU)} - \text{Peso seco (PS)}) / \text{PU} \times 100$$

O ventrículo esquerdo foi isolado a partir da retirada dos átrios e do ventrículo direito em alguns animais.

Após incisão do abdome o útero foi isolado do ovário, naqueles animais pertencentes aos grupos controles não ooforectomizadas, logo o tecido adiposo periuterino foi retirado e reservado e o útero então retirado.

A retirada dos tecidos adiposos foi iniciada pelo tecido adiposo periuterino. Precedendo a exérese uterina, o ovário e o tecido adiposo que envolve a loja ovariana foi retirado nas ratas Sham, enquanto nas ratas ooforectomizadas, o tecido foi retirado a partir das extremidades finais uterinas, onde ficavam os ovários retirados pela castração cirúrgica. O tecido adiposo renal foi isolado a partir da identificação do hilo renal. O tecido adiposo retroperitoneal foi retirado após o afastamento de todas as estruturas próximas à parede retroperitoneal e corresponde a todo coxim adiposo localizado nessa região. Por fim, o tecido adiposo subcutâneo foi visualizado a partir de uma pequena incisão na região da sínfise púbica e ampliada por mais uma incisão até o arco costal, expondo toda região anterior. Esse coxim adiposo constituiu-se de todo coxim adiposo presente desde a sínfise púbica, coxas, arco costal até a linha alba. Para mensuração e análise dos distintos coxins adiposos foi utilizada a razão do peso de cada tecido pelo peso corporal das ratas.

2.4 Constante de decaimento da glicose (K_{ITT}) e teste de tolerância à glicose (GTT)

Os animais foram submetidos a jejum de 12 horas e separados individualmente em gaiolas onde receberam uma injeção intraperitoneal de uma das duas soluções: (1) solução de insulina diluída em salina (0,10U/mL por Kg de peso de animal), para a realização da teste de tolerância à insulina curto e subsequente cálculo da constante de decaimento da glicose; e (2) solução contendo glicose (1mg/kg peso corporal), para a realização do teste de tolerância à glicose.

Nos animais acordados, amostras de sangue da cauda foram coletadas em tempos definidos para cada solução utilizada e usados para determinação da glicose sangüínea total através de tiras reativas e aparato de leitura Accu-chek Active® (Roche, Mannheim, Alemanha). Para a K_{itt} foram coletadas alíquotas nos tempos 0 (basal), 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após a injeção do hormônio e para a tolerância à glicose foram coletadas alíquotas nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após a infusão da glicose. A constante de decaimento da glicose (K_{itt}) foi calculada pela fórmula $0,693/t^{1/2}$, onde $t^{1/2}$ é o tempo de meia vida da glicose plasmática calculada pela inclinação da curva obtida durante a fase linear de decaimento da glicose plasmática detectada nos tempos 5 a 30 minutos após infusão de insulina (Bonora et al., 2000). Quanto mais rápida e intensa for a queda da glicose, maior a sensibilidade à insulina (Geloneze e Tambascia, 2006).

2.5 Dosagem hormonal

A dosagem dos hormônios folículo estimulante (FSH), luteinizante (LH), progesterona e estradiol foram realizados a partir do soro do sangue dos animais de grupos distintos e realizada por radioimunoensaio com kit comercial no laboratório coordenado pelo Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci, no Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, SP, Brasil.

2.6 Medidas hemodinâmicas

Os animais foram anestesiados com uretana 40%, 1,6 mg/Kg, via intraperitoneal. Depois de confirmada a sedação através de pressão realizada pela

pinça no rabo do animal, foi realizada a tricotomia da região cervical seguida de cervicotomia medial direita e dissecação dos planos anatômicos, até visualização do feixe carotídeo vâsculo-nervoso. A artéria carótida foi individualizada e o fluxo sanguíneo isolado, sendo realizada secção parcial do vaso. Introduziu-se o cateter (PE-50, 8 cm) no lúmen arterial e fixação do mesmo, por onde foi administrado solução salina heparinizada a temperatura ambiente contendo 100U/mL. Em seguida, o cateter foi conectado a um transdutor de pressão TRA 021 (PanLab, Barcelona, Espanha), ligado, por sua vez, a um amplificador ML224 Quad Bridge Amp (ADInstruments, New South Wales, Austrália), acoplado ao sistema de aquisição de dados digital PowerLab® (ADInstruments, New South Wales, Austrália) para os registros hemodinâmicos. A frequência de amostragem utilizada para aquisição dos registros foi de 1K/s.

A frequência cardíaca foi calculada a partir do registro da pressão arterial pulsátil. Os valores de pressão sistólica e diastólica final do ventrículo esquerdo e a razão entre a variação pressórica durante o tempo de observação dP/dt positiva, que reflete o índice de contratilidade cardíaca, e a dP/dt negativa, que corresponde ao índice de relaxamento cardíaco, foram coletados após a estabilização do cateter no interior do ventrículo esquerdo. A análise foi realizada através do programa de análise para medidas hemodinâmicas Blood Pressure Module, Chart 5 for Windows® (ADInstruments, New South Wales, Austrália).

2.7 Histologia

Os animais foram submetidos a narcose por CO_2 e decapitados. A remoção do coração foi realizada conforme a descrição no item 2.3. Após exérese rápida do coração, este foi imediatamente mergulhado em solução de cádmio a 100 uM para assegurar a parada cardíaca em diástole. Os ventrículos foram seccionados transversalmente, na altura da linha média entre o ápice e a base dos ventrículos, resultando em partes aproximadamente iguais.

Em seguida foram fixados em solução de Bouin por 24 horas, lavados em água corrente por 18 horas e transferidos para o álcool 50% por 30 minutos. Os fragmentos foram submetidos a processamento histológico habitual, passando por uma sucessão de desidratação com álcool em concentrações crescentes (70%; 95% duas vezes; 100% três vezes) por 30 minutos em cada álcool e posterior

diafanização através de uma série de xilóis por trinta minutos os dois primeiros e o ultimo por duas horas. Logo, o tecido passou por uma série de parafinas e foi incluído em blocos de parafina para obtenção das lâminas histológicas. Do coração de cada animal de todos os grupos, foram feitos cortes histológicos semi-seriados de 4 µm de espessura em micrótomo de parafina para todas as colorações do mesmo coração. As laminas contendo os cortes histológicos permaneceram em estufa por 24 horas precedendo o processo de desparafinização, que envolveu incubações por 30 minutos em uma série de xilóis e de 3 minutos por uma sucessão de álcool com concentrações decrescente (100% duas vezes, 95% duas vezes, 85% e 70%). Para coloração foram utilizados os métodos de Hematoxilina-Eosina (HE). Após incubação com o corante as lâminas foram novamente submetidas a uma seqüência de incubações por 2 minutos em concentrações crescentes do álcool (70%, 80%, 90% e 100%) antes da montagem final.

As imagens coradas com HE foram analisadas através do programa AxioVision® (Carl Zeiss, Munique, Alemanha). Os campos captados foram discriminados por cada parede do ventrículo esquerdo como representados na Figura 02.

Figura 02 – Representação das paredes do ventrículo esquerdo

Fonte: Teixeira (2011). Em cada parede foram escolhidas 5 áreas distintas totalizando 20 campos por coração. Em cada campo foram medidos 5 cardiomiócitos, totalizando 100 por coração. Para contagem de núcleo, foram contabilizados todos os núcleos presentes no campo.

2.8 Extração de proteínas totais do músculo cardíaco e *immunoblotting*

Para análises da expressão tecidual o músculo cardíaco foi homogeneizado com Polytron® (Kinematica Inc., Lucerne, Suíça) em 1,5 mL de tampão de extração

constituído de Triton-X 100 1%, Tris (pH 7,4) 100 mM, pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10mM, PMSF 2 mM e aprotinina 0,01 mg/mL. Os extratos foram centrifugados a 12.000 rpm a 4 °C por 40 minutos para a remoção do material insolúvel. Após centrifugação, os sobrenadantes das amostras tiveram seu conteúdo protéico quantificado utilizando o reagente de Bradford® (BioRad, Berkeley, California, USA) e tratados com tampão de Laemmli (Laemmli, 1970), acrescido de DTT 200 mM, na proporção de 4:1 (V:V). Noventa miligramas de proteínas totais que foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE 8 e 12%). Em cada gel foi aplicado um marcador de peso molecular com valores pré-estabelecidos e corados.

