Thúlio Ramos de Andrade

**Impacto da insuficiência cardíaca nos hormônios sexuais em ratas
com e sem ooforectomia**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Maria Janieire de Nazaré
Nunes Alves

São Paulo

2016

Thúlio Ramos de Andrade	Impacto da insuficiência cardíaca nos hormônios sexuais em ratas com e sem ooforectomia.	Mestrado FMUSP 2016
------------------------------------	--	---------------------------

Thúlio Ramos de Andrade

**Impacto da insuficiência cardíaca nos hormônios sexuais em ratas
com e sem ooforectomia**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Maria Janieire de Nazaré
Nunes Alves

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Andrade, Thúlio Ramos de

Impacto da insuficiência cardíaca nos hormônios sexuais em ratas com e sem
ooforectomia / Thúlio Ramos de Andrade. -- São Paulo, 2016.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Maria Janieire de Nazaré Nunes Alves

Descritores: 1.Insuficiência cardíaca 2.Caquexia 3.Hormônios esteroides gonadais
4.Infarto do miocárdio 5.Menopausa 6.Ovariectomia 7.Ratos Sprague-Dawley
8.Feminino

USP/FM/DBD-233/16

Agradecimentos

A Deus, por ter me concedido essa oportunidade, ter me dado a saúde, fé e força que me mantiveram nesses anos do mestrado, e por ser incomparável. Sinto que Seu coração se alegra quando O chamo assim.

Aos animais de laboratório que, assim como eu, são parte da criação divina, dignos do meu profundo respeito e gratidão.

À minha orientadora Profa. **Dra. Maria Janieire** de Nazaré Nunes Alves, por ter me oferecido essa oportunidade, pela sugestão do tema, incentivo e orientação, além de ser minha médica.

À Profa. **Dra. Silvia** Lacchini, por ter sido a segunda orientadora desse trabalho, com certeza peça fundamental nessa realização e uma grande incentivadora e professora. Obrigado pela paciência e influência nos momentos mais difíceis e também por ter proporcionado os mais alegres e divertidos.

À Profa. **Dra. Patrícia Chacur Brum** e também a Profa. **Dra. Maria Claudia Irigoyen**, por terem aberto as portas dos seus respectivos laboratórios para que eu pudesse aprender e realizar boa parte do meu estudo.

Aos amigos da Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício do InCor, por todo apoio e suporte.

Aos colegas do grupo da **Dra. Maria Janieire: Ana, Marcelo, Rafael, Kelly, Francis, Guilherme e Renato.**

Aos demais colegas do aquário: **Edgar, Larissa, Raphaela, Lígia, Igor, Thaís Nobre, Patrícia Trevisan, Denise, Felipe, Jefferson, Sara, Adriana, Renan e Thiago Goya.**

Aos funcionários (as): **Sr. Walter** e **Sr. Gerson** da seção de veículos; à **Sandrinha, Mônica, Rosangela, Fabi e Elaine.**

Aos professores de educação física e toda a equipe multidisciplinar, em especial à **Camila Jordão** pela realização dos ecocardiogramas.

Aos amigos do Laboratório de Hipertensão Experimental do InCor, especialmente aos amigos **Leandro, Paula, Sr. Edson, Pamela e Oscar.**

Ao pessoal do Biotério do InCor: **Dra. Edna, Vicente, Dário, Pedro** e os demais que tanto ajudaram.

Aos amigos do Laboratório da EEFE, as queridas técnicas **Úrsula** (amiga e ajudadora nos experimentos), **Marcele, Glória e Katt**, pelos ensinamentos científicos e que ultrapassam o ambiente acadêmico.

À Profa. **Dra. Edilamar Menezes** e seus alunos **Thiago, Fernanda e Úrsula Soci.**

Ao Prof. Dr. **Paulo Ramires** e à **Fátima**, companheira de consumo de O₂.

Ao **Ney**, do biotério da EEFE, e aos colegas **Telma, Aline, Bechara, Cris.**

Aos amigos do laboratório de Morfologia Funcional Aplicada à Cardiologia do ICB: **Cíntia, Juliane** e às **Tatis (Tati 1, Tati 2 e Tati 3)**, pois cada uma contribuiu de forma importante em cada uma das fases deste estudo, **Jéssica, Luís, Patrick, Mônica, Nathália, Adriano, Lucas, Thaís**. Minhas “ICs” **Carolina e Viviane**.

Agradeço a todos os integrantes da equipe do socioeducativo do SESC Jundiaí, pela compreensão e companheirismo nos momentos de elaboração deste trabalho.

Ao meu amigo **Flávio Altoé**, e seus irmãos **Gustavo e Raquel** que colaboraram com a tradução e revisão de alguns trabalhos, além da verdadeira amizade e tudo que esta pode proporcionar.

A minha querida família: minha mãe **Dalva** por todo apoio, paciência e dedicação. Ao meu pai **Leonel**, minha irmã **Thaís**, meu irmão **Thiago**, meu cunhado **Junior** e minha cunhada **Camila**, minhas sobrinhas **Manuella** (por suas contribuições quanto à “história das ratinhas”) **Victoria e Catarina** por toda alegria e esperança que me trazem. Agradeço à minha avó **Reny** e às minhas tias **Rosa, Marisa e Sandra** pela influência e apoio constante à minha formação. Às demais tias e avó **Therezinha** pelo incentivo e suporte espiritual nessa jornada.

À minha noiva **Ana Paula** por ter acompanhado quase todos os momentos dessa etapa, sem nunca hesitar. Ela sempre teve uma palavra de incentivo, sempre esteve presente e disposta a ajudar, certa do meu sucesso. Você é uma grande incentivadora e companheira, por isso logo estaremos casados! Obrigado por tudo!

Epígrafe

“Quando a educação não é libertadora, o sonho do oprimido é ser o opressor.”

Paulo Freire

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	i
LISTA DE SIMBOLOS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Insuficiência Cardíaca e seus efeitos sobre alterações cardiovasculares e musculoesqueléticas	2
1.2. Menopausa e seus efeitos sobre alterações cardiovasculares e musculoesqueléticas	4
1.3. Infarto do Miocárdio como método para o desenvolvimento da IC	7
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1. Animais	12
3.2. Grupos Experimentais	12
3.3. Delineamento Experimental	13
3.4. Procedimento Cirurgico da Ooforectomia (OVX)	15
3.5. Avaliação do ciclo estral e procedimento para coleta de sangue	15
3.6. Procedimento cirúrgico do Infarto do Miocárdio (IM) e cirurgia fictícia (SHAM)	20
3.7. Ecocardiograma	21
3.8. Avaliação da capacidade física	22
3.9. Registro indireto da pressão arterial sistólica e frequência cardíaca	23
3.10 Eutanásia e coleta de tecidos	24
3.11 Avaliações morfométricas	25

3.12	Preparações histológicas.....	26
3.12.1	Colorações histológicas.....	27
3.12.2	Determinação da área infartada.....	27
3.12.3	Densidade capilar e área de secção transversa das fibras do músculo sóleo	27
3.12.4	Espessura das diferentes zonas do córtex adrenal, medidas de área da medula e área total da glândula adrenal	28
3.13	Determinação das concentrações dos hormônios sexuais.....	30
3.14	Análise estatística.....	30
4.	RESULTADOS	33
4.1	Caracterização da OVX.....	34
4.1.1	Peso dos úteros.....	34
4.1.2	Peso corporal dos animais.....	35
4.1.3	A glândula adrenal como um importante órgão endócrino.....	36
4.2	Caracterização da IC.....	38
4.2.1	Características hemodinâmicas e avaliação da capacidade física.....	38
4.2.2	Ecocardiograma.....	39
4.2.3	Peso dos VEs.....	43
4.2.4	Determinação da área infartada.....	45
4.3	Caracterização da CC.....	47
4.3.1	Densidade capilar e área de secção transversa das fibras do músculo sóleo	47
5.	DISCUSSÃO	50
5.1.	Caracterização da OVX.....	50
5.2	A glândula adrenal como um importante órgão endócrino.....	53
5.3	Caracterização da IC.....	56
5.4	Caracterização da CC.....	62
6.	CONSLUSÕES	64

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
8. ANEXOS.....	71
8.1 Anexo 1 – Tabela com o peso corporal dos diferentes tecidos normalizados pela tíbia e pelo peso corporal dos animais	71

LISTA DE ABREVIATURAS

IC: Insuficiência Cardíaca

CC: Caquexia Cardíaca

AromKO: Aromatase Knockout

LDH: Lactato Desidrogenase

CAMKII: Calmodulina Quinase II

Hsp7: Heat Shock Protein 7

Ca²⁺: Íon Cálcio

K_{ATP}: Canalde Potássio ATPse

TT: Testosterona Total

TL: Testosterona Livre

IM: Infarto do Miocárdio

RE: Receptores de Estrógeno

LH: Hormônio Luteinizante

FSH: Hormônio Folículos Estimulante

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

ICB: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

INT: Ratas Intactas

SHAM: Cirurgia Fictícia para o Infarto do Miocárdio

OVX: Ooforectomia

PC: Peso Corporal

VE: Ventrículo Esquerdo

DDVE: Diâmetro Diastólico do Ventrículo Esquerdo

DSVE: Diâmetro Sistólico do Ventrículo Esquerdo

FS: Fração de Encurtamento

FE: Fração de Ejeção

NaCl: Cloreto de Sódio

ELISA: Enzyme-linked immuno sorbent assay

KCl: Cloreto de Potássio

M: Molar

EEFE: Escola de Educação Física e Esporte

USP: Universidade de São Paulo

VO₂: Volume de Oxigênio

IVO₂: Intensidade do VO₂

TRIV: Tempo de Relaxamento Isovolumétrico

TCIV: Tempo de Contração Isovolumétrica

IDM: Índice de Desempenho Miocárdico

H-E: Hematoxilina-eosina

APS: Ácido Periódico de Schiff

PD₂: Pressão Diastólica 2

LISTA DE SÍMBOLOS

%: porcentagem

>: maior

<: menor

$\leq$: menor ou igual

kg: quilogramas

mg: miligramas

ml: mililitros

RPM: rotações por minuto

°C: graus Celsius

μ l: microlitros

m: metro

cm: centímetros

mm: milímetros

μ m: micrômetros

x: multiplicação (vezes)

$\pm$: mais ou menos

P: intervalo de confiança

min: minuto

s: segundo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática dos procedimentos experimentais.....	13
Figura 2. Oscilações hormonais ao longo das fases do ciclo estral.....	16
Figura 3. Fotomicrografia do esfregaço vaginal de uma rata do grupo.....	18
Figura 4. Fotomicrografia de quatro dias consecutivos, rata OVX.....	19
Figura 5. Esquema representativo do método e protocolo escalonado de exercício.....	23
Figura 6. Representação do programa de análise de dados de pressão e FC.....	24
Figura 7. Esquema de procedimentos histológicos e análises microscópicas.....	26
Figura 8. Fotomicrografias exemplificando medidas da glândula adrenal.....	29
Figura 9. Peso dos úteros.....	34
Figura 10. Oscilações do peso corporal.....	35
Figura 11. Medida da Fração de Ejeção dos animais dos diferentes grupos.....	39
Figura 12. Medida da Fração de Encurtamento dos animais dos diferentes grupos.....	40
Figura 13. Medida histológica do percentual da área cardíaca acometida pelo IM.....	45
Figura 14. Medida histológica da espessura do septo dos animais dos diferentes grupos...	46
Figura 15. Imagens representativas de cortes de coração.....	46
Figura 16. Medida histológica da razão capilar-fibra.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis morfométricas e histológicas da glândula adrenal.....	37
Tabela 2. Características hemodinâmicas e da avaliação funcional dos animais 12 semanas após o IM	38
Tabela 3. Variáveis ecocardiográficas oito semanas após o IM ou SHAM.....	42
Tabela 4. Pesos absoluto e relativo do VEs.....	44

RESUMO

Andrade TR. *Impacto da insuficiência cardíaca nos hormônios sexuais de ratas com e sem ooforectomia* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

INTRODUÇÃO: A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome sistêmica, cuja uma das possíveis evoluções se caracteriza pela perda de massa magra e intolerância aos esforços, quadro conhecido como caquexia cardíaca (CC). Estudos realizados usando homens e ratos demonstram que na associação da IC com hipogonadismo há um pior quadro clínico e desenvolvimento de CC, levando a um mal prognóstico e aumento da mortalidade. Para o sexo feminino, tanto no período pré ou pós-menopausa, não é conhecida a associação de possível deficiência de hormônios sexuais, tampouco seu impacto no prognóstico, mortalidade e desenvolvimento de CC em pacientes com IC. Os objetivos deste estudo foram: 1) Avaliar o efeito da IC sobre o possível desenvolvimento de CC em ratas. 2) Avaliar o efeito da IC sobre a produção de hormônios sexuais: Testosterona total, estradiol, FSH.