A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, através de um aparelho também da BioRad por 2 horas a 120 V (Towbin et col., 1992). No tampão de transferência foi acrescido SDS 0,1% para melhorar a eluição de proteínas de alto peso molecular.

A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi minimizada pela incubação destas com uma solução basal acrescida de leite desnatado Molico® (Nestlé, Carazinho, Rio Grande do Sul, Brasil) 5%, Tris 10mM, NaCl 150mM e Tween 20 0,02%) em temperatura ambiente por 2 horas sob leve agitação. Estas membranas foram então incubadas com anticorpos específicos em solução basal contendo 3% de BSA em concentrações que variavam de 1:200 a 1:1000, a temperatura de 4° C sob leve agitação, por 12h. Em seguida as membranas foram lavadas com solução basal por 30 minutos e submetidas a nova incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase, por 1h em temperatura ambiente e solução para detecção por quimioluminescência como descrito no protocolo do kit. A emissão de luz foi detectada e captada pelo sistema de detecção MF-ChemiBIS (DNR Bio-Imaging Systems Ltda, Jerusalem, Israel) e a intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica através da utilização do programa de análise Image J® (Image J, National Institutes of Health, Hamilton, Ontario, Canadá).

2.9 Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada através dos programas GraphPad Prism versão 5.01® (GraphPad, San Diego, Califórnia, USA) e

Statsoft Statistica versão 7.0 (Statsoft Statistica, Tulsa, Oklahoma, USA). O tamanho amostral mínimo por grupo para cada parâmetro analisado foi definido através dos seguintes critérios: a) número de amostras (N) resultante de pelo menos três experimentos distintos; b) N suficiente para realização da análise da distribuição das amostras através do “Kolmogorov-Smirnov test” pelo programa GraphPad Prism versão 5.01®.

Quando as amostras não apresentaram distribuição normal foi adotada uma das seguintes transformações diretas dos dados: a logarítmica, a logarítmica dos dados (+1), a raiz quadrada dos dados, ou a raiz quadrada dos dados (+1). Após apresentarem normalidade da distribuição, para o tratamento estatístico foi utilizada a análise de variância por dois fatores (2way ANOVA). Quando o teste apresentou diferença significativa a análise foi seguida do teste post-hoc de Tukey-Kramer (Tukey's Multiple Comparison Test) com nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Os resultados apresentados foram expressos como média $\pm$ erro padrão ($M \pm EPM$).

3 RESULTADOS

3.1 Evolução ponderal

Os animais foram separados aleatoriamente e no tempo identificado como inicial ou zero foram submetidos a cirurgia fictícia, sham, ou a ooforectomia, O. A Figura 03 apresenta a evolução ponderal avaliada durante oito semanas após a cirurgia (Figura A) e mais três semanas após a inserção do pellet de DHEA (Figura B). A retirada dos ovários induziu ganho maior de 45% na massa corporal das ratas em comparação às sham, que foi de 29%. Além disso, esse aumento da massa foi estatisticamente diferente a partir da terceira semana da cirurgia (Figura A).

Na oitava semana os dois grupos foram novamente divididos e receberam ou não um pellet subcutâneo de DHEA. Não houve interferência da presença de DHEA sobre a evolução da massa corporal nas 3 semanas seguintes (Tabela 01).

A castração não modificou o tamanho da tíbia das ratas. No entanto, a presença do pellet de DHEA, induziu um discreto, mas significativo aumento de 3,5% ($p=0,02$) na tíbia das ratas castradas em comparação com as intactas (Tabela 01).

Figura 03 - Evolução ponderal

Fonte: Teixeira (2011). S (Sham), SD (Sham+DHEA), O (Ooforectomia), OD (Ooforectomia+DHEA). Figura A – Gráfico correspondente ao período de ooforectomia prévio a inserção ao pellet de DHEA. Total de animais S (35) e O (36). Figura B – Gráfico correspondente ao período após a inserção do pellet de DHEA. Total de animais S (18) SD (17) O (18) OD(18). ANOVA, Tukey-Kramer, * $p<0,05$.

Tabela 01 – Dados zoométricos. ¹Peso inicial. ²Ganho percentual da média do peso ao decorrer das 12 semanas.

PARÂMETROS	GRUPOS							
	S		SD		O		OD	
SEMANA 0 ¹ (g)	211±3 ^A	(35)	-		207±3 ^A	(36)	-	
SEMANA 8 (g)	272±4 ^A	(35)	-		300±7 ^B	(36)	-	
1º SEMANA DE DHEA (g)	267±3 ^A	(18)	281±5 ^A	(17)	301±5 ^B	(18)	294±5 ^B	(18)
3º SEMANA DE DHEA (g)	274±3 ^A	(18)	284±5 ^A	(17)	312±5 ^B	(18)	308±5 ^B	(18)
GANHO PERCENTUAL ²	29%	(18)	34%	(17)	45%	(18)	37%	(18)
COMPRIMENTO NASO - ANAL FINAL (cm)	21,10±0,24 ^A	(8)	21,00±0,35 ^A	(8)	21,30±0,33 ^A	(8)	21,50±0,27 ^A	(8)
ÍNDICE DE LEE (√g/cm)	0,30±0,01 ^A	(8)	0,30±0,01 ^A	(8)	0,31±0,01 ^A	(8)	0,30±0,01 ^A	(8)
TAMANHO DA TÍBIA (mm)	37,22±0,32 ^{AB}	(17)	36,88±0,32 ^A	(17)	37,91±0,29 ^{AB}	(17)	38,16±0,27 ^B	(17)

Fonte: Teixeira (2011). S (Sham), SD (Sham+DHEA), O (Ooforectomia), OD (Ooforectomia+DHEA). Letras iguais não apresentam diferença estatística entre elas, letras diferentes apresentam $p < 0,05$. Os resultados estão expressos como média ±EPM para o número de animais utilizados entre parênteses ANOVA, Tukey-Kramer.

3.2 Teste de tolerância à glicose (GTT) e constante de decaimento da glicose (K_{itt})

A cirurgia e o tratamento com DHEA não influenciaram nas respostas ao teste de tolerância a glicose (Figura 04 A) e no K_{itt} (Figura 04 B) entre os grupos.

Figura 04 - (A) Teste de tolerância à glicose (GTT), ao longo do tempo e (B) Constante de decaimento da glicose (K_{itt})

Fonte: Teixeira (2011). S (Sham), SD (Sham+DHEA), O (Ovx, Ooforectomia), OD (Ooforectomia+DHEA), n=5 para todos os grupos, sem diferença estatística.

3.3 Dosagem hormonal

A castração aumentou os hormônios hipofisários luteinizante e folículo estimulante (LH e FSH) e diminuiu os esteroides ovarianos (progesterona e estradiol) nas ratas castradas, como ocorre na menopausa. No entanto, a adição de DHEA às ratas sem ovários induziu uma concentração de estradiol sérica semelhante às ratas intactas (Tabela 02).

Tabela 02 - Dosagem dos hormônios hipofisários e ovarianos

PARÂMETROS	GRUPOS			
	S	SD	O	OD
FSH (mIU/mL)	13,50±6,27 ^A (9)	16,50±9,83 ^A (9)	58,44±11,00 ^B (11)	70,76±8,78 ^B (9)
LH (mIU/mL)	9,66±0,56 ^A (10)	9,53±0,97 ^A (9)	75,35±14,08 ^B (10)	54,59±5,72 ^B (9)
ESTRADIOL (mIU/mL)	50,98±3,54 ^A (11)	55,83±6,05 ^A (10)	32,38±3,38 ^B (11)	52,40±7,26 ^A (10)
PROGESTERONA (mIU/mL)	38,98±18,82 ^A (9)	21,75±5,82 ^A (9)	7,48±1,23 ^B (9)	4,87±0,71 ^B (11)

Fonte: Teixeira (2011). S (Sham), SD (Sham+DHEA), O (Ooforectomia), OD (Ooforectomia+DHEA). Entre letras iguais não há diferença, letras diferentes $p < 0,05$. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM para o número de animais utilizados entre parênteses. ANOVA 2 WAY. Tukey-Kramer.

3.4 Massa dos órgãos e tecidos

A Tabela 03 apresenta a massa dos seguintes tecidos: coração, ventrículo esquerdo e útero.

A ooforectomia aumentou o peso úmido do coração em cerca de 10% nas ratas castradas. No entanto, ao corrigir esse peso pelo peso corporal, não houve diferença. A inclusão do pellet de DHEA não modificou esse parâmetro. A relação do percentual de água dos corações dos diferentes grupos foi semelhante entre si.

Por outro lado, o peso do ventrículo esquerdo isolado foi maior em torno de 12%, $p < 0,05$, nas ratas castradas com pellet de DHEA em relação aos controles, sham.

Como esperado, o peso do útero dos animais castrados foi menor do que dos animais sham em cerca de 80% e o tratamento com DHEA não modificou esse parâmetro.

Tabela 03 - Massa dos tecidos

PARÂMETROS	GRUPOS							
	S		SD		O		OD	
CORAÇÃO (mg)	712±20,19 ^A	(17)	655±26,25 ^{AB}	(17)	788±21,79 ^B	(17)	782±19,86 ^B	(17)
CORAÇÃO/MASSA CORPORAL (mg/g) ⁻¹	298±7,16 ^A	(17)	303±9,07 ^A	(17)	292±6,44 ^A	(17)	299±5,45 ^A	(17)
RELAÇÃO DO PERCENTUAL DE ÁGUA	85±0,78 ^A	(5)	84±0,26 ^A	(5)	84±0,29 ^A	(5)	84±1,31 ^A	(5)
VENTRÍCULO ESQUERDO (mg)	588±12,38 ^A	(17)	624±13,98 ^{AB}	(17)	635±13,76 ^{AB}	(17)	656±13,38 ^B	(17)
ÚTERO (mg)	638±97,62 ^A	(17)	823±210,5 ^A	(17)	137±15,45 ^B	(17)	161±5,90 ^B	(17)

Fonte: Teixeira (2011). S (Sham), SD (Sham+DHEA), O (Ooforectomia), OD (Ooforectomia+DHEA). Entre letras iguais não há diferença, letras diferentes $p < 0,05$. Os resultados estão expressos como média ±EPM para o número de animais utilizados entre parênteses. ANOVA, Tukey-Kramer.

O peso dos diferentes coxins adiposos foi corrigido pelo peso corporal e estão apresentados na Tabela 04. O coxim adiposo localizado ao redor do útero,

denominado periuterino, foi semelhante entre os grupos. No entanto, os demais tecidos adiposos de localização intra-abdominal apresentaram aumento relativo.

No retroperitoneal encontramos aumento de aproximadamente 36% entre os grupos castrados (O e OD) quando comparados aos intactos. Os coxins adiposos localizados nas lojas renais apresentaram-se aumentados para $187\pm 26\%$ nas ratas castradas e para $152\pm 13\%$ nas tratadas com DHEA em comparação às intactas, com ou sem DHEA. O tecido adiposo subcutâneo também foi maior nas ratas castradas com ou sem DHEA para aproximadamente 40% em relação às controles, $p < 0,05$.

Tabela 04 - Razão da massa dos tecidos adiposos pela massa corporal

PARÂMETROS	GRUPOS			
	S	SD	O	OD
PERIUTERINO ¹ (g.g ⁻¹)	$0,88\pm 0,25^A$	$0,98\pm 0,09^A$	$1,00\pm 0,07^A$	$1,20\pm 0,10^A$
RETROPERITONEAL (g.g ⁻¹)	$0,80\pm 0,06^A$	$0,95\pm 0,06^A$	$1,10\pm 0,06^B$	$1,08\pm 0,06^B$
RENAL ¹ (g.g ⁻¹)	$0,38\pm 0,02^A$	$0,38\pm 0,04^A$	$0,71\pm 0,06^B$	$0,58\pm 0,05^B$
SUBCUTANÊO ¹ (g.g ⁻¹)	$1,25\pm 0,06^A$	$1,36\pm 0,07^A$	$1,79\pm 0,08^B$	$1,69\pm 0,07^B$

Fonte: Teixeira (2011). S (Sham), SD (Sham+DHEA), O (Ooforectomia), OD (Ooforectomia+DHEA). ¹ Números transformados apenas para análise estatística, aqui os números são reais. Entre letras iguais não há diferença, letras diferentes $p < 0,05$. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM para o número de animais utilizados, $n = 17$ para todos os grupos. ANOVA 2 WAY, Tukey-Kramer.

3.5 Medidas hemodinâmicas

A cirurgia e o tratamento com DHEA não influenciaram a função cardíaca durante o cateterismo, conforme Tabela 05.

Tabela 05 - Parâmetros hemodinâmicos arterial e ventricular

PARÂMETROS	GRUPOS			
	S (10)	SD (7)	O (9)	OD (8)
PAS (mmHg)	125,12±6,03 ^A	110,24±7,44 ^A	115,98±3,15 ^A	111,95±3,39 ^A
PAD (mmHg)	78,56±6,48 ^A	69,51±6,73 ^A	72,06±2,79 ^A	67,79±4,00 ^A
Fc (bpm)	367,61±10,45 ^A	374,30±9,81 ^A	370,46±6,80 ^A	363,02±10,41 ^A
PSVE (mmHg)	131,55±7,00 ^A	112,54±8,62 ^A	121,47±4,57 ^A	118,32±3,73 ^A
PDfVE (mmHg)	4,73±1,28 ^A	2,55±1,31 ^A	4,68±1,21 ^A	4,02±1,14 ^A
dP/dt + (mmHg/s)	7077,53±320,75 ^A	6451,07±593,06 ^A	6809,69±218,77 ^A	6457,15±294,21 ^A
dP/dt - (mmHg/s)	-4649,22±202,13 ^A	-4248,69±360,51 ^A	-4224,28±151,39 ^A	-3913,65±172,86 ^A

Fonte: Teixeira (2011). S (Sham), SD (Sham+DHEA), O (Ooforectomia), OD (Ooforectomia+DHEA). PAS (Pressão Arterial Sistólica), PAD (Pressão Arterial Diastólica), Fc (Frequência Cardíaca), PSVE (Pressão Sistólica do Ventrículo Esquerdo), PDfVE (Pressão Diastólica final do Ventrículo Esquerdo), dP/dt+ (Índice de Contratilidade Cardíaca), dP/dt- (Índice de Relaxamento Cardíaco). Entre letras iguais não há diferença. Os resultados estão expressos como média ±EPM. ANOVA 2 WAY.

3.6 Morfologia dos cardiomiócitos

A avaliação morfométrica foi feita em cortes histológicos corados com HE semelhantes ao apresentado na Figura 05.

Comparando a média da espessura dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo foi possível detectar uma redução em seu diâmetro nas ratas ooforectomizadas em cerca de 16% quando comparado ao grupo de ratas intactas, sham. Por sua vez, o tratamento com DHEA não modificou este resultado. Ademais, ao serem analisadas cada uma das paredes isoladamente, detectamos que somente a parede anterior permaneceu semelhante entre grupos intactos e ooforectomizados. Independente da presença do pellet de DHEA (Tabela 06).

Quando avaliado a quantidade de núcleos por campo, observamos uma redução em torno de 20% no grupo de ratas ooforectomizadas, quando comparado ao grupo sham, $p < 0,05$. Entretanto nota-se uma reversão desse efeito com a presença do DHEA.

Figura 05 - Fotomiografia de cortes transversais do ventrículo esquerdo corados com Hematoxilina e Eosina em aumento de 100X

S

SD

O

OD

Fonte: Teixeira (2011). A seta na figura S esta indicando o núcleo. S (Sham), SD (Sham+DHEA), O (Oophorectomia), OD (Oophorectomia+DHEA).