MÉTODOS: Ratas da linhagem *Sprague Dawley*, com 60 dias de vida, foram divididas de acordo com os procedimentos cirúrgicos: Ratas intactas (INT) ou com ooforectomia (OVX), ratas com cirurgia fictícia (SHAM) do infarto do miocárdio (IM) ou cirurgia IM. A combinação destes procedimentos originou quatro grupos experimentais: INT+SHAM, INT+IM, OVX+SHAM e OVX+IM. Trinta dias após a OVX, amostras de sangue foram coletadas, para a dosagem hormonal e os animais foram submetidos à cirurgia de indução ao IM ou SHAM. Após oito semanas, as ratas passaram pela avaliação ecocardiográfica. A partir desta, estabeleceu-se um corte de Fração de Ejeção (FE) $\leq 50\%$ para definir o desenvolvimento de disfunção cardíaca a partir da realização do IM, constituindo dessa forma, os grupos INT+IM e OVX+IM. Com quatro semanas adicionais (totalizando 12 semanas após a indução do IM), houve a consolidação do quadro crônico de IC; então as ratas foram submetidas à avaliação hemodinâmica, da capacidade funcional e a nova coleta de sangue para dosagem hormonal. Após a eutanásia, os tecidos foram coletados para as análises morfológicas e histológicas.

RESULTADOS: As ratas dos grupos OVX (OVX+SHAM e OVX+IM) não apresentaram ciclos ovarianos, demonstraram hipertrofia dos úteros e aumento do peso corporal final quando comparadas aos grupos INT (INT+SHAM e INT+IM), além de alterações na morfologia das glândulas adrenais – caracterizando o quadro de privação de hormônios ovarianos. As ratas dos grupos IM (INT+IM e OVX+IM) não tiveram alterações hemodinâmicas, contudo demonstraram reduzida capacidade funcional e piora nas variáveis ecocardiográficas (FE, FS, DSVE, TCIV) quando comparadas aos grupos SHAM (INT+SHAM e OVX+SHAM); as avaliações histológicas apontam valores de área infartada entorno de 40% e hipertrofia de septo nos grupos IM. Os animais não caracterizaram quadro de CC - caracterizada por diminuição do peso corporal, diminuição da densidade capilar na musculatura e atrofia das fibras musculares (m. sóleo) - após 12 semanas de disfunção cardíaca.

Descritores: 1. Insuficiência Cardíaca 2. Caquexia 3. Hormônios Esteróides Gonadais 4. Infarto do Miocárdio 5. Menopausa 6. Ovariectomia 7. Ratos Sprague-Dawley 8. Feminino

ABSTRACT

Andrade TR. *Impact of heart failure in sex hormones in female rats with and without ovariectomy* [dissertation]. Sao Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016.

Introduction: Heart failure (HF) is a systemic disease, which one of the possible progress is characterized by lean mass loss and intolerance to efforts, this framework is known as cardiac cachexia (CC). Studies in men and rats have shown that when HF is associated with hypogonadism it has a worse clinical condition and CC evolution, leading to a poor prognosis and increased mortality. For females, both in the pre menopause period than in the post menopause it is not known how the association of sex hormones deficiency with HF can impact the prognosis and mortality of female patients, as well as the development of CC. The objectives of this study were: 1) Evaluate the effect of HF on the possible CC development in female rats. 2) Evaluate the effect of HF on the production of sex hormones: Total testosterone, estradiol, FSH.

METHODS: Female rats (*Sprague Dawley* strain, 60 days old) were divided according to the surgical procedures: intact rats (INT) or ovariectomy (OVX) rats with sham surgery (SHAM) of myocardial infarction (MI) or MI surgery. The combination of these procedures led to four groups: INT + SHAM, INT + MI, OVX + SHAM and OVX + MI. 30 days after OVX, blood samples were collected for hormone dosage and the animals have been underwent to surgery to the MI induction or SHAM. After eight weeks, the rats have gone through echocardiographic evaluation. From this procedure, it was established a cutting Ejection Fraction (EF) $\leq 50\%$ to define the development of cardiac dysfunction from the realization of MI, constituting INT + IM and IM + OVX groups. With four additional weeks (totaling 12 weeks after MI induction), there was the consolidation of HF's chronic condition; female rats were subjected to evaluation of functional and hemodynamic capacity and a new blood collection for hormonal dosage. After euthanasia, tissues were collected for morphological and histological analyzes.

RESULTS: The rats of the OVX groups (OVX + SHAM and OVX + MI) showed no ovarian cycles, demonstrated uterus' hypertrophy and an increase in final body weight when compared to INT groups (INT + SHAM and INT + MI), changes in morphology of the adrenal glands – evidencing the situation of ovarian hormones deprivation. The rats of the MI group (INT + MI and OVX + MI) had no hemodynamic changes, but showed reduced functional capacity and deterioration of echocardiographic variables (EF, FS, LVSD, IVCT) when compared to SHAM groups (INT + SHAM and OVX + SHAM); the histological evaluations indicate infarcted area values around 40% and septal hypertrophy at MI groups. The animals did not characterize CC - characterized by decreased body weight, decreased capillary density in the muscle and muscle fiber atrophy (m. soleus) - even after 12 weeks of cardiac dysfunction.

Descriptors: 1. Heart Failure 2. Cachexia 3. Gonadal Steroid Hormones 4. Myocardial Infarction 5. Menopause 6. Ovariectomy 7. Rats, Sprague-Dawley 8. Female

1 - INTRODUÇÃO

A Insuficiência Cardíaca (IC) é considerada um importante problema de saúde pública, sendo que além de sua prevalência alarmante, observa-se a elevada mortalidade e morbidade frente aos avanços da terapêutica atual. Um recente estudo (ALBUQUERQUE et al., 2015) mostrou que 60% da amostra acometida por IC foi composta por mulheres, e que 30,1% desses pacientes desenvolveram IC por etiologia isquêmica, sendo que 26,6% haviam sofrido Infarto do Miocárdio (IM) prévio. (ALBUQUERQUE et al., 2015)

Em mulheres, tem sido evidenciada uma incidência discretamente menor de morte devido à IC do que em homens; no entanto, há maior probabilidade da duração dos sintomas e morbidade da doença cardíaca (O'MEARA et al., 2007). Em condições fisiológicas, as mulheres apresentam níveis de hormônios anabólicos (testosterona) menores que homens, caracterizado pelo menor desenvolvimento de massa muscular. Dessa forma, é possível que na presença de insuficiência cardíaca esses níveis hormonais de testosterona reduzam pronunciadamente, repercutindo em antecipação da caquexia cardíaca e evolução da doença.

Pacientes com IC frequentemente evoluem com perda de peso associada à redução da massa muscular esquelética, repercutindo em diminuição da força e da capacidade oxidativa por mudanças estruturais nas fibras musculares e atrofia das mesmas. Cabe ressaltar que este quadro de atrofia muscular esquelética é decorrente de uma incapacidade do coração com disfunção de perfundir adequadamente os tecidos, sendo esse quadro conhecido como Caquexia Cardíaca (CC) (ANKER et al., 1997), a qual piora o prognóstico da IC. É consenso na literatura que homens com IC que apresentam diminuição dos níveis de testosterona e outros hormônios anabólicos apresentam mais CC e, conseqüentemente, pior prognóstico em relação a indivíduos com IC e níveis normais destes hormônios (JANKOWSKA et al., 2006). Em modelos animais, quando uma alteração cardíaca é produzida experimentalmente em fêmeas, estas tem melhor prognóstico do que nos machos (PAVÓN et al., 2012).

1.1- Insuficiência cardíaca e seus efeitos sobre alterações cardiovasculares e musculoesqueléticas

Mesmo sendo uma síndrome de origem cardiovascular, a IC tem repercussões em órgãos e tecidos, incluindo a redução da perfusão da musculatura esquelética. Estudos recentes demonstram a importância dessas afecções musculoesqueléticas para o diagnóstico e prognóstico da IC, dada a sua elevada correlação com a capacidade funcional dos pacientes (CUNHA et al., 2012; ANKER et al., 1997).

São muitos os prejuízos de ordem morfofuncional e metabólica decorrentes da IC no músculo esquelético, tais como: diminuição das fibras do tipo I (predominantemente oxidativas e por isso mais tolerantes a esforços) com substituição por fibras do tipo II-B (predominantemente glicolíticas e de rápida fadiga), atrofia e maior apoptose dos miócitos, que na presença de IC está presente em 50% dos pacientes (VESCOVO et al., 1998). Outras modificações incluem a diminuição da densidade capilar, redução da densidade mitocondrial e redução da atividade de enzimas oxidativas, entre elas a citocromo oxidase (SINOWAY; LI, 2005). Esse processo gera um quadro de perda de massa magra e intolerância a esforços, e com isso um quadro denominado Caquexia Cardíaca (CC), piorando a classe funcional da IC.

Por outro lado, o metabolismo celular do músculo esquelético depende de vias mediadas por hormônios sexuais, que em condições normais são inibidos para manter a integridade da síntese proteica (inibição da miostatina) (RODINO-KLAPAC et al., 2009). Na presença de IC ocorre a ativação de receptores para captação de miostatina, promovendo uma redução da síntese proteica e afetando diretamente o desenvolvimento da CC, principalmente às custas da redução dos níveis de testosterona (miostatina) (KOVACHEVA et al., 2010). A deficiência de testosterona está envolvida na fisiopatologia da IC, contribuindo para o agravamento dos fatores oriundos da mesma, tais como a redução da massa muscular, o

desbalanço energético, fadiga, dispneia, e por fim a caquexia (VOLTERRANI; ROSANO; IELLAMO, 2012).

Os níveis reduzidos de hormônios anabólicos podem ser considerados preditores de mal prognóstico em pacientes com IC, estando isso já bem demonstrado em homens e modelos experimentais. Estudos em ratos demonstram que a castração reduziu a recuperação funcional e tecidual após o insulto isquêmico (HUANG et al., 2010; NAM et al., 2007) e a suplementação de testosterona foi suficiente para reverter o quadro de atrofia muscular, tanto em machos castrados quanto em fêmeas ooforectomizadas, melhorando a viabilidade miocárdica de forma semelhante ao observado com a suplementação de estradiol (LIU et al., 2012). Fêmeas de camundongos *knockout* para o gene da aromatase (AromKO: com diminuição do estrógeno e aumento de testosterona) tiveram melhor recuperação após isquemia relacionada à redução da lesão oncótica/necrótica gerada pelas concentrações miocárdicas de lactato desidrogenase (LDH) (BELL et al., 2012). Essas alterações funcionais e estruturais relacionadas aos níveis de testosterona ainda não foram descritas na sua totalidade, mas parecem estar relacionadas com o aumento da atividade CalmodulinaQuinase II (CAMKII) que aumenta o clearance diastólico de Ca^{2+} (BELL et al., 2012), diminuição do tamanho do infarto (ISHIHARA et al., 2009; JAZBUTYTE et al., 2012), sinalização de intermediários da CAMKII através da Hsp7 (Heart ShockProtein) (LIU; TSANG; WONG, 2006) e ativação dos canais mitocondriais de K_{ATP} (ER et al., 2004). Em contrapartida, outros estudos demonstram que a presença de testosterona levou a maiores alterações cardiovasculares (FC e PA) em machos submetidos a um modelo de isquemia e reperfusão e menores alterações desses parâmetros nas fêmeas, o que sugere um efeito prejudicial da testosterona frente a efeitos benéficos do estrógeno no coração (PAVÓN et al., 2012). Porém, a presença de deficiência desses hormônios em mulheres e em ratas, bem como a sua repercussão na evolução da IC, ainda precisa ser melhor compreendida. Outro ponto diz

respeito ao estrógeno, já que esse tem uma função vascular, mediada pelo endotélio, importante na manutenção da vasodilatação em condições basais. É possível especular que ocorra redução adicional dos níveis de estrógeno levando à redução do hormônio anabólico (testosterona) ou vice-versa, desencadeando uma pior caquexia em relação aos indivíduos do sexo masculino, o que explicaria o maior agravamento da IC para o mesmo *status* de função cardíaca (ANKER; CAMINITI; VOLTERRANI, 2011). Estudos elucidam a questão do estrógeno como um potente hormônio cardioprotetor e sua ligação com demais eixos que influenciam o sistema cardiovascular (IRIGOYEN et al., 2005).