Tabela 06 - Espessura dos cardiomiócitos e número de núcleos do ventrículo esquerdo

PARÂMETROS	GRUPOS							
	S		SD		O		OD	
DIÂMETRO DOS CARDIOMIÓCITOS (μm)	9,01 $\pm$ 0,28 ^A	(7)	8,18 $\pm$ 0,15 ^A	(6)	7,67 $\pm$ 0,45 ^B	(7)	6,90 $\pm$ 0,23 ^B	(7)
REGIÕES:								
SEPTO (μm)	9,08 $\pm$ 0,31 ^A	(7)	8,37 $\pm$ 0,23 ^A	(6)	7,79 $\pm$ 0,65 ^B	(7)	6,81 $\pm$ 0,28 ^B	(7)
ANTERIOR (μm)	8,38 $\pm$ 0,50 ^A	(7)	7,87 $\pm$ 0,28 ^A	(6)	7,65 $\pm$ 0,60 ^A	(7)	6,73 $\pm$ 0,43 ^A	(7)
LIVRE (μm)	9,17 $\pm$ 0,45 ^A	(7)	8,15 $\pm$ 0,11 ^A	(6)	7,46 $\pm$ 0,54 ^B	(7)	7,00 $\pm$ 0,28 ^B	(7)
POSTERIOR (μm)	9,02 $\pm$ 0,40 ^A	(7)	8,34 $\pm$ 0,28 ^A	(6)	7,55 $\pm$ 0,49 ^B	(7)	7,00 $\pm$ 0,23 ^B	(7)
NÚCLEO (unidade)	1044 $\pm$ 29,83 ^A	(6)	1007 $\pm$ 55,01 ^A	(5)	839 $\pm$ 57,95 ^B	(5)	951 $\pm$ 57,64 ^A	(5)

Fonte: Teixeira (2011). S (Sham), SD (Sham+DHEA), O (Ooforectomia), OD (Ooforectomia+DHEA). Entre letras iguais não há diferença, letras diferentes $p < 0,05$. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM para o número de animais utilizados entre parênteses. ANOVA 2WAY, Tukey-Kramer.

3.7 Immunoblotting

A Figura 06 apresenta o *immunoblotting* típico das proteínas intracelulares avaliadas do ventrículo esquerdo e o gráfico representa a média das análises por densitometria óptica das bandas correspondentes a cada uma das proteínas. A castração induziu redução na expressão das proteínas IR, IRS1 e Akt1. O tratamento com DHEA não modificou essa redução. Por outro lado, a expressão tecidual do receptor de IGF1 e das proteínas PI3K, JAK2, MAPK 42/44 e SERCA 2 foram semelhantes entre os quatro grupos (Tabela 07 e Figura 05).

Figura 06 - Densitometria óptica da expressão das proteínas intracelulares do ventrículo esquerdo

Fonte: Teixeira (2011). Valores expressos em % de Unidades Arbitrárias (UA) em relação ao grupo S. (1) IGF1R; (2) IRS1; (3) IRS1; (4) AKT1; (5) MAPK42/44; (6) SERCA2. S (Sham), SD (Sham+DHEA), O (Ooforectomia), OD(Ooforectomia+DHEA). Entre letras iguais não há diferença, letras diferentes $p < 0,05$. ANOVA 2WAY, Tukey-Kramer.

Tabela 07 - Expressão das proteínas intracelulares

PARÂMETROS	GRUPOS							
	S		SD		O		OD	
IGF-1R	100±16% ^A	(8)	143±14% ^A	(10)	117±9% ^A	(9)	126±11% ^A	(8)
IR	100±6% ^A	(10)	98±6% ^A	(10)	75±6% ^B	(10)	68±6% ^B	(8)
IRS-1	100±8% ^A	(6)	100±13% ^A	(6)	68±13% ^B	(6)	49±6% ^B	(5)
JAK2	100±19% ^A	(6)	78±16% ^A	(6)	79±26% ^A	(6)	56±19% ^A	(5)
PI3K	100±10% ^A	(9)	109±8% ^A	(9)	103±8% ^A	(9)	93±11% ^A	(6)
AKT-1	100±5% ^A	(9)	104±6% ^A	(9)	77±9% ^B	(10)	81±10% ^B	(8)
MAPK 42/44	100±15% ^A	(9)	124±17% ^A	(10)	111±9% ^A	(9)	112±8% ^A	(7)
SERCA 2	100±17% ^A	(8)	89±8% ^A	(10)	93±14% ^A	(9)	95±8% ^A	(8)

Fonte: Teixeira (2011). S (Sham), SD (Sham+DHEA), O (Ooforectomia), OD (Ooforectomia+DHEA). Valores expressos em % de Unidades Arbitrárias (UA) em relação ao grupo S. Entre letras iguais não há diferença, letras diferentes p<0,05. Os resultados estão expressos como média ±EPM para o número de animais utilizados entre parênteses. ANOVA 2WAY, Tukey-Kramer.

4 DISCUSSÃO

A cessação da função ovariana provoca redução do metabolismo, da quantidade de massa magra, e do gasto energético durante a atividade física, além de estimular o acúmulo de gordura no tecido adiposo, caracterizando a obesidade global e abdominal, contribuindo para o maior risco de obesidade e doença cardiovascular em mulheres após a menopausa (Gambacciani et al., 2001; Poehlman e Tchernof, 1998).

O modelo escolhido neste estudo utiliza a ooforectomia que reduz os hormônios ovarianos, estrógeno e progesterona, e aumenta os hormônios hipotalâmicos, hormônio folículo-estimulante e luteinizante (Belchetz, 1994; Dantas et al., 1999) e a suplementação com DHEA, um precursor para produção de andrógenos e estrógenos (Labrie et al., 2011) que, diferentemente da reposição com estradiol que aumenta a incidência de câncer de mama (Anderson, 2004), apresenta um efeito protetor na glândula mamária (Labrie et al., 2003, 2007; López-Marure et al., 2011; Pelletier et al. 2008).

A disfunção no metabolismo dos estrógenos tem sido associada além da obesidade também ao DM. Em camundongos fêmeas ooforectomizadas e submetidas à dieta hiperlipídica, o estrógeno foi capaz de proteger contra a obesidade e a intolerância à glicose, modulando a expressão de genes reguladores da adipogênese, lipogênese e lipólise (Stubbins et al., 2011).

Nossos resultados e outros experimentos realizados no laboratório em ratas nas mesmas condições mostram que somente 12 semanas de ooforectomia não é capaz de alterar a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina mensurada pela constante de decaimento da glicose. Embora seja conhecido o papel dos estrógenos na regulação do metabolismo energético pela ação da insulina (Barros et al., 2006), neste modelo e período de observação não foram identificadas essas alterações.

Em camundongos *knockout* para a enzima aromatase (ArKO) a oxidação da glicose é reduzida, com aumento do tecido adiposo e hiperinsulinemia, independentemente do gênero (Jones et al., 2000). Além disso, estrógenos alteram a expressão gênica de tecidos centrais e periféricos suprimindo o consumo energético (Asarian et al., 2006). Assim, durante o diestro, fase em que há menor concentração de estrógenos circulantes, as ratas apresentam maior consumo alimentar que se reduz durante as fases de proestro e ainda mais no estro (Eckel et

al., 2000). Neste sentido, a ooforectomia causa um desequilíbrio energético positivo em ratas pelo aumento do consumo alimentar, resultando em aumento da massa corporal (Giles et al., 2010), como foi observado a partir da terceira semana após a ooforectomia.

De modo distinto do que foi detectado no presente estudo, em que a suplementação com DHEA não modificou a evolução ponderal das ratas ovariectomizadas, Mauriège et al. (2003) demonstraram que a administração de 30mg/mL DHEA diariamente durante 27 semanas consecutivas resultou em redução da massa corporal, da atividade da lipase hormônio sensível (HSL) e aumento da lipase lipoprotéica (LLP) no tecido adiposo de ratas, confirmando um papel inibitório do DHEA sobre os estoques de gordura. Uma diferença importante entre o atual estudo e o relatado é que o tempo de administração do DHEA foi nove vezes maior naquele.

Diferente dos humanos, os ratos não cessam o crescimento longitudinal logo após a maturação sexual (Hughes et al. 1970). Há prolongamento dessa fase, embora mais lenta. No entanto, quando expostos a altas doses de estrógenos há inibição desse crescimento longitudinal dos ossos (Gevers et al., 1995; Turner et al., 1994).

Em condições normais, ratas Wistar apresentam crescimento ósseo acelerado até a quarta semana de vida, seguida de redução gradual dessa taxa crescimento até completar a maturidade sexual, ao redor da sétima semana de vida. A maturidade sexual é representada pela abertura vaginal e presença de ciclos estrais que duram aproximadamente cinco dias. No entanto, o crescimento longitudinal continua de modo gradativo da 12^a semana até 40^a semana de vida (Van Der Eerden et al., 2002).

O DHEA tem um efeito supressor no crescimento longitudinal dos ossos por uma ação direta sobre a placa epifisária dependente dos receptores de estrógenos, predominantemente o receptor beta, diminuindo a proliferação, hipertrofia e diferenciação dos condrócitos e aumentando a apoptose (Sun et al., 2011). No presente estudo foi detectada uma diferença no crescimento de ossos longos entre as ratas submetidas ao tratamento com DHEA, as ooforectomizadas tratadas com o esteroide apresentaram maior comprimento da tíbia em relação às controles tratadas.

Uma hipótese para explicar esse dado é que as ratas controles que receberam DHEA devem ter apresentado cerca de sete ciclos estrais enquanto, nesse mesmo

período as ooforectomizadas ficaram poupadas da exposição aos estrogênios por cerca de oito semanas seguidas da administração do esteroide adrenal. Assim, é possível que essa ausência inicial dos estrogênios tenha favorecido o crescimento da tíbia. Como o DHEA é um precursor dos esteroides sexuais, sua presença após a fase de crescimento acelerado ósseo pode ter interferido com esse crescimento justificando a diferença detectada entre os animais que receberam esse esteroide. No entanto, esse maior comprimento da tíbia nas ratas ooforectomizadas que receberam DHEA não repercutiu no comprimento total avaliado.

A ooforectomia bilateral induziu redução dos esteroides sexuais, massa do útero e aumento das gonadotrofinas hipofisárias como esperado. Por outro lado, a suplementação com DHEA nas ratas castradas induziu aumento da concentração circulante do estradiol sem induzir efeito de retroalimentação no eixo endócrino ou mesmo sobre a atrofia uterina. Enquanto que nas ratas intactas o DHEA não modificou os valores circulantes de estradiol mensurado ao final do protocolo experimental.

Dantas et al.(2004), demonstraram que a reposição com estradiol a ratas ooforectomizadas induz recuperação da massa uterina e da retroalimentação sobre os valores séricos da gonadotrofina FSH. Por outro lado, Berger et al. (2008), aplicando creme contendo DHEA intravaginal diariamente em ratas ooforectomizadas observaram somente alteração no muco cervical, mas nenhuma nas células proliferativas do epitélio vaginal, nos receptores de andrógenos, nos receptores alfa de estrógenos, nos receptores de progesterona, na massa uterina, nas glândulas mamárias ou mesmo na pele. Em camundongos fêmeas castradas a administração de DHEA durante três meses consecutivos induziu efeitos sobre os ossos, enquanto que a reposição estrogênica induziu proliferação no endométrio e útero (Wang et al., 2009). Ademais, dados obtidos em humanos indicam que o FSH pode ser suprimido pelos esteroides produzidos pela glândula adrenal (Saito et al., 2011). Assim, no presente estudo apesar da administração de DHEA ter induzido recuperação da concentração de estradiol a valores iguais aos dos animais controles, não recuperou o efeito de retroalimentação do eixo endócrino ou da atrofia uterina.

Outro efeito associado à perda dos esteroides sexuais envolve o sistema cardiovascular. A castração induz aumento absoluto da massa cardíaca e de VE, no entanto, a correção pela massa corporal mostra que esses índices são semelhantes

entre castrados e intactos. Ademais, o presente estudo identificou uma redução do diâmetro e da quantidade de núcleos nos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo semelhante ao detectado por Mendonça et al. (2007). No entanto, essa modificação não repercutiu sobre a função de bomba do VE. Considerando que a morfologia típica de um miócito cardíaco é de uma célula de tamanho pequeno, com arquitetura irregular, apresentando um ou dois núcleos localizados na região central, sem presença de mitose após quatro meses de vida (Liberatori et al., 1999), os achados desse estudo permitem a conclusão de que a castração leva a perda de miócitos cardíacos, sem, no entanto, alterar a função de bomba.

É importante ressaltar a grande resistência às alterações na função de bomba cardíaca que ratos apresentam. Por exemplo, infartos que resultam em lesões de até 30% da área de VE não apresentam alterações hemodinâmicas nessa espécie animal (Zornoff et al., 2009).

Segundo Fabris (2011) a ooforectomia aumenta a apoptose do cardiomiócito, associado com um aumento da enzima conversora da angiotensina (ACE) e do gene do receptor da angiotensina II do tipo 1 (AT₁). Xu et al. (2003) também encontraram em ratas castradas Sprague-Dawley um aumento da massa do ventrículo esquerdo, além de menor expressão da cadeia pesada de miosina (MHC) e dos receptores de estrógeno-alfa e beta, com aumento da expressão do receptor AT₁.

O receptor beta de estrógenos (ERb) apresenta um efeito distinto em machos e fêmeas. Fliegner et al. (2010) utilizando camundongos ERb^{-/-} mostraram uma melhor adaptação no metabolismo energético do miocárdio de fêmeas que desenvolveram menor fibrose e apoptose em relação aos machos. Assim, enquanto o ERb contribui para manutenção da homeostase energética limitando o desenvolvimento de hipertrofia excêntrica e fibrose nas fêmeas, em machos esse receptor controla a apoptose, o aumento da expressão genica de elementos da matriz extracelular e a repressão a genes mitocondriais, confirmando o efeito protetor do estrógeno.

Para Liou et al. (2010) a reposição com estradiol diminui a apoptose induzida pela ooforectomia bilateral. No presente estudo a reposição com DHEA foi associada a recuperação da concentração sérica de estradiol e impediu a diminuição na quantidade de núcleos. Ao que parece os estrógenos protegem o músculo cardíaco enquanto a ooforectomia altera essa proteção.

Estudos com animais *knockout* para proteínas específicas trouxeram informações sobre os mecanismos celulares que ligam efeitos protetores sobre os cardiomiócitos

e vias intracelulares de fatores extracelulares. A deleção específica do receptor de insulina no músculo cardíaco é o fator mais importante para morte em camundongos transgênicos no primeiro mês de vida, que além de causar um desequilíbrio no metabolismo da glicose leva a um defeito no crescimento do miocárdio diminuindo-o em relação ao corpo (Laustsen et al., 2007) No entanto, apesar de ter sido detectada redução na expressão do receptor de insulina nas ratas após 12 semanas de castração, isso não levou a aumento de morte precoce nesse grupo de animais.

Há evidências demonstrando que o estradiol aumenta a associação da proteína IRS1 com a subunidade regulatória de 85 kDa da PI3-cinase, p85, no músculo cardíaco de ratas ooforectomizadas. Além disso, esse esteroide sexual é capaz de aumentar a expressão gênica dessa p85 e o grau de fosforilação em serina da proteína Akt (Koricanac et al., 2009) e ter efeito anti-apoptótico em cardiomiócitos associado a inibição da via MAPKp38 (Fabris, 2011). A proteína Akt parece ter um papel importante na sobrevivência dos miócitos cardíacos e consequentemente sobre a função cardíaca.