Alguns autores têm demonstrado efeitos divergentes do estrógeno e da testosterona, enquanto o primeiro induz a diminuição dos níveis citocinas inflamatórias (IL1 β , IL6, TNF α), da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e da sobrecarga de Ca²⁺, a testosterona estaria provocando um aumento desses fatores, levando a um aumento da apoptose pela sua capacidade de induzir disfunção mitocondrial, frente a um insulto isquêmico (PAVÓN et al., 2012).

Contudo, os efeitos da privação de hormônios androgênicos tais como: Testosterona Total (TT), Testosterona Livre (TL) e SHBG, sobre as vias de síntese e degradação proteica da musculatura esquelética e sua influência na sobrevida em ratas (sexo feminino) com IC, se fazem necessários para o entendimento dessa problemática.

1.2.- Menopausa e seus efeitos sobre alterações cardiovasculares e musculoesqueléticas

É consenso na literatura científica, tanto clínica quanto experimental, que há diferenças na prevalência, no desenvolvimento e na evolução da doença isquêmica entre o sexo feminino e masculino. Também é fato que o percentual de mulheres pré-menopausa que enfartam é menor que homens da mesma idade; e que com o advento da menopausa essa

porcentagem se iguala, o que indica uma ação direta dos hormônios ovarianos, em especial o estrógeno.

Em mulheres, também há maior propensão de desenvolvimento da IC após o Infarto do Miocárdio (IM) (TOFLER et al., 1987). Dessa forma, a prevalência e a severidade dos sintomas de IC parecem ser maiores nas mulheres, tanto em quantidade quanto em qualidade dos sintomas e sinais da IC (JOHNSTONE et al., 1992). Evidências apontam para o maior tempo de internação e maiores gastos com sistemas de saúde em mulheres comparados com os homens com IC (MCMURRAY et al., 1993).

A menopausa está associada à diversas características deletérias como a diminuição da capacidade funcional aeróbia, da força muscular e da densidade mineral óssea que leva ao aumento da prevalência de osteoporose, redução da taxa metabólica basal retratada pelo aumento do peso corporal, e desencadeamento de diabetes mellito do tipo 2, bem como elevação do risco cardiovascular (IRIGOYEN et al., 2005). A baixa prevalência de coronariopatias em mulheres antes da menopausa e o aumento dessa prevalência em mulheres após a menopausa pode ser correlacionado ao efeito cardioprotetor do estrógeno na prevenção cardiovascular (GROSS et al., 2005; POCHMANN et al., 2004; (IRIGOYEN et al., 2005).

A partir de modelos de isquemia/reperfusão, demonstrou-se diversas alterações nas ratas que estavam sob privação dos hormônios ovarianos, principalmente no período de reperfusão. Após o insulto isquêmico, os parâmetros do eletrocardiograma (ECG) e pressão arterial (PA) de ratos machos castrados e fêmeas intactas voltaram ao normal, enquanto o dos machos intactos e das fêmeas ooforectomizadas mantiveram-se em padrão de taquiarritmia e hipotensão, ou seja, as fêmeas ooforectomizadas perderam a proteção cardiovascular conferida ao estrógeno, e a melhora dos parâmetros nos machos castrados evidenciam o efeito oposto da testosterona (PAVÓN et al., 2012).

Além desse efeito, o estrógeno exerce uma ação fundamental na função vascular endotelial, enquanto a sua privação leva ao aumento do estresse oxidativo (IRIGOYEN et al., 2005), ao aumento da agregação plaquetária (POCHMANN et al., 2004) e da fibrinólise (GROSS et al., 2005), além de modificar o perfil lipídico. Outros estudos têm demonstrado a relação do estrógeno nas vias de sinalização do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Estudos com modelos experimentais demonstram que a angiotensina II aumenta os níveis de aldosterona sob influência direta do nível desse hormônio (ROESCH et al., 2000), sendo maior nos ratos machos intactos e nas fêmeas ooforectomizadas. As alterações observadas nesses estudos sugerem que o aumento do risco cardiovascular nessas condições se deve em parte à ativação indireta do sistema nervoso simpático, resultando em vasoconstrição vascular periférica e elevação da pressão arterial (BRANDÃO RONDON et al., 2002). Além disso, pode ocorrer aumento das vias de formação de endotelinas, como também elevar a sobrecarga de Ca^{2+} celular (GROSS et al., 2005).

Por outro lado, evidências experimentais sugerem que o estrógeno influencia diretamente a ação do íon Ca^{2+} nos miócitos. Essa ação parece estar ligada à modulação do estrógeno para a contração cardíaca, que depende da sensibilidade dos miofilamentos à presença do Ca^{2+} (WATTANAPERMPHOL, 1998). Assim sendo, os cardiomiócitos femininos são ativados com níveis menores de Ca^{2+} do que no sexo masculino, ou seja, estão sob condições pró-inotrópicas e, portanto, garantem melhor performance miocárdica (CURL; WENDT; KOTSANAS, 2001).

Os hormônios ovarianos (estradiol e progesterona) também influenciam o crescimento cardíaco e regulam a síntese de proteínas cardíacas por meio de efeito direto sobre os cardiomiócitos ou indiretamente por outras vias de sinalização. Conforme citado acima, também foi observado a presença de receptores de estrógeno (RE) e de receptores de progesterona no coração e vasos periféricos de inúmeros mamíferos adultos, sobretudo em

machos. A eficácia desses hormônios foi, dessa forma, demonstrada como contra-reguladora de diversas atividades fisiológicas que podem influenciar na proliferação celular - hiperplasia e hipertrofia do miócito - bem como modular a função cardíaca (GOLDSTEIN; SITES; TOTH, 2004).

1.3. - Infarto do Miocárdio como método para o desenvolvimento da IC

O IM é a principal etiologia para o desenvolvimento de IC (HE et al., 2001). A queda da pressão de perfusão em órgãos e tecidos em longo prazo desencadeia alterações neuro-vasculares (BRANDÃO RONDON et al., 2002), hormonais (BENEDICT, 1994) e disfunção ventricular aguda e crônica (MARTINEZ et al., 2011). A disfunção cardíaca induzida pelo IM pode ter repercussões sistêmicas abruptas com impacto em outros órgãos e tecidos, tais como os pulmões, fígado, rins e musculatura esquelética (CUNHA et al., 2012).

Uma das estratégias mais utilizadas para o estudo das alterações fisiopatológicas da disfunção ventricular grave, provocadas principalmente pela oclusão coronariana, é o uso do modelo de infarto miocárdico experimental em animais (ZORNOFF et al., 2009). O motivo que justifica essa técnica ser amplamente aplicada é o fato da similaridade com a principal causa de desenvolvimento de insuficiência cardíaca em humanos, em particular, no sexo feminino após a menopausa. No modelo experimental, a evolução do infarto do miocárdio a partir da inflamação, necrose, cicatrização, até alcançar a remodelação ventricular pós-infarto se dá de forma precoce na vida do animal, com a possibilidade do controle observacional, levando em consideração que a vida média desses animais é reduzida em aproximadamente 18 a 24 meses (ADAMI ANDREOLLO et al., 2012).

As alterações hemodinâmicas e funcionais cardíacas ocasionadas pelo IM em ratos são bem descritas na literatura científica e foram demonstradas pela diminuição do volume sistólico, débito cardíaco, pressão sistólica do ventrículo esquerdo, aumento da pressão

diastólica final do ventrículo esquerdo e declínio da pressão isovolumétrica dependente das áreas de infarto (GOLDMAN; RAYA, 1995; RAYA et al., 1988; FLETCHER et al., 1981).

Uma das características inerentes a esse modelo são as alterações funcionais que guardam estreita relação com a área do coração afetada pelo infarto. Os animais com infartos classificados como grandes (área de necrose >46 % da massa cardíaca) desenvolvem IC, com elevadas pressões de enchimento e redução do débito cardíaco (PFEFFER et al., 1979). Em estudos em ratos que foram submetidos a infartos miocárdicos de tamanho moderado a grande, observa-se uma maior prevalência de sinais clínicos com a presença de alterações anátomo-patológicas significativas de IC, tais como: taquipnéia (46%), congestão hepática (21%), trombo em átrio esquerdo (21%), ascite (25%), derrame pleuro-pericárdico (71%) e presença de hipertrofia do ventrículo direito (100%) (MARTINEZ, PF; ZORNOFF, LAM; CAMPOS, DHF; OLIVEIRA JR, AS; DAMATO, RL; COSUEN, 2007).

A literatura científica demonstra que há diferença na evolução do infarto entre os gêneros tanto para ratos, quanto para camundongos, no entanto, algumas divergências apontam para a carência de estudos sobre o tema, principalmente pela necessidade de padronização do tamanho da área infartada, suficiente para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca. Em resposta ao IM, ratos machos e fêmeas que tiveram área infartada semelhante não tiveram diferenças quanto à função contrátil por até seis semanas após a realização do procedimento. Em contrapartida, os machos apresentaram restrição no enchimento ventricular e aumento da hipertrofia do ventrículo esquerdo (LITWIN et al., 1999), enquanto o estudo de Chen, (2011) (CHEN et al., 2011) demonstrou que quatro semanas após o IM as ratas apresentaram maior dilatação dos ventrículos do que os machos.

Ainda sobre a padronização do tamanho da área infartada, existem diversos métodos de avaliação do tamanho da área lesionada de acordo com o procedimento de execução do infarto. O ecocardiograma avalia de forma precisa a morfologia e a função sistólica em

animais de experimentação que foram submetidos ao infarto. A relação do grau da área infartada do miocárdio bem como da sua repercussão na limitação da capacidade funcional e suas alterações inerentes à IC sobre outros órgãos em ratos também é uma temática que requer esclarecimentos.

Com base nos achados da literatura descritos acima, a hipótese iniciada por esse estudo foi averiguar se a IC induzida pelo infarto miocárdico em ratas com ou sem ooforectomia, ou seja, de etiologia isquêmica, pode provocar deficiência na produção de hormônios sexuais que pode levar ao desenvolvimento de desbalanço anabólico/catabólico com repercussões para o desencadeamento de caquexia cardíaca.

2. - OBJETIVOS

- 1- Avaliar o efeito da IC sobre o possível desenvolvimento de CC em ratas.
- 2- Avaliar o efeito da IC sobre a produção de hormônios sexuais: Testosterona total, estradiol, FSH.

Materiais e Métodos

3. - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. - Animais

Para atingir os objetivos propostos foram estudadas ratas *Sprague Dawley*, provenientes do Biotério do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. As ratas foram alojadas em caixas de polipropileno providas de bebedouro e comedouro continuamente, e mantidas em condições ambientais controladas de temperatura ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$) e iluminação (ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro). Para todos os animais foi fornecida uma ração comercial referência para ratos (Nuvital) e também água *ad libitum*.

Todos os procedimentos seguiram as recomendações do comitê de ética (já aprovado na CEUA/ICB, com número de protocolo: 177 nas fls.138 do livro 02). O protocolo experimental teve início quando os animais tinham aproximadamente 60 dias de idade, pesando entre 200-250 g.

3.2. - Grupos experimentais

As ratas foram distribuídas nos grupos de forma randomizada, de acordo com os dois principais procedimentos do estudo: a ooforectomia ou não (intactas) e o infarto do miocárdio (IM) ou cirurgia fictícia (SHAM). Dessa forma, foram divididas em quatro grupos com as seguintes características:

- INT/SHAM: ovários intactos e cirurgia fictícia de Infarto do miocárdio (IM).
- INT/IM: ovários intactos e cirurgia de Infarto do miocárdio
- OVX/SHAM: ovários retirados e cirurgia fictícia de IM.
- OVX/IM: ovários retirados e cirurgia de IM.

3.3. - Delineamento experimental

Figura1: Representação esquemática dos procedimentos experimentais nos quais: OVX: Ooforectomia; INT: Ratas Intactas; Avaliação Ciclo: Identificação da fase do ciclo estral e coleta de sangue para dosagem hormonal; IM: Infarto Agudo do Miocárdio; SHAM: Cirurgia fictícia do IM; ECO: Ecocardiograma; VO₂: Teste de esforço máximo com avaliação do consumo máximo de Oxigênio; PA: avaliações hemodinâmicas (pressão arterial e frequência cardíaca).

A primeira divisão dos animais ocorreu quando esses aleatoriamente foram sorteados para a serem submetidos ao primeiro procedimento cirúrgico ooforectomia (OVX), sendo que as ratas que não foram ooforectomizadas foram mantidas “intactas” (INT). Após aproximadamente trinta dias da ooforectomia, foi realizada a primeira avaliação do ciclo estral seguida da coleta de sangue das ratas - o soro era armazenado para as dosagens de hormônios sexuais - com o intuito de verificar o impacto da ooforectomia sobre os níveis hormonais das ratas.

Em seguida, ocorreu o segundo procedimento cirúrgico: infarto do miocárdio (IM). Nesse momento, os grupos foram submetidos ao IM ou à cirurgia fictícia de IM: “SHAM”.

Dessa forma, foram constituídos quatro grupos experimentais do estudo: INT+SHAM, INT+IM, OVX+SHAM e OVX+IM.

As ratas que foram submetidas ao IM passaram por um período de 8 semanas de recuperação e em seguida foram realizadas as avaliações ecocardiográficas para se definir o grau de acometimento da disfunção ventricular induzida. Após quatro semanas adicionais, executou-se o registro da pressão arterial e da frequência cardíaca. Além disso, realizaram-se as avaliações da capacidade funcional por meio do consumo de oxigênio máximo durante o teste de esforço máximo em esteira; e uma nova coleta de sangue e armazenamento do soro para análise das dosagens de hormônios sexuais - nessa fase para se avaliar os efeitos da IC, e o efeito aditivo da IC associada à ooforectomia (OVX) sobre o perfil hormonal.

Ao final, o período totalizou 12 semanas que foram importantes para a consolidação do quadro evolutivo de IC conforme referido na literatura (LOPES et al., 2010). Finalmente, os animais foram eutanasiados (usando dose excessiva de anestésicos Ketamina (100mg/kg) e Xilazina (20mg/kg), seguindo as normas éticas. Os tecidos cardíaco e músculos esqueléticos - tais como sóleo, plantar e gastrocnêmico - foram preservados e armazenados para análises histológicas e bioquímicas (Fig. 1).

Os métodos apresentados a seguir foram utilizados para caracterizar as diversas condições experimentais a fim de alcançar os objetivos propostos. Nessa seção “Materiais e métodos” estão descritos os métodos empregados, em ordem cronológica, de acordo com o protocolo experimental. Já nas seções “resultados” e “discussão” estão agrupados os diferentes resultados de forma a nortear as caracterizações e a discussão e da seguinte maneira:

- 1) A caracterização da OVX.
- 2) A caracterização da IC e da função cardíaca
- 3) A caracterização CC.

3.4. - Procedimento cirúrgico da ooforectomia (OVX)

As ratas alocadas aleatoriamente nos grupos OVX+IM e OVX+SHAM foram inicialmente pesadas e, em seguida, submetidas ao procedimento de retirada dos ovários (ooforectomia bilateral) sob anestesia com injeção intraperitoneal de Ketamina (50 mg/kg) e Xilazina (12 mg/kg) (TUFFERY, 1995).

Os animais foram posicionados em decúbito dorsal e foram realizadas duas pequenas incisões laterais no abdômen, aproximadamente um centímetro posterior ao gradil costal, com a finalidade de localizar rapidamente os ovários, sem maiores traumas. Por meio dessa abertura, os ovários e as tubas uterinas foram tracionados para fora da cavidade abdominal com o auxílio de uma “pinça de Adson”. As tubas uterinas foram ligadas bilateralmente para em seguida proceder a remoção dos ovários. Ao término do procedimento cirúrgico, a camada muscular e a pele foram suturadas, com hemostasia adequada. Os animais ficaram em observação por uma semana, permanecendo em gaiolas individuais, sendo posteriormente reunidos em gaiolas contendo cinco animais.

3.5. - Avaliação do ciclo estral e procedimento para a coleta de sangue

O ciclo estral das ratas foi avaliado diariamente no período que antecedia a coleta das amostras de sangue. O procedimento era sempre realizado no mesmo horário, no período da tarde, aproximadamente às 14h e em seguida o sangue era coletado, caso a fase do ciclo estral identificada fosse o “Proestro”.

Para o procedimento da avaliação do ciclo estral, utilizou-se a técnica do “esfregaço vaginal”, realizado por meio de um lavado da secreção vaginal da rata, através da instilação de 0,3 ml de soro fisiológico (NaCl 09%) e em seguida o aspirado vaginal era coletado. Após esse procedimento, foi executada a leitura das lâminas não-coradas, a fresco, para a diferenciação dos tipos celulares (células epiteliais, cornificadas e leucócitos) e, de acordo

com a proporção de cada um dos tipos celulares a fase do ciclo é determinada, sendo que a fase do “Proestro” é a que se encontra a maior prevalência de células epiteliais (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002), como também é a fase em que ocorre a maior secreção dos hormônios esteroides sexuais (SMITH; FREEMAN; NEILL, 1975) (Fig. 2).

Figura 2: Oscilações Hormonais ao longo das fases do ciclo estral (SMITH; FREEMAN; NEILL, 1975).

A partir da identificação da fase do ciclo estral do animal em proestro, a rata era submetida à coleta de 1,0 ml de sangue. Para a obtenção dessa amostra as ratas foram

anestesiadas com Isoflurano, de tal forma que, quando há a ausência dos reflexos de endireitar e podal, iniciou-se uma pequena incisão na parte distal da cauda do animal, seguida por movimentos de ordenha. O sangue goteja em um frasco “*eppendorf*” de 1,5 ml, enquanto o animal era mantido aquecido por luz infravermelha.

Em seguida, as amostras de sangue eram centrifugadas a uma rotação de 10.000 RPM durante 20 min. O soro dividido em três (três) alíquotas, sendo 2 de 90µl e uma 200µl, as quais foram congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em freezer - 80°C.

Algumas fotomicrografias (Fig. 3 e 4) foram feitas para demonstrar a prevalência das células epiteliais (indicando que o animal encontrava-se na fase “Proestro” do ciclo estral) no lavado vaginal das ratas dos grupos INT+SHAM e INT+IM.

Figura 3: Fotomicrografia do esfregaço vaginal de uma rata do grupo (INT+IM), em proestro, anterior a coleta do sangue para dosagem hormonal. A maior prevalência de Epiteliais (E) indica que o animal está na fase proestro do ciclo estral.

Figura 4: Fotomicrografia de quatro dias consecutivos (A,B,C,D) em que foram realizados os esfregaços vaginais de uma rata do grupo OVX+SHAM. A maior prevalência de Leucócitos (L) indica que o animal está na fase diestro do ciclo estral, a permanência por mais de quatro dias nessa fase indica que o animais estava sem ciclos ovarianos.

As fotomicrografias das lâminas dos esfregaços vaginais das ratas do grupo OVX+SHAM e OVX+IM, foram realizadas 4-5 dias seguidos após a ooforectomia para demonstrar que as ratas encontravam-se permanentemente na fase “diestro” do ciclo estral, considerando que os animais não apresentavam ciclos ovarianos (Fig 4).

3.6. – Procedimento cirúrgico do Infarto do Miocárdio (IM) e cirurgia fictícia (SHAM)

O procedimento de IM foi feito como descrito por Pfeffer et al, (1979) (PFEFFER et al., 1979). Os animais foram inicialmente pesados, em seguida foram anestesiados com Isoflurano e mantidos nesse plano anestésico por meio de um sistema de volatilização acoplado a um sistema de ventilação mecânica para apoio respiratório. Assim, as ratas eram colocadas em decúbito dorsal em mesa aquecida e eram entubados com cânula endotraqueal (Gelco-14G) para a manutenção da respiração (Harvard Apparatus ^c, Boston, EUA). Em sequência, era realizada uma incisão na pele e os planos musculares dos peitorais esquerdos foram afastados. Após isto, foi feita uma toracotomia esquerda no quarto espaço intercostal, sendo posicionado um afastador “Cook” entre as costelas para permitir a melhor visualização do campo cirúrgico. O pericárdio era seccionado, sendo que para os animais do grupo SHAM a cirurgia limitava-se até a abertura do pericárdio. Feito isto, foi realizada a drenagem do ar da cavidade torácica do animal, mantendo assim a pressão negativa e evitando a perpetuação do pneumotórax. Após o procedimento, os músculos peitorais eram reposicionados e suturados. Para os animais que passaram pelo procedimento de infarto a cirurgia foi seguida após a abertura do pericárdio e o átrio esquerdo foi afastado para visualização da veia interventricular anterior. Em seguida, foi executada uma ligadura envolvendo a veia e musculatura subjacente (onde se encontra a artéria coronária interventricular anterior) para provocar a oclusão da artéria e subsequente isquemia miocárdica. Em seguida, a incisão era fechada e o ar intratorácico drenado. Os músculos afastados foram reposicionados e a pele suturada (fio mononylon 4.0), a respiração foi estimulada e a ventilação artificial retirada. Os animais eram colocados em ambiente aquecido para recuperação pós-anestésica e superficialização da analgesia.

3.7. - Ecocardiograma

O estudo da função cardíaca global foi realizado por meio da ecocardiografia. As medidas ecocardiográficas foram realizadas após o PC2 em todos os grupos para avaliar a função do ventrículo esquerdo com o aparelho GE-Vivid E9 e transdutor com frequência de 4 a 12 MHz. As dimensões do ventrículo esquerdo foram medidas no modo M, e a Fração de encurtamento do ventrículo esquerdo (FS) foi calculada pela fórmula $FS = [(DDVE - DSVE) / DDVE] \times 100$, no qual DDVE= Diâmetro Diastólico do Ventrículo Esquerdo e DSVE= Diâmetro Sistólico do Ventrículo Esquerdo. A Fração de Ejeção (FE) foi adquirida por meio do ecocardiograma bidimensional, paraesternal no eixo longitudinal, utilizando o método de Simpson (adaptado). O Índice de Desempenho Miocárdico (IDM) foi calculado pela fórmula $IPM = (TCIV + TRIV) / TE$ (em que TCIV= tempo de contração isovolumétrica, em m/s; TRIV= tempo de relaxamento isovolumétrico, em m/s, e TE= tempo de ejeção, em m/s). Todas as análises seguiram-se de acordo com as Diretrizes da Sociedade Americana de Ecocardiografia (LANG et al., 2005).

As avaliações ecocardiográficas foram realizadas por um único observador, e em cada exame foi coletado um total de cinco medidas, sendo em momento posterior analisada e calculada a média, o desvio padrão da média e o erro padrão da média dessas cinco medidas para cada animal estudado.

O exame ecocardiográfico foi realizado com os animais sob efeito anestésico 24 horas após o deslocamento do local de alojamento residual – Biotério da Escola de Educação Física e Esportes da Universidade de São Paulo – EEFE-USP – até o local do exame, setor de experimentação animal do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (InCor-HCFMUSP).

A anestesia foi induzida com uma mistura de Ketamina (50 mg/kg) e Xilazina (12 mg/kg) por via intraperitoneal e o equipamento GE modelo VIVID E9, transdutor linear que apresenta precisão superior para a obtenção dessas medidas, foi utilizado.