Bhuiyan et al. (2010) demonstraram diminuição no grau de fosforilação em serina e treonina da proteína Akt e um desequilíbrio na produção de NO em coração de ratas ovariectomizadas com hipertrofia cardíaca secundária a sobrecarga pressórica. Por outro lado, em modelos animais de obesidade relacionada ao envelhecimento (Jacob et al., 2009) ou induzido por dieta hiperlipídica (Aragno et al., 2009) há efeito protetor cardíaco do DHEA sobre o balanço oxidativo e expressão proteica da Akt.

Ademais, há dados na literatura demonstrando um efeito do DHEA sobre o aumento do grau de fosforilação da Akt em vários tipos celulares (Bhuiyan et al., 2011; Janner et al., 2010; Sato et al., 2011) e no coração de ratos (Jacob et al., 2009). No entanto, a indução da fosforilação da Akt pelo DHEA no músculo cardíaco foi detectada somente após 24h de injeção intraperitoneal do esteroide associado a ciclodextrina (Jacob et al. 2008).

Assim, a reduzida expressão da proteína Akt detectada nas ratas após as 12 semanas de ooforectomia bilateral deve ter um papel importante nas alterações morfométricas dos miócitos do VE.

5 CONCLUSÃO

Os dados obtidos mostram que após 12 semanas de ooforectomia bilateral em ratas com dois meses de vida há aumento da massa corporal total e dos tecidos adiposos e a suplementação com DHEA na dosagem e no tempo usados não modifica este ganho.

A remoção dos ovários não altera a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina, mas diminui a massa uterina, os esteroides gonadais e aumenta as gonadotrofinas hipofisárias. O tratamento com DHEA recupera a concentração sanguínea de estradiol para valores semelhantes às ratas intactas, sem restaurar a retroalimentação desse eixo endócrino.

A ooforectomia diminui a espessura e a quantidade de núcleos dos miócitos de ventrículo esquerdo, sem apresentar alteração hemodinâmica entre os grupos. O tratamento com DHEA impediu a redução no número de núcleos dos miócitos.

A castração induz redução na expressão proteica do receptor de insulina, do substrato 1 do IR e da cinase intracelular Akt. Essas modificações devem ter um papel no mecanismo celular das alterações morfométricas identificadas. No entanto, não é possível descartar que a ativação das mesmas tenha sofrido modificações com o tratamento com DHEA.

Tomados em conjunto, esses dados nos permitem concluir que a remoção dos ovários altera as características morfológicas e de sinalização intracelular no músculo cardíaco, mesmo na ausência de alterações hemodinâmicas e o DHEA no período e dosagem utilizados contribui parcialmente para a reversão dessas alterações, indicando um potencial efeito protetor desse esteroide sobre o coração.

Referências¹

- Aakvaag A, Hagen AA, Eik-Nes KB. Biosynthesis in vivo of testosterone and 4-androstenedione from dehidroepiandrosterone-sodium sulfate by the canine testis and ovary. *Biochim Biophys Acta*. 1964;86(8):622-627.
- Abel ED. Insulin signaling in heart muscle : lessons from genetically engineered mouse models. *Curr Hypertens Rep*. 2004;6(6):416-23.
- Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, et al. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal woman with hysterectomy : the woman's health initiative randomized controlled trial. *JAMA*, 2004;291(14):1701-12.
- Aragno M, Mastrocola R, Medana C, et al. Oxidative stress-dependent impairment of cardiac-specific transcription factors in experimental diabetes. *Endocrinology*, 2006;147(12):5967-5974.
- Aragno M, Meineri G, Vercellinato I, et al. Cardiac impairment in rabbits fed a high-fat diet is counteracted by dehydroepiandrosterone supplementation. *Life Sci*. 2009;85(1-2):77-84.
- Asarian L, Geary N. Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006;361(1471):1251-1263.
- Barros RPA, Machado UF, Gustafsson J. Estrogen receptors: new players in diabetes mellitus. *Trends Mol Med*. 2006;12(9):425-31.
- Baulieu EE. Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology*, 1998;23(8):963-987.
- Belchetz PE. Hormonal treatment of postmenopausal women. *N Engl J Med*. 1994;330(15):1062-1071.
- Belke DD, Betuing S, Tuttle MJ, et al. Insulin signaling coordinately regulates cardiac sizes, metabolism, and contractile protein isoform expression. *J Clin Invest*. 2002;109(5):629-639.
- Berger L, El-Alfy, Labrie F. Effects of intravaginal dehydroepiandrosterone on vaginal histomorphology, sex steroid receptor expression and cell proliferation in the rat. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008;109(1-2):67-80.
- Bernardis LL. Prediction of carcass fat, water and lean body mass from Lee's nutritive ratio in rats with hypothalamic obesity. *Experientia*, 1970;26(7):789-90.
- Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere MB et al. Homeostasis Model Assessment Closely Mirrors the Glucose Clamp Technique in the Assessment of Insulin Sensitivity. *Diabetes Care*. 2000;23(1):57-63.
- Brüning JC, Michael MD, Winnay JN, et al. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell*. 1998;2(5):559-569.

¹ De acordo com:

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas. Grupo DiTeses. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo: documento eletrônico Vancouver. São Paulo: SIBI-USP; 2011.

Bhuiyan MS, Fukunaga K. Characterization of an animal model of postmenopausal cardiac hypertrophy and novel mechanisms responsible for cardiac decompensation using ovariectomized pressure-overloaded rats. *Menopause*. 2010;17(1):213-221.

Bhuiyan MS, Fukunaga K. Stimulation of sigma-1 receptor by dehydroepiandrosterone ameliorates hypertension-induced kidney hypertrophy in ovariectomized rats. *Exp Biol Med*. 2010;235:356-364.

Bhuiyan MS, Tagashira H, Fukunaga K. Dehydroepiandrosterone-mediated stimulation of sigma-1 receptor Akt-eNos signaling in the thoracic aorta of ovariectomized rats with abdominal aortic banding. *Cardiovasc Ther*. 2011;29:219-230.

Campbell CS, Caperuto LC, Hirata AE, et al. The phosphatidylinositol/Akt/atypical PKC pathway is involved in the improved insulin sensitivity by DHEA in muscle and liver of rats in vivo. *Life Sci*. 2004;76(1):57-70.

Camporez JPG, Akamine EH, Davel AP, et al. Dehydroepiandrosterone protects against oxidative stress-induced endothelial dysfunction in ovariectomized rats. *J Physiol*. 2011;589(Pt10):2585-2596.

Chen Y, Heiman ML. Increased weight gain after ovariectomy is not a consequence of leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;280(2):E315-E322.

Cleary MP, Zisk J. Anti-obesity effect of two different levels of dehydroepiandrosterone in lean and obese middle-aged female Zucker rats. *Int J Obes*. 1986;10(3):193-204.

Cappola AR, Xue QL, Walston JD, Leng SX, Ferrucci L, Guralnik J, Fried P. DHEAS levels and mortality in disabled older women: The women's health and aging study I. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2006;61(9):957-962.

Dantas APV, Franco MCP, Tostes RCA, Fortes ZB, et al. Relative contribution of estrogen withdrawal and gonadotropins increase secondary to ovariectomy on prostaglandin generation in mesenteric microvessels. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004;43(1):48-55.

Dantas APV, Scivoletto R, Fortes ZB, et al. Influence of female sex hormones on endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1999;34(4Pt2):914-919.

Dantas APV, Tostes RCA, Fortes ZB, et al. In vivo evidence for antioxidant potential of estrogen in microvessels of female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2002;39(2Pt2):405-411.

Dean SA, Tan J, O'Brien ER, et al. 17 β -Estradiol downregulates tissue angiotensin-converting enzyme and ANG II type 1 receptor in female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288(3):R759-R766.

Diamond P, Cusan L, Gomez JL, et al. Metabolic effects of 12-month percutaneous dehydroepiandrosterone replacement therapy in postmenopausal women. *J Endocrinol*. 1996;150:S43-S50.

Diemen VV, Trindade EN, Trindade MRM. Experimental model to induce obesity in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2006;21(6):425-429.