Foi estabelecido o corte de 50% da FE para que os animais dos grupos IM (INT+IM e OVX+IM) fossem considerados infartados, ou seja, desenvolvessem disfunção ventricular e consequente quadro de IC.

3.8 - Avaliação da capacidade física

A capacidade aeróbia máxima dos animais foi avaliada em cada animal utilizando-se um protocolo de teste de esforço máximo e progressivo, a fim de se obter a fadiga cardiopulmonar do animal concomitante à fadiga muscular periférica. O protocolo de progressão de cargas foi adaptado para as ratas da linhagem *Sprague Dawley* (considerando que ao final do protocolo haveria um grupo composto por ratas infartadas e ooforectomizadas) a partir do padrão utilizado no Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Exercício da EEFÉ-USP (MOREIRA et al., 2013). Os animais foram adaptados à esteira e ao sistema durante cinco dias (10 min./dia). O teste iniciava com velocidade 6 metros por minuto (m/min.) e a velocidade progredia em 3 m/min. a cada 2 min. com a esteira sem inclinação.

Os animais foram submetidos à avaliação da capacidade física máxima, por meio de espirometria aberta. O Consumo Máximo de Oxigênio (VO_2) foi avaliado por meio de uma caixa metabólica (Fig. 5) conectada a um sensor de oxigênio (Ametek N-22M-S-3^A/l) que analisa continuamente as amostras das frações expiradas de oxigênio (FeO_2), bem como os valores das concentrações ambientais de oxigênio (FiO_2). Posteriormente, os valores de VO_2 de cada animal foram calculados pela seguinte fórmula: $\text{VO}_2 \text{ (mlO}_2\text{. Kg}^{-1}\text{. Min}^{-1}\text{)} = \text{Fluxo (FiO}_2\text{-FeO}_2\text{)} / \text{PC}$, no qual Fluxo=Fluxo da bomba de sucção (3,500 ml/min); FiO_2 = Fração

inspirada de O_2 ; FeO_2 = Fração expirada de O_2 ; PC = Peso corporal do animal (g) (ROLIM et al., 2006).

Figura 5: Esquema representativo do método e protocolo escalonado de exercício progressivo até exaustão utilizado para avaliação do consumo máximo de oxigênio (Adaptado de De Angelis et al., 1997).

3.9 - Registro indireto da pressão arterial sistólica e frequência cardíaca

No tempo determinado para avaliação de pressão arterial (Fig.1) os animais foram adaptados ao sistema de pletismografia de cauda, para aferição indireta da pressão sistólica e frequência cardíaca; essa adaptação consistia na exposição do animal, com durações gradualmente maiores ao longo dos dias, mimetizando o registro das medidas hemodinâmicas, por cinco dias consecutivos. Essa medida foi coletada por meio de um esfigmomanômetro de cauda. A rata era colocada em uma caixa restritora aquecida para promover vasodilatação da artéria caudal. O esfigmomanômetro adaptado para ratos foi posicionado na cauda do animal e insuflado até a obstrução total do fluxo sanguíneo da artéria caudal, dessa forma, obtinha-se a retomada do fluxo progressiva e lentamente, até a captação dos primeiros picos de pressão arterial, considerada como a pressão sistólica. As pressões arteriais foram captadas pelo *Sistema BP- 2000 series II*, que contém um transdutor

eletromagnético conectado a um amplificador, repassando o sinal para um conversor analógico-digital que permitiu o registro dos dados em tempo real. Os dados foram analisados também pelo programa *BP-2000 Blood Pressure Analysis* (Fig. 6).

Para a determinação da pressão arterial caudal (PAS) e Frequência Cardíaca (FC) de repouso foram consideradas as médias aritméticas de dez registros realizados para o mesmo dia experimental em cada rata estudada (BRUM et al., 2002).

Figura 6: Representação do programa de análise de dados de pressão e frequência cardíaca.

3.10 - Eutanásia e coleta de tecidos

Depois de efetuar os protocolos experimentais, os animais foram eutanasiados a partir de dose excessiva de anestésico (coquetel de Ketamina 100 mg/kg e Xylazina 25mg/kg, intraperitoneal). Foi feita toracotomia e exposição do coração para a perfusão dos animais através do ventrículo esquerdo e tendo o átrio direito seccionado. As ratas foram perfundidas com solução de KCl 14 mM em solução salina 0,9% a fim de garantir a parada em diástole do coração. Após essa etapa, uma nova perfusão foi realizada com formol 4% tamponado (tampão fosfato de sódio 0,1 M). Cada uma dessas etapas durava entre 10 a 15 minutos. Foram coletados, para este estudo, o coração e os músculos sóleo, gastrocnêmico e plantar. A coleta dos músculos da pata direita ocorreu antes da perfusão para a técnica histoquímica.

3.11 - Avaliações morfométricas

Os animais foram pesados semanalmente de forma a acompanhar os procedimentos experimentais. Ao final dos tempos experimentais, as ratas foram submetidas à eutanásia para coleta e armazenamento dos tecidos, muscular e ósseo, precedida por uma coleta de sangue e de medidas corporais. A tíbia direita foi separada de todos os tecidos adjacentes e seu comprimento medido com uso de um paquímetro. Tanto o peso corporal como o comprimento da tíbia foram úteis como referências para a normalização do peso cardíaco e do peso uterino. Embora se utilize rotineiramente o peso corporal como normalizador de tecidos específicos, os grupos nos quais se espera observar caquexia podem mostrar baixo peso corporal, interferindo nos resultados obtidos. Desta forma, tomou-se o cuidado de medir o comprimento da tíbia como um segundo valor normalizador, caso os animais apresentem mesmo tamanho e pesos diferentes.

Além destas avaliações, foram retirados o coração e o útero que foram pesados separadamente. Os valores relativos de coração e útero foram calculados por uma relação percentual em função do peso corporal, ou do comprimento da tíbia.

Peso relativo do tecido (%) = (peso do tecido / peso corporal) x 100 ou

Peso relativo do tecido (%) = (peso do tecido / comprimento da tíbia) x 100

Os corações tiveram as câmaras atriais separadas das câmaras ventriculares. Dessa forma, as câmaras cardíacas foram pesadas separadamente. Vale ressaltar que a medida do peso cardíaco pode sugerir respostas adaptativas do processo de IM, bem como o peso uterino pode comprovar a efetividade da ooforectomia nas ratas dos grupos OVX, sendo que se espera uma redução significativa desse órgão.

3.12 - Preparações histológicas

Após a eutanásia, as ratas tiveram os corações, músculos sóleo e adrenais reservados para a análise histológica. Após a perfusão do animal, o tecido foi armazenado em formol a 4% tamponado por 24 horas. A partir de então, foi retirada uma secção de cinco milímetros de coração, cinco milímetros abaixo do ponto de ligadura. Os tecidos foram dispostos em cassete plástico, processados em aparelho histotécnico com ciclo total de 12 horas no qual se realiza a desidratação, diafanização e parafinização dos tecidos. A seguir, estes foram incluídos em *paraplast* (Fig. 7).

Após a microtomia obtendo-se cortes de 5µm, foram fixados em lâminas histológicas. As análises foram feitas usando microscópio *Zeiss Axio Scope II* acoplado a um sistema de digitalização e análise de imagem *Axio Vision* (Fig. 7).

Figura 7: Esquema de procedimentos histológicos e análises microscópicas onde: A= colocação do tecido em cassete após processo de processamento; B= inclusão em bloco de *paraplast*; C= corte de blocos realizados em micrótomo e colocados em lâminas histológicas; D= análise microscópica fotografia das lâminas e; E= Análise das imagens.

3.12.1 – Colorações histológicas

As lâminas preparadas foram coradas para as seguintes colorações e avaliações: coloração picrossírius, para a avaliação da área infartada; o ácido periódico de Schiff (APS) para a quantificação da densidade capilar e da área de secção transversa do músculo sóleo; Hematoxilina – Eosina (H-E) para as medidas relativas à glândula adrenal.

3.12.2 – Determinação da área infartada

Para a medida da área de infarto, foi usada a coloração de picrossírius, que cora em vermelho as fibras de colágeno em contraste com a coloração amarelada das fibras musculares. A área de infarto é calculada como uma relação percentual da área total. Para cada coração foram utilizados três cortes. Para as medidas, as lâminas foram digitalizadas, junto com uma medida de comprimento precisa, para a calibração do sistema de análise de imagens. O sistema de análise de imagens usado foi o *Image J*, sendo medido o perímetro externo do ventrículo esquerdo e o perímetro externo da extensão equivalente à região do infarto. O tamanho do infarto foi calculado como a porcentagem relativa da extensão acometida em relação ao perímetro total.

3.12.3 – Densidade capilar e área de secção transversa das fibras do músculo sóleo

A densidade capilar no músculo sóleo será avaliada a partir de cortes submetidos à reação do ácido periódico de Schiff (PAS). Esta coloração ressalta a presença de proteoglicanas de membrana e evidencia a luz dos capilares e vênulas. Será então avaliada a densidade capilar/fibra muscular para aproximadamente 20 fibras por animal (objetiva de 20X). No mesmo corte é possível medir a área de secção da fibra muscular; para essa análise, foram medidas as áreas de 20 fibras de cada animal selecionadas aleatoriamente.

3.12.4 – Espessura das diferentes zonas do córtex Adrenal, medidas de área da Medula e área total da glândula adrenal

A glândula adrenal, corada para H-E, foi fotografada em sua totalidade sob a objetiva de 10X, para a medição de sua área total, em seguida, a medula adrenal fotografada sob a objetiva de 40X e essa área medida. A partir dessas duas medidas estabeleceu-se a relação Medula/Área Total.

O córtex adrenal teve sua circunferência registrada em oito fotos seguindo o formato do perímetro de cada glândula sob a objetiva de 40X, o que possibilitou uma avaliação mais próxima e precisa além da diferenciação na coloração e na morfologia celular para a caracterização de cada uma das zonas do córtex adrenal (Fig.8).

Figura 8 - Fotomicrografias exemplificando medidas da glândula adrenal (fig. A); área total da medula adrenal (fig. B); avaliação das espessuras das zonas do córtex adrenal: zona glomerular (seta branca), zona fasciculada (seta amarela) e zona reticulada (seta preta) – fig.C.

3.13 – Determinação das concentrações dos hormônios sexuais

Para a determinação das concentrações de hormônios sexuais, estão sendo utilizados os kits comerciais, utilizando o método *ELISA* (*enzyme-linked immuno sorbent assay*), seguindo as recomendações do fabricante, nas quais imunoensaios são realizados para medição quantitativa dos hormônios sexuais da seguinte forma: uma quantidade desconhecida do hormônio presente na amostra do soro da rata e uma quantidade definida do mesmo hormônio exógeno competem pelos ligantes dos poços revestidos de uma microplaca. Após incubação num agitador de microplacas este é lavado quatro vezes. Após a adição da solução de substrato, constata-se que a concentração do hormônio é inversamente proporcional à densidade óptica medida. Pretende-se mensurar as concentrações de Testosterona Total, Estradiol (E₂) e FSH.

3.14 – Análise estatística

Para a avaliação da normalidade e homogeneidade da amostra, foram utilizados os testes de *Shapiro-Wilk* e de *Levene*, respectivamente, para todas as variáveis e em cada grupo.

Para as variáveis com distribuição normal e homogêneas, utilizou-se testes paramétricos, aplicando-se a análise de variância (ANOVA) de um fator. Em caso de diferença significativa, os dados foram submetidos ao *Post-hoc* de *Tukey*, a fim de se identificar a diferença entre os grupos.

Para verificar as possíveis oscilações do peso corporal dos animais em diferentes momentos do estudo utilizou-se a análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas. Em caso de diferença significativa, utilizou a comparação entre os grupos pelo *Post-hoc* de *Tukey*.

Para as variáveis que não apresentaram distribuição normal e/ou homogeneidade utilizaram-se testes não paramétricos (teste de *Kruskall-Wallis*).

Os valores estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil (IQR, 25%-75%). Foram considerados valores estatisticamente significativos quando $P < 0,05$. Todos os cálculos estatísticos foram desenvolvidos através do *software SPSS* versão 21 para *Windows* (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

Resultados

4 – RESULTADOS

Como descritos nos métodos, as avaliações empregadas foram usadas para entender e caracterizar condições específicas abordadas pelos objetivos propostos. Desta forma, resultados são agrupados de forma a melhor entender 1) A caracterização da OVX; 2) A caracterização da IC e da função cardíaca; e 3) A caracterização CC.

Mais especificamente, as avaliações estão agrupadas da seguinte forma:

1) A caracterização da OVX: o peso dos úteros mostrando a atrofia desse órgão nas ratas ooforectomizadas, as oscilações do peso corporal e dosagens hormonais sendo que esses dois últimos também influenciam o quadro de CC. As medidas morfológicas e histológicas da glândula adrenal enquanto um importante órgão endócrino nas ratas OVX.

2) A caracterização da IC e da função cardíaca: as medidas hemodinâmicas e de capacidade funcional; as medidas ecocardiográficas demonstrando o estado da função cardíaca; o peso dos VEs e as medidas histológicas do coração.

3) A caracterização CC: as avaliações histológicas do músculo sóleo – razão capilar fibra, área de secção transversa das fibras.

4.1. – Caracterização da OVX

4.1.1 - Peso dos úteros

O peso de útero dos animais foi significativamente menor nos grupos OVX+SHAM e OVX+IM em relação aos grupos INT+SHAM e INT+IM (Fig. 9).

Figura 9: Peso dos úteros. INT= ratas intactas; SHAM= cirurgia fictícia do IM; IM= infarto do miocárdio; OVX= ooforectomia; * = $P < 0,05$; n= número amostral.

4.1.2 - Peso corporal dos animais

O peso corporal dos animais no momento “pré IM” (também anterior a OVX) foi igual para todos os grupos, com exceção para o grupo OVX+IM que apresentava peso corporal menor comparado ao grupo INT+SHAM. No momento “pós IM”, os grupos OVX+SHAM e OVX+IM apresentaram pesos corporais maiores em comparação aos grupos INT+SHAM e INT+IM. No momento “Final” (eutanásia) as ratas dos grupos OVX+SHAM e OVX+IM estavam com valores de peso corporal maiores do que os grupos INT+SHAM e INT+IM (Fig.10).

Figura 10: Oscilações do peso corporal. INT= ratas intactas; SHAM= cirurgia fictícia do IM; IM= infarto do miocárdio; OVX= ooforectomia; *= $P<0,05$ vs. INT+SHAM; †= $P<0,05$ vs. INT+IM; (n=9 a 14 por grupo)

4.1.3 - A Glândula Adrenal como um importante órgão endócrino

O peso das adrenais normalizado pelo peso corporal dos animais (Adrenais/PC) foi menor nos animais dos grupos OVX+SHAM e OVX+IM quando comparados aos grupos INT+SHAM e INT+IM (TABELA 1).

Os resultados da variável relação da área da medula adrenal normalizada pela área total da glândula (Medula/Área Total) demonstraram que apenas o grupo OVX+SHAM teve valores aumentados quando comparado aos demais grupos (TABELA 1).

Os valores da Zona Glomerular do córtex adrenal dos grupos OVX+SHAM e OVX+IM foram menores do que nos grupos INT+SHAM e INT+IM (TABELA 1).

Os valores da Zona Fasciculada dos grupos OVX+SHAM e OVX+IM foram menores do que os encontrados no grupo INT+IM, e os valores do grupo OVX+IM foi também significativamente menor quando comparado ao grupo INT+SHAM para a mesma variável (TABELA 1).

O resultado a medida da espessura da área reticulada, foi menor em todos os grupos em comparação ao grupo INT+SHAM. Somente o grupo OVX+IM apresentou valores significativamente menores em relação ao grupo INT+SHAM (TABELA 1).

Tabela 1 – Variáveis morfológicas e histológicas da glândula adrenal

Grupo	INT+SHAM	INT+IM	OVX+SHAM	OVX+IM	P
Variáveis	n = 10	n = 14	n = 9	n = 10	
Adrenais/PC** (g/g)	0,08 (0,07-0,10)	0,10 (0,07-0,11)	0,06 (0,05-0,06) *†	0,05 (0,04-0,06) *†	<0,001
Medula/Área Total (µm ²)	8 (7-10)	9 (8-11)	10 (8-10)	12 (12-14) *†‡	0,01
Glomerular (µm)	55 ± 3,6	55±3,6	64 ±2,6 *†	62± 3,9 *†	<0,001
Fasciculada (µm)	514 ±37,7	519± 39,6	453± 16,5 †	418± 43,7 *†	<0,001
Reticulada (µm)	324 (274-334)	268 (244-279) *	253 (246-261) *	210 (195-269) *†	0,006

As variáveis estão expressas como média ± desvio padrão da média e mediana (IQR). INT= ratas intactas; SHAM= cirurgia fictícia do IM; IM= infarto do miocárdio; OVX= ooforectomia; Adrenais/PC= peso das glândulas adrenais normalizados pelo peso corporal (esse valor foi multiplicado por 100); Medula/Área Total⁻¹= área da medula da glândula adrenal normalizada pela área total da glândula (esse valor foi multiplicado por 100); Glomerular= medida da espessura da zona glomerular do córtex adrenal; Fasciculada= medida da espessura da zona fasciculada do córtex adrenal; Reticulada= medida da espessura da zona reticulada do córtex adrenal. *=P<0,05 vs. INT+SHAM; †=P<0,05 vs. INT+IM; ‡= P<0,05 vs. OVX+SHAM.

4.2 – Caracterização da IC

4.2.1 – Características hemodinâmicas e avaliação da capacidade física

Não houve diferença significativa em resposta à intervenção, nos parâmetros hemodinâmicos de pressão arterial sistólica (PAS) e FC entre os grupos (TABELA 2).

Da mesma forma, não se observou diferença entre os grupos para a avaliação do consumo de oxigênio pico (VO_2 pico) (TABELA 2).

Para a variável IVO_2 , do teste de esforço máximo, verificou-se que os grupos INT+IM e OVX+IM apresentavam valores menores quando comparados ao grupo INT+SHAM, mas não houve diferença para o grupo OVX+SHAM (TABELA 2).

A variável distância percorrida somente o grupo INT+IM apresentou-se menor quando comparado ao grupo INT+SHAM (TABELA 2).

Tabela 2 – Características hemodinâmicas e da avaliação funcional dos animais 12 semanas após o IM

Grupo	INT+SHAM	INT+IM	OVX+SHAM	OVX+IM	P
Variáveis	n = 10	n = 14	n = 9	n = 10	
PAS (mmHg)	104 ± 29	120 ± 20	117 ± 24	115 ± 19	0,032
FC (bpm/min)	431 ± 43	408 ± 45	451 ± 78	432 ± 28	0,383
VO_2 (ml.kg.min ⁻¹)	99± 14	95± 12	91± 11	87± 14	0,909
IVO_2 (m/s)	53± 12,4	39± 7,1 *	48± 9,5	40± 9,8*	0,039
Distância Percorrida (m)	940 ± 402	523 ± 186 *	763 ± 358	594 ± 286	0,035

As variáveis estão expressas como média ± desvio padrão da média. INT= ratas intactas; IM= infarto do miocárdio; SHAM= cirurgia fictícia do IM; OVX= ooforectomia; PAS= pressão arterial sistólica; FC= frequência cardíaca; VO_2 = consumo de Oxigênio; IVO_2 = intensidade do pico de VO_2 . * = P<0,05 vs INT+SHAM.

4.2.2 – Ecocardiograma

Nas variáveis de avaliação da função sistólica observou-se que os grupos infartados (INT+IM e OVX+IM) evoluíram com o valor de FE menor em comparação aos grupos SHAM (INT+SHAM e OVX+SHAM) (Fig. 11).

Figura 11: Medida da FE dos animais dos diferentes grupos. INT= ratas intactas; IM= infarto do miocárdio; SHAM= cirurgia fictícia do IM; OVX= ooforectomia; A linha (em preto) mostra o corte estabelecido como critério de exclusão para que os animais fossem alocados nos grupos infartados (INT+IM e OVX+IM); -* = $P < 0,05$; n= número amostral.

Da mesma forma, verificou-se que a Fração de Encurtamento (FS) foi menor nos grupos infartados (INT+IM e OVX+IM) quando comparados aos grupos SHAM (INT+SHAM e OVX+SHAM (Fig.12).

Figura 12: Medida da Fração de encurtamento (FS) nos animais dos diferentes grupos; INT= ratas intactas; IM= infarto do miocárdio; SHAM= cirurgia fictícia do IM; OVX= ooforectomia; -* = $P < 0,05$; n= número amostral.

Para o Tempo de Contração Isovolumétrica (TCIV), o grupo INT+IM apresentou valor maior quando comparado aos grupos INT+SHAM e OVX+SHAM (TABELA 3).

O Diâmetro Sistólico do Ventrículo Esquerdo (DSVE) nos grupos infartados (INT+IM e OVX+IM) foi maior em comparação ao grupo INT+SHAM (TABELA 3).

O valor do Índice de Desempenho Miocárdico (IDM) foi maior no grupo INT+IM do que no grupo OVX+SHAM, mas não foi diferente dos demais grupos (TABELA 3).

O resultado obtido para o Volume Sistólico Final (VSF) demonstrou ser maior nos grupos infartados (INT+IM e OVX+IM) em comparação aos grupos Sham (INT+SHAM e OVX+SHAM) (TABELA 3).

A onda E foi maior nos grupos INT+IM e OVX+IM em relação ao grupo INT+SHAM (TABELA 3).

Não houve diferenças significativas entre os grupos para as variáveis TD, TRIV, TE, DDVE, VDF, A, E/A (TABELA 3).

Tabela 3 – Variáveis ecocardiográficas oito semanas após o IM ou SHAM

Grupo	INT+SHAM	INT+IM	OVX+SHAM	OVX+IM	P
Variáveis	n = 10	n = 14	n = 9	n = 10	
Função Diastólica					
TRIV(m/s)	35,2 ± 7,1	32,7 ± 6,9	30,7 ± 5,2	25,6 ± 10,2	0,219
TCIV(m/s)	17,1 ± 6,0	26,1 ± 6,5 *‡	17,6 ± 6,1	19,8 ± 6,1	0,008
TE (m/s)	90 ± 9,1	85 ± 11,7	96 ± 9,6	89 ± 10,4	0,091
TD (m/s)	48 ± 4,7	51 ± 15,6	55 ± 13,2	48 ± 16,8	0,482
E (cm/s)	61 (53-72)	72 (63-77)*	68 (63-75)	72 (63-78)*	0,054
A (cm/s)	33 ± 8,4	25 ± 8,6	34 ± 8,7	27 ± 14,6	0,439
E/A (%)	2 (1,9-2,2)	3 (1,8-4,7)	2(1,7-2,5)	3 (1,6-4,4)	0,287
Medidas de Morfologia					
DSVE(mm)	4,6 ± 0,4	6,6 ± 1,2 *	5,3 ± 1,4	6,2 ± 1,0*	0,015
DDVE(mm)	7,7 ± 0,4	8,4 ± 1,1	8,6 ± 1,3	8,5 ± 0,9	0,287
VDF (cm ³)	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,2*	0,051
VSF (cm ³)	0,1 (0,1-0,2)	0,3 (0,2-0,4) *‡	0,1 (0,1-0,2)	0,3 (0,3-0,4)*‡	<0,001
Função Cardíaca Global					
IDM	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,2‡	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,005

As variáveis estão expressas como média ± desvio padrão da média e mediana (IQR). INT= ratas intactas; IM= infarto do miocárdio; SHAM= cirurgia fictícia do IM; OVX= ooforectomia; TD = tempo de desaceleração; TRIV = tempo de relaxamento isovolumétrico; TCIV= tempo de contração isovolumétrico; TE= tempo de ejeção; DD=diâmetro diastólico; VE = ventrículo esquerdo; DS=diâmetro sistólico; IPM= índice de performance miocárdica; VDF = volume diastólico final; VSF = volume sistólico final; A= onda A; E=onda E; E/A=relação entre as ondas E e A. *= P<0,05 vs INT+SHAM; †=P<0,05 vs INT+IM; ‡=P,0,05vs OVX+SHAM.