Dubey RK, Gillespie DG, Zacharia LC, et al. Methoxyestradiols mediate the antimitogenic effects of locally applied estradiol on cardiac fibroblast growth. *Hypertension*. 2002;39(2Pt2):412-7.

- Eckel LA, Houpt TA, Geary N. Spontaneous meal patterns in female rats with and without access to running wheels. *Physiol Behav.* 2000;70(3-4):397-405.
- Fabris B, Candido R, Bortoletto M, et al. Stimulation of cardiac apoptosis in ovariectomized hypertensive rats: potential role of the renin-angiotensin system. *J Hypertens.* 2011;29(2):71-281.
- Fliegner D, Schubert C, Penkalla A, et al. Female sex and estrogen receptor-beta attenuate cardiac remodeling and apoptosis in pressure overload. *Am Journal Regul Intergr Comp Physiol.* 2010;298(6):R1597-1606.
- Formoso G, Chen H, Kim J, et al. Dehydroepiandrosterone mimics acute actions of insulin to stimulate production of both nitric oxide and endothelin 1 via distinct phosphatidylinositol 3-kinase-and mitogen-activated protein kinase-dependent pathways in vascular endothelium. *Mol Endocrinol.* 2006;20(5):1153-1163.
- Fortepiani LA, Zhang H, Racusen L, et al. Characterization of an Animal Model of Postmenopausal Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension,* 2003;41(3Pt2):640-645.
- Franchini KG. Hipertrofia cardíaca: mecanismos moleculares. *Rev Bras Hipertens.* 2001;8(1):125-42.
- Gambacciani M, Ciaponi M, Cappagli B, et al. Prospective evaluation of body weight and body fat distribution in early post-menopausal woman with without hormonal replacement therapy. *Maturitas,* 2001;39:125-32.
- Garcia PM, Giménez J, Bonacasa B, et al. 17 β -Estradiol exerts a beneficial effect on coronary vascular remodeling in the early stages of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Menopause,* 2005;12(4):453-459.
- Geloneze B., Tambascia MA. Avaliação laboratorial e diagnostico da resistência insulínica. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006;50(2):208-15.
- Giles ED, Jackman MR, Ginger CJ, et al. Effect of the estrous cycle and surgical ovariectomy on energy balance, fuel utilization, and physical activity in lean and obese female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;299(6):R1634-R1642.
- Giles TD. The patient with diabetes mellitus and heart failure: at-risk issues. *Am J Med.* 2003;115(8A):107S-110S.
- Gevers EF, Wit JM, Robinson ICA. Effect of gonadectomy on growth and GH responsiveness in dwarf rats. *J Endocrinol.* 1995;145(1):69-79.
- Giménez J, García MP, Serna M, et al. 17 β -Oestradiol enhances the acute hypotensive effect of captopril in female ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Exp Physiol.* 2006;91(4):715-722.
- Gruppo di Studio Progetto Menopausa Italia. Risk factors for high blood pressure in women attending menopause clinics in Italy. *Maturitas,* 2006;53(1):83-88.
- Gutiérrez G, Mendoza C, Zapata E, et al. Dehydroepiandrosterone inhibits the TNF- α -induced inflammatory response in human umbilical vein endothelial cells. *Atherosclerosis,* 2007;190(1):90-99.
- Hall PF, Sozer CC, Eik-Ness KB. Formation of dehydroepiandrosterone during in vivo and in vitro bioynthesis of testosterone by testicular tissue. *Endocrinology,* 1964;74:35-43.

- Han DH, Hansen PA, Chen MM, et al. DHEA treatment reduces fat accumulation and protects against insulin resistance in male rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1998;53(1):B19-B24.
- Hansen PA, Han DH, Nolte LA, et al. DHEA protects against visceral obesity and muscle insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Am J Physiol*. 1997;273(5Pt2):R1704-R1708.
- Hughes PC, Tanner JM. The assessment of skeletal maturity in the growing rat. *J Anat*. 1970;106(Pt2):371-402.
- Huikuri HV, Pikkujämsä SM, Airaksinen KE, et al. Sex relate differences in autonomic modulation of heart rate in middle-aged subjects. *Circulation*, 1996;94(2):122-5.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Projeção da população do Brasil por sexo e idade 1980-2050, Revisão 2008*. Rio de Janeiro, 2008.
- Ito K, Hirooka Y, Kimura Y, et al. Ovariectomy augments hypertension through rho-kinase activation in the brain stem in female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 2006;48(4):651-657.
- Jacob MHVM, Janner DR, Belló-Klein A, et al. Dehydroepiandrosterone modulates antioxidant enzymes and Akt signaling in healthy wistar rat hearts. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008;112(1-3):138-144.
- Jacob MHVM, Janner DR, Jahn MP, et al. DHEA effects on myocardial Akt signaling modulation and oxidative stress changes in age rats. *Steroids*, 2009;74(13-14):1045-1050.
- Janner DR, Jacob MHVM, Jahn MP, et al. Dehydroepiandrosterone effects on Akt signaling modulation in central nervous system of young and aged healthy rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;122(4):142-8.
- Jones ME, Thorburn AW, Britt KL, et al. Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(23):12735-40.
- Juutilainen A, Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K, Laakso M. Type 2 diabetes as a “coronary heart disease equivalent”: 18-years prospective population-based study in Finnish subjects. *Diabetes care*. 2005;28(12):2901-7.
- Kim JK, Michael MD, Previs SF, et al. Redistribution of substrate to adipose tissue promotes obesity in mice with selective insulin resistance in muscle. *J. Clin Investig*. 2000;105(12):1791-1797.
- Kimura M, Irahara M, Yasui T, et al. The obesity in bilateral ovariectomized rats is related to a decrease in the expression of leptin receptors in the brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;290(4):1349-1353.
- Koricanac G, Milosavljevic M, Stojiljkovic M, et al. Impact of estradiol on insulin signaling in the rat heart. *Cell Biochem Funct*. 2009;27(2):102-110.
- Labrie F, Martel C, Balser J. Wide distribution of the serum dehydroepiandrosterone and sex steroid levels in posmenopausal women: role the ovary? *Menopause*, 2011;18(1):30-43.
- Labrie F, Bélanger A, Bélanger P, et al. Metabolism of DHEA in posmenopausal woman following percutaneous administration. *J. Steroid Biochem Mol Biol*. 2007;2:178-188.

- Labrie F, Luu-The V, Lbrie C, et al. Endocrine and intracrine sources of androgens in women: inhibition of breast cancer and others roles of androgens and their precursor dehydroepiandrosterone. *Endocr Rev.* 2003;24(2):152-182.
- Laustsen PG, Russell SJ, Cui L, et al. Essential role of insulin and insulin-like growth factor 1 receptor signaling in cardiac development and function. *Mol Cell Biol.* 2007;27(5):1649-1664.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970;15(5259):680-5.
- Lemieux C, Picard F, Labrie F, et al. The estrogen antagonist EM-652 and dehydroepiandrosterone prevent diet- and ovariectomy-induced obesity. *Obes Res.* 2003;11(3):477-490.
- Libertori AWF, Lopes RD, Mora OA, et al. Estudo histomorfométrico dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo das ratas albinas durante a prenhez. *Ver Ass Med Brasil.* 1999;45(3):242-6.
- Liou CM, Yang A, Kuo C, et al. Effects of 17beta-estradiol on cardiac apoptosis in ovariectomized rats. *Cell Biochem Funct.* 2010;28(6):521–528.
- Liu D, Si H, Reynolds KA, Zhen W, Jia Z, Dillon JS. Dehydroepiandrosterone protects vascular endothelial cells against apoptosis through a Galphai protein-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and regulation of antiapoptotic Bcl-2 expression. *Endocrinology*, 2007;148(7):3068-3076.
- Liu ML, Xu X, Xie P, et al. Effect of long-term estrogen replacement treatment on the blood pressure and expression of IR and IRS-1 in myocardium. *J Cent South Univ.* 2005;30(1):38-40.
- López-Marure R, Contreras PG, Dillon JS. Effects of dehydroepiandrosterone on proliferation, migration, and death of breast cancer cells. *Eur J Pharmacol.* 2011;660(2-3):268-74.
- Mauriège P, Martel C, Langin D, et al. Chronic effects of dehydroepiandrosterone on rat adipose tissue metabolism. *Metabolism*, 2003;52(3):264-272.
- Medeiros SF, Medeiros MMWY. Modificações nos níveis de gonadotrofinas durante a vida reprodutiva. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2007;29(1):48-55.p14;48p.
- Medina MC, Souza LC, Caperuto LC, et al. Dehydroepiandrosterone increases beta-cell mass and improves the glucose-induced insulin secretion by pancreatic islets from aged rats. *Febs Lett.* 2006;580(1):285-290.
- Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med.* 1999;23(23):1801-1811.
- Mendonça LS, Santos CF, Lacerda CAM. Cardiac and aortic structural alterations due to surgically- induced menopause associated with renovascular hypertension in rats. *Int J Exp Path.* 2007;88(4):301–309.
- Mercuro G, Zoncu S, Saiu F, et al. Menopause induced by oophorectomy reveals a role of ovarian estrogen on the maintenance of pressure homeostasis. *Maturitas*, 2004;47(2):131-138.
- Mercuro G, Zoncu S, Pilia I, et al. Effects of acute administration of transdermal estrogen on postmenopausal woman with systemic hypertension. *Am J Cardiol.* 1997;80(5):652-655.