4.2.3 – Peso dos VEs

Na variável Peso dos VEs todos os grupos apresentaram valores elevados quando comparados aos grupos INT+SHAM. O grupo OVX+IM apresentou valores elevados também em comparação ao grupo INT+SHAM (TABELA 4).

Para a variável VE/Tíbia – normalização do peso dos VEs pelo comprimento da tíbia dos animais – todos os grupos estavam maiores em comparação aos grupos INT+SHAM, sendo que o grupo OVX+SHAM também se apresentou maior quando comparado ao grupo INT+IM (TABELA 4).

Quando o peso dos VEs foi normalizado pelo peso corporal dos animais (VE/PC) apenas o grupo INT+IM estava maior quando comparado ao grupo INT+SHAM (TABELA 4).

Tabela 4 – Pesos absoluto e relativo do VEs

Grupo Variáveis	INT+SHAM n = 10	INT+IM n = 14	OVX+SHAM n = 9	OVX+IM n = 10	P
PVEs (g)	0,95 (0,93-0,99)	1,08 (1,05-1,14) *	1,09 (1,03-1,37) *	1,37 (1,28-1,48) * †	0,001
PVEs/Tíbia (g/cm)	0,22 (0,22-0,23)	0,26 (0,24-0,29) *	0,27 (0,24-0,32) *	0,34 (0,30-0,36) * †	0,017
PVEs/PC (g/g)	0,31 (0,29-0,32)	0,36 (0,32-0,39) *	0,29 (0,28-0,34)	0,37 (0,31-040)	0,041

As variáveis estão expressas como mediana (IQR). INT= ratas intactas; IM= infarto do miocárdio; SHAM= cirurgia fictícia do IM; OVX= ooforectomia; Tibias= comprimento da tíbia (cm); PVEs = peso dos ventrículos esquerdos (g). PVE/Tíbia = peso dos ventrículos esquerdos normalizados comprimento da tíbia; PVE/PC= peso dos ventrículos esquerdos normalizados pelo peso corporal (essa medida foi multiplicada por 100). *=P<0,05 vs INT+SHAM; †=P<0,05 vs INT+IM.

4.2.4 – Determinação da área infartada e da espessura do septo pela histologia

A análise da área infartada demonstrou percentual cardíaco afetado pelo IM significativamente maior nos grupos INT+IM e OVX+IM quando comparados aos grupos INT+SHAM e OVX+SHAM (Fig.13).

Figura 13: Medida histológica do percentual da área cardíaca acometida pelo IM dos animais dos diferentes grupos. INT= ratas intactas; IM= infarto do miocárdio; OVX= ooforectomia; n= número amostral.

Os resultados da medida a espessura do septo cardíaco mostram que os animais dos grupos INT+IM e OVX+IM tinham espessuras maiores que os animais dos grupos INT+SHAM e OVX+SHAM (Fig. 14).

Figura 14: Medida histológica da espessura do septo dos animais dos diferentes grupos. INT= ratas intactas; SHAM= cirurgia fictícia do IM; IM= infarto do miocárdio; * = $P < 0,05$; OVX= ooforectomia; n= número amostral.

Figura 15: Imagens representativas de cortes de coração corados para picrossírius, mostrando a ausência de marcação nos grupos SHAM (A) e a presença de marcação positiva (seta) indicando a cicatriz do IM (B).

4.3 – Caracterização da CC

4.3.1 - Densidade capilar e área de secção transversa das fibras do músculo sóleo

Não houve diferenças significativas na avaliação da densidade capilar e também na área de secção transversa das fibras do músculo sóleo (Fig. 16 e 17).

Figura 16: Medida histológica da razão capilar – fibra. INT= ratas intactas; SHAM= cirurgia fictícia do IM; IM= infarto do miocárdio; OVX= ooforectomia; n= número amostral.

Figura 17: Medida histológica da área de secção transversa das fibras musculares do m. sóleo nos grupos estudados; INT= ratas intactas; SHAM= cirurgia fictícia do IM; IM= infarto do miocárdio; OVX= ooforectomia; n= número amostral.

Discussão

5 – DISCUSSÃO

No presente estudo avaliou-se perfil hormonal de ratas com e sem IC e sob efeito ou não da privação de hormônios ovarianos, condição esta imposta pelo modelo de OVX. Testou-se a hipótese de que a IC estaria gerando efeitos deletérios a esse perfil tanto nas ratas INT quanto nas ratas OVX e isso, por sua vez, tornando o quadro de CC mais ou menos proeminente de acordo com a privação ou presença dos hormônios ovarianos e anabólicos.

Por isso é de suma importância a caracterização dos quadros de OVX, IC e CC. Como mencionado anteriormente, a caracterização da IC é evidenciada pelas medidas hemodinâmicas e de capacidade funcional; pelas medidas ecocardiográficas, demonstrando o estado da função cardíaca; e pelas medidas histológicas do tamanho da área acometida pelo infarto. Para a caracterização da OVX tem-se as avaliações do ciclo estral em diestro, o peso dos úteros mostrando a atrofia desse órgão nas ratas ooforectomizadas e as dosagens hormonais que influenciam o quadro de CC, o qual, por sua vez, caracterizou-se pelas avaliações da capacidade funcional dos animais, as oscilações do peso corporal e as avaliações histológicas do músculo sóleo: razão capilar/fibra e área de secção transversa das fibras musculares.

5.1 – Caracterização da OVX

A avaliação do ciclo estral das ratas foi o primeiro ponto para a caracterização da OVX. O ciclo estral da espécie *Rattus norvegicus* tem a duração média de quatro a cinco dias e é caracterizado por quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002). Apesar de ser uma metodologia simples, não há evidências científicas de que as ratas de um mesmo grupo sincronizam seus ciclos, além da irregularidade de ciclos comumente observada nessa espécie (SCHANK, 2001), o que torna essa avaliação um tanto quanto trabalhosa.

As avaliações do ciclo estral das ratas OVX ocorriam após 30 dias do procedimento cirúrgico, momento este em que o quadro de privação hormonal já estava consolidado, e as ratas OVX já não apresentavam mais ciclos ovarianos.

A diferenciação celular acontecia no intuito de constatar a prevalência de Leucócitos no lavado vaginal das ratas, conforme apresentado na figura 4. Quando o lavado vaginal das ratas se mantinha no padrão apresentado na figura 4, as ratas eram alocadas nos grupos OVX, quando não, eram imediatamente excluídas. Essa foi a primeira evidencia de que os animais estavam realmente sob um quadro de privação hormonal.

Outro critério que auxiliou na caracterização da OVX foi o resultado do peso dos úteros, os quais também caracterizam o quadro de privação hormonal, uma vez que não produzem hormônios ovarianos, fato que torna provável que estruturas voltadas exclusivamente para o sistema reprodutor, como o útero, atrofiem. Todas as ratas dos grupos OVX (OVX+SHAM e OVX+IM) apresentaram atrofia dos úteros em decorrência da privação hormonal.

A monitoração do peso corporal dos animais foi mais um dos pontos de apoio que tornou possível a caracterização pretendida. No início do protocolo, momento “Pré-IM”, as ratas tinham peso corporal igual, com exceção do grupo OVX+IM, que no início do protocolo foi composto aleatoriamente por ratas com o peso corporal menor.

No segundo momento “Pós-IM” - momento este caracterizado por ser posterior a intervenção dos dois procedimentos cirúrgicos (OVX e ou SHAM) - os animais dos grupos OVX (OVX+SHAM e OVX+IM) tiveram um aumento expressivo do peso corporal. O menor peso corporal observado nos animais do grupo OVX+SHAM, no momento “Pré-IM”, passou a ser o maior dos pesos corporais quando comparado aos demais grupos, seguido pelo grupo OVX+IM (Fig. 10), demonstrando assim uma característica da privação de hormônios ovarianos imposta pela OVX.

No momento “Final” observou-se que os grupos OVX (OVX+SHAM e OVX+IM) estavam com o peso corporal maior do que os grupos INT (INT+SHAM e INT+IM), comprovando que a OVX aumenta o peso corporal, mesmo quando associada à disfunção cardíaca imposta pelo IM.

5.2 – A glândula adrenal como um importante órgão endócrino

A glândula adrenal é um importante órgão endócrino, pois regula a síntese e secreção de diversos hormônios, principalmente os andrógenos que são o objeto de estudo dessa dissertação. Nas ratas OVX, essa glândula passa a ser o principal órgão produtor desses hormônios, por isso sua elevada importância.

Além da produção dos hormônios andrógenos adrenais pela zona reticulada do córtex adrenal, situações como as que esses animais foram expostos (IM, OVX e estresse - por conta dos procedimentos cirúrgicos, esfregaços vaginais, etc.) influenciam a função do eixo Hipófise-Pituitária-Adrenal como um todo.

Aparentemente, as glândulas adrenais desses animais eram todas iguais, porém sabia-se que o peso corporal das ratas dos grupos OVX (OVX+SHAM e OVX+IM) estavam elevados, por isso a necessidade normalizar esses valores. Após a normalização, os valores observados nessa variável mostraram que as glândulas adrenais das ratas dos grupos OVX (OVX+SHAM e OVX+IM) estavam hipertrofiadas em comparação às das ratas INT (INT+SHAM e INT+IM). Essa hipertrofia observada nas glândulas desses grupos sugeriu o estudo das zonas do córtex e da medula da glândula, com a hipótese de que haveria alterações na morfologia desse órgão em decorrência da OVX, da disfunção cardíaca e ou da associação dos quadros.

A relação Medula/Área total, cujo resultado demonstrou uma hipertrofia da Medula Adrenal observada somente no grupo OVX+IM, mostrou que a associação dos quadros de disfunção cardíaca e OVX foi eficaz em promover essa importante alteração, uma vez que a medula adrenal é a responsável pela produção de catecolaminas (ELIAS, ROSA, ANTUNES-RODRIGUES, CASTRO, 2012). Pode-se inferir que esses animais, dada a hipertrofia da medula adrenal, estejam com a produção de catecolaminas elevada.

A zona glomerular do córtex adrenal é a responsável pela síntese da Aldosterona. Sabe-se que este é um hormônio importante que regula diversas funções no organismo, além de ser um dos componentes do sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona, classicamente alterado em indivíduos com IC. A exposição crônica a elevadas concentrações de Aldosterona leva a um aumento do volume sanguíneo, o que estimula a hipertrofia cardíaca, além da fibrose miocárdica e arritmias ventriculares (LISUREK; BERNHARDT, 2004).

O aumento da espessura da Zona Glomerular nas ratas dos grupos OVX (OVX+SHAM e OVX+IM), quando comparadas às ratas dos grupos INT (INT+SHAM e INT+IM), demonstra que este é muito mais um efeito da OVX do que a disfunção cardíaca. Se a síntese de Aldosterona estiver aumentada nos animais que demonstraram esse aumento na espessura da zona glomerulosa, os animais do OVX+IM evoluíram com pior prognóstico do que os demais devido à associação dos dois quadros (disfunção cardíaca, OVX e a consequente maior exposição à Aldosterona).

Na zona fasciculada onde ocorre a síntese de cortisol, curiosamente os animais dos grupos OVX+IM demonstraram uma diminuição na espessura dessa zona quando comparados os grupos INT+SHAM e INT+IM; o grupo OVX+SHAM demonstrou menor espessura da zona fasciculada somente em relação ao grupo INT+IM. Possíveis explicações para este fato são que, devido à intensa síntese de cortisol nesses grupos, tenha ocorrido uma adaptação ou a falência da produção, gerando uma hipertrofia da glândula; ou ainda que a OVX iniba a produção de cortisol.

Por fim, a zona reticulada do córtex adrenal, principal ponto de síntese dos hormônios andrógenos adrenais e precursores do estrógeno e testosterona, demonstrou-se menos espessa em todos os grupos quando comparados ao grupo INT+SHAM. O grupo OVX+SHAM também apresentou espessura dessa zona menor em relação ao INT+SHAM. Como já citado anteriormente, a produção de andrógenos adrenais é um ponto muito importante na regulação

endócrina das ratas ooforectomizadas, pois na ausência dos ovários a produção desses hormônios pela glândula adrenal deve ser destacada. Curiosamente, a zona reticulada das ratas ooforectomizadas não se apresentou hipertrofiada, em resposta a um mecanismo de compensação da ausência dos hormônios ovarianos, como era esperado.