Ministério da Saúde. Uma análise da situação de saúde e da agenda nacional e internacional de prioridades em saúde. Brasília/DF:MS;2010.p14,48p.

Mohan PF, Ihnen JS, Levin BE, et al. Effects of dehydroepiandrosterone treatment in rats with diet-induced obesity. *J Nutr.* 1990;120(9):1103-1114.

Monkentin JD, Dorn GW. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol.* 2001;63:391-426.

Montes GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Intern.* 1996;20(1):15-27.

Moraes RS, Fucks FD, Moreira LB, et al. Pereira GM, Fucks SC. Risk factor for cardiovascular disease in a Brazilian population-based cohort study. *Int J Cardiol.* 2003;90(2-3):205-11.

Naga Prasad SV, Perrino C, Rockman HA. Role of phosphoinositide 3-kinase in cardiac function and heart failure. *Trends Cardiovasc Med.* 2003;13(5):206-212.

Nuedling S, Eickels MV, Alléra A, et al. 17 β -estradiol regulates the expression of endothelin receptor type B in the heart. *Br J Pharmacol.* 2003;140(1):195-201.

Otero UB, Chor D, Carvalho MS, et al. Lack of association between age at menarche and age at menopause: Pró Saúde Study, Rio de Janeiro, Brazil. *Maturitas.* 2010;67(3):245-250.

Pamidimukkala J, Taylor JA, Welshons WV, et al. Estrogen modulation of baroreflex function in conscious mice. *Am J Physiol Regul Integr Com Physiol.* 2003;284(4):R983-9.

Patten RD, Pourati I, Aronovitz M, et al. 17-beta-estradiol reduces cardiomyocyte apoptosis in vivo and in vitro via activation of phospho-inositide-3 kinase/ Akt signaling. *Circ Res.* 2004;95(7):692-699.

Pelletier G, Labrie C, Martel C, et al. Chronic administration of dehydroepiandrosterone (DHEA) to female monkey and rat has effect on mammary gland histology. *Journal of Steroid Biochem Mol Biol.* 2008;108(1-2):102-108.

Pedro AO, Neto AMP, Paiva LHSC, et al. Idade de ocorrência da menopausa natural em mulheres brasileiras: resultados de um inquérito populacional domiciliar. *Cad Saúde Pública.* 2003;19(1):17-25.

Poehlman ET, Tchernof A. Transversing the menopause: changes in energy expenditure and body composition. *Coron Artery Dis.* 1998;9:799-803.

Posner BM, Cuppler LA, Miller DR, et al. Diet, menopause, and serum cholesterol levels in woman: the framingham study. *Am Heart J.* 1993;125(2Pt1):483-489.

Raven PW, Hinson JP. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and the menopause: an update. *Menopause Int.* 2007;13(2):75-78.

Reckelhoff JF, Fortepiani LA. Novel Mechanisms Responsible for Postmenopausal Hypertension. *Hypertension.* 2004;43(5):918-923.

Roger VL, et al. Heart disease and stroke statistics 2011 update. *Circulation.* 2011;123(4):e18-e209.

Saito T, Tojo K, Furuta N, et al. Feminizing adrenocortical carcinoma with selective suppression of follicle-stimulating hormone secretion and disorganized

steroidogenesis: a case report and literature review. *Intern Med.* 2011;50:1419-14-24.

Sato K, Motoyuki I, Katsuji A, et al. Increased muscular dehydroepiandrosterone levels are associated with improved hyperglycemia in obese rats. *Am J Endocrinol Metab.* 2011;301:E274-E280.

Shiojima I, Yefremeshwile M, Luo Z, et al. Akt signaling mediate postnatal heart growth in response to insulin and nutritional status. *J Biol Chem.* 2002;277(40):37670-7.

Staessen J, Bulpitt CJ, Fagard R, et al. The influence of menopause on blood pressure. *J. Hum. Hypertension*, 1989;6:427–433.

Stubbins RE, Holcomb VB, Hong J, et al. Estrogen modulates abdominal adiposity and protects female mice from obesity and impaired glucose tolerance. *Eur J Nutr.* 2011.

Sun H, Zang W, Zhou B, et al. DHEA suppresses longitudinal bone growth by acting directly at growth plate through estrogen receptor. *Endocrinology*, 2011;152(4):1423-1433.

Symington T, Duguid WP, Davidson JN. Effect of exogenous corticotropin on the histochemical pattern of the human adrenal cortex and a comparison with the changes during stress. *J Clin Endocrinol Metab.* 1956;16(5):580-598.

Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signaling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(32):85-96.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology*, 1992;24:145-149.

Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TC. Skeletal effects of estrogen. *Endocrinol Rev.* 1994;15(3):275-300.

Uwaifo GI, Ratner RE. The roles of insulin resistance, hyperinsulinemia, and thiazolidinediones in cardiovascular disease. *Am J Med.* 2003;115(8A):12S-19S.

Van Der Eerden BCJ, Gevers EF, Löwik CWGM, et al. Expression of estrogen receptor alpha and beta in the epiphyseal plate of the rat. *Bone*, 2002;30(3):478-485.

Villareal DT, Holloszy JO. Effect of DHEA on abdominal fat and insulin action in elderly women and men: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2004;292(18):2243-2248.

Wang L, Wang YD, Wang WJ, et al. Differential regulation of dehydroepiandrosterone and estrogen on bone and uterus in ovariectomized mice. *Osteoporos Int.* 2009;20(1):79-92.

Wenger NK. Hypertension and other cardiovascular risk factor in woman. *Am J Hypertension*, 1995;8(12Pt2):945-985.

World Health Organization. Life course perspectives on coronary heart disease, stroke and diabetes. Geneva;2002.

World Health Organization. Prevention of cardiovascular disease. Geneva;2007.

Xu Y, Arenas IA, Armstrong SJ, et al. Estrogen modulation of left ventricular remodeling in the aged heart. *Cardiovasc Res.* 2003;57(2):388-394.

Yen TT, Allan JA, Pearson DV, Acton JM, Greenberg MM. Prevention of obesity in A^{vy/a} mice by dehydroepiandrosterone. *Lipids*, 1977;12(5):409-413.

Yorek MA, Coppey LJ, Gellett JS, Davidson EP, Bing X, Lund DD et al. Effect of treatment of diabetic rats with dehydroepiandrosterone on vascular and neural function. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;283(5):E1067-E1075.

Yusuf S, Hawken S, Ôuunpu S, Dans T, Avesun A, Lanas F. et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 counties (INTERHEART study): case control study. *Lancet*, 2004;364(9438):937-52.

Zornoff LAM, Paiva SAR, Minicucci MF, et al. Infarto do miocárdio experimental em ratos: análise do modelo. *Arq Bras Cardiol*. 2009;93(3):434-440.