Sumarizando os resultados encontrados para a caracterização da OVX: as ratas dos grupos OVX (OVX+SHAM e OVX+IM) caracterizaram um quadro clássico de privação de hormônios ovarianos, uma vez que a OVX demonstrou-se eficiente em promover alterações crônicas no ciclo estral dos animais (as ratas permaneceram em diestro, demonstrando que estavam acíclicas); atrofia dos úteros (evidência de que cronicamente havia sinalização dos hormônios ovarianos para que esse órgão permanecesse funcional); e por fim aumento do peso corporal dos animais desses grupos. As alterações decorrentes da OVX foram bem características.

5.3 – Caracterização da IC

A IC não é uma patologia, mas sim uma condição fisiopatológica, multifatorial, sem sintomas patagnômicos, o que faz com que ela seja diagnosticada através de critérios clínicos (GOMES-SANTOS, 2013). No entanto, estudos sobre a incidência e o reconhecimento clínico da IC de etiologia isquêmica em ratos são escassos (ZORNOFF et al., 2009) e esse número diminui drasticamente quando há a particularidade de estudos em ratas. A partir desse pressuposto, segue-se a caracterização da IC com base nos resultados das seguintes variáveis estudadas.

Quanto às medidas hemodinâmicas – FC e PAS – não houve diferenças entre os grupos. Esperava-se que houvesse redução da pressão arterial, dado o grau da disfunção sistólica instaurada pelo IM. A possível explicação para a inalterada pressão arterial nessas ratas, considerando que a pressão arterial é uma variável hemodinâmica dependente do débito cardíaco e da resistência vascular periférica, é que provavelmente os grupos IM (INT+IM e OVX+IM), assim como o grupo OVX+SHAM, apresentem um aumento na resistência vascular periférica, devido à hiperatividade nervosa simpática. Mas a possível queda do débito cardíaco como reflexo da disfunção ventricular gerada pelo IM e/ou pela OVX proporcionou um contrabalanço com a resistência vascular periférica aumentada (BACURAU, 2007). No entanto há dados que mostram resultados semelhantes (DANTAS et al., 2013), mas também estudos em que foi observada queda na pressão arterial média de fêmeas *Sprague Dawley* (NEKOOEIAN; PANG, 1998) e diminuição das pressões arteriais sistólica, diastólica em média oito semanas após o IM em ratas OVX (FLORES et al., 2010).

Quanto à FC, há estudos tanto em fêmeas *Sprague Dawley* quanto em machos *Wistar*, os quais não apresentaram alteração após o IM. Em Flores, (2010) (FLORES et al., 2010) houve a redução após oito semanas de IM.

Em modelos animais, evidências apontam que as manifestações hemodinâmicas (elevada pressão de enchimento e débito cardíaco reduzido), características da IC, ocorrem somente quando o IM é considerado grande (>46% de área infartada). Para infartos considerados moderados (31%- 46%) encontram-se valores hemodinâmicos semelhantes aos valores basais, com reduzida capacidade de gerar pressão (fig. 12 e 14). Enquanto que para infartos menores que 31% de área infartada não ocorrem alterações hemodinâmicas. O percentual da área cardíaca acometida pelo IM no presente estudo será discutida posteriormente.

Ainda sobre o quadro de caracterização da IC, nos resultados da capacidade funcional dos animais não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos quanto aos VO_2 dos animais. A partir da observação dos valores de VO_2 há de se ponderar que as ratas da linhagem *Sprague Dawley* possuem uma elevada capacidade oxidativa, o que confere um metabolismo aeróbio aumentado em relação ao observado em estudos com machos e animais de outras linhagens como o *Wistar*, por exemplo.

Todavia, para as outras variáveis – Distância e IVO_2 – houve redução significativa nos grupos INT+IM e OVX+IM, o que demonstra que esses animais estavam com sua capacidade funcional reduzida por conta do efeito da IC, uma vez que a IVO_2 refere-se ao trabalho físico atingido frente a um determinado consumo de O_2 . Dessa forma, a IVO_2 parece ser mais adequada para retratar a relativa redução da capacidade funcional em ratas submetidas à disfunção ventricular, o que de certa forma reproduz a redução da distância percorrida no grupo INT+IM e com forte tendência no grupo OVX+IM ($P=0,059$).

As medidas ecocardiográficas também são fatores importantes na caracterização da IC, uma vez que as ratas apresentaram a fração de ejeção e a fração de encurtamento, medidas comumente utilizadas para fins diagnósticos de IC em humanos e em ratos (GOMES-SANTOS et al., 2014; ZORNOFF et al., 2009; WU et al., 2011).

Como era de se esperar, os grupos infartados tiveram uma menor FE do que os animais dos grupos SHAM, caracterizando que esses animais cursaram com disfunção ventricular. Aparentemente a OVX preveniu a piora da FS, em posse deste resultado pode-se sugerir que na ausência dos hormônios ovarianos e com aumento do peso corporal ocorra uma adaptação que gera o aumento da contratilidade para vencer a sobrecarga volumétrica.

No estudo Palus, 2009 (PALUS et al., 2009) foi comparada a função cardíaca de ratos machos e fêmeas ao longo de 12 semanas pós IM. As fêmeas tiveram função cardíaca preservada em comparação aos machos. A FE permaneceu maior nas fêmeas durante todo o período de acompanhamento.

Este fato também foi observado no presente estudo, no qual as ratas tiveram alta taxa de mortalidade em decorrência ao IM (dado não divulgado) e grande parte das sobreviventes, oito semanas após o IM, tinham sua função cardíaca preservada, fazendo com que muitos animais fossem excluídos do protocolo por não atenderem o critério estabelecido para o IM ($FE < 50\%$).

Espera-se que a PD2 seja maior nos grupos IM, influenciando o aumento do TCIV. De fato, foi observado um aumento do TCIV somente no grupo INT+IM, o que parece contraditório, apesar do grupo OVX+IM não ter os valores aumentados, fato pode estar relacionado com as adaptações relativas ao aumento do peso corporal que foi observado nesse grupo.

A onda E retrata o enchimento rápido do VE. Os grupos IM apresentaram um aumento da onda E relacionado ao aumento do VSF. No entanto, a relação E/A que retrata o relaxamento ventricular e aumento da cavidade do VE não foi suficientemente sensível para identificar alterações da função diastólica. Litwin,(1999) (LITWIN et al., 1999) também observou aumento na onda E de fêmeas uma semana após o IM, no entanto essa alteração observada nas fêmeas foi de menor magnitude quando comparada aos machos.

Ainda em busca de fatores que evidenciem a IC, o peso dos VEs (PVEs) mostrou-se um importante dado para o estudo. Observou-se que tanto nos grupos infartados (INT+IM e OVX+IM) quanto no grupo OVX+IM os valores para esta variável estavam aumentados. A literatura demonstra que um efeito crônico do IM é o remodelamento cardíaco (BLENCK et al., 2016; CHEN et al., 2011; LITWIN et al., 1999) e o peso dos VEs pode ser um indicativo dessa hipertrofia. O estudo clínico de (CRABBE et al., 2003) demonstrou que mulheres desenvolvem menor hipertrofia dos cardiomiócitos do que os homens. Contudo, no estudo de Chen, (2011) (CHEN et al., 2011) o peso do coração das fêmeas não teve diferença em relação ao peso do coração dos machos, e quatro semanas após o IM ambos (machos e fêmeas) tiveram seu peso cardíaco aumentado.

O comprimento da tíbia é uma medida comumente utilizada para a normalização de pesos e verificação da maturação, idade óssea dos animais além de também ser um indicativo direto do tamanho dos animais (ANEXO 1). Para avaliação de hipertrofia, em diferentes modelos de injúria cardíaca, comumente se utiliza a relação entre o peso do ventrículo esquerdo ajustado pelo peso corporal do animal ou pela tíbia (ZORNOFF et al., 2009). A medida peso do VE normalizada pelo comprimento da tíbia (PVEs/Tíbia) demonstrou que todos os animais tiveram valores maiores do que o grupo INT+SHAM para essa variável; além disso, as ratas do grupo OVX+IM apresentaram valor maior que as ratas do grupo INT+IM. Esse resultado indica que nestes grupos houve hipertrofia dos VEs e um aumento substancial quando ocorre a associação do quadro de IC ao de OVX.

Por fim, analisando a variável PVEs/PC nota-se que apenas o grupo INT+IM demonstrou um aumento do peso dos VEs em comparação ao grupo INT+SHAM, quando essa variável é normalizada pelo peso corporal. Sabendo-se que os grupos tiveram seu PC aumentado (grupos OVX) e nessa variável eles não apresentaram diferença, é de se considerar

que o aumento do PVE não é dependente do aumento PC e sim das alterações fisiológicas, adaptativas, frente à injúria crônica imposta pelo IM e a consequente IC.

A medida da área infartada, por meio da histologia, também é uma das variáveis que compõe a caracterização do quadro de IC. Pela análise dessa variável é possível afirmar que os animais infartados do presente estudo tiveram valores em torno de 40% da área total acometida pelo IM (grupos INT+IM e OVX+IM) – Fig 12 e 14.

O estudo de Pfeffer et. al. (PFEFFER et al., 1979) considera IMs entre 31% e 46% como IMs de tamanho moderado. É necessário ponderar que para conseguir infartos classificados como moderados teve-se uma taxa de mortalidade elevada, pois quanto maior o impacto desejado para o IMs, maior a mortalidade, fato o que pode inviabilizar estudos futuros.

Os grupos IM (INT+IM e OVX+IM) também apresentaram hipertrofia compensatória do septo, evidenciada pela medida histológica da espessura desse tecido (fig.13). O que demonstra que algumas alterações morfológicas ocorreram em nível cardíaco. A partir disso é possível especular que seja necessário um tempo maior do que 12 semanas, além de uma disfunção cardíaca mais severa para caracterizar um quadro mais característico de IC.

Sumarizando os resultados encontrados para a caracterização da IC: apesar de não haver um consenso para a caracterização de quadros de IC em ratos e o estudo dessa síndrome multifatorial em ratas serem ainda mais raros, as ratas dos grupos IM (INT+IM e OVX+IM) não caracterizaram um quadro característico de IC. Não foram observadas alterações hemodinâmicas, tampouco no consumo de O₂, apesar das ratas dos grupos IM apresentarem diminuições consistentes nas variáveis IVO₂ e Distância Percorrida. As medidas ecocardiográficas demonstraram que algumas medidas (FE, FS, VSF, DSVE, TCIV, E e IDM) estavam piores nos grupos IM, no entanto as avaliações histológicas apontam para um IM com uma área de acometimento classificada como moderada. Apesar da observação de

uma hipertrofia do septo cardíaco, para a observação de sintomas e a caracterização do quadro de IC faz-se necessário uma maior disfunção cardíaca deflagrada por um IM de maior proporção (<46%) o que por sua vez elevará as taxas de mortalidade de maneira considerável.

5.4 – A caracterização da CC

Evidências científicas demonstram que a CC está relacionada a quadros de IC graves, em que a disfunção cardíaca é severa e quando a área acometida pela injúria miocárdica é de grandes proporções (etiologia isquêmica). Quando presente, o quadro de CC é considerado um marcador independente de mortalidade nessa síndrome.

Para caracterizá-la, foram observadas diversas variáveis. Classicamente a CC é definida como a perda involuntária de 5% do peso corporal em um período de 12 meses, acompanhado de uma doença de base (EVANS et al., 2008). O estudo de Palus (2009) (PALUS et al., 2009) utilizou-se de um modelo de ratas a partir dos nove meses de idade, idade em que se observa a estabilização o peso corporal nessa espécie. Contudo, mesmo nesses animais que já possuíam o peso corporal estável não foi possível observar diminuição no peso característica da IC.

No presente estudo também não foi observado essa perda de massa no momento “Final” (Fig.10) entre os animais dos grupos IM (INT+IM e OVX+SHAM) quando comparados aos animais dos grupos SHAM (INT+SHAM e OVX+SHAM), fato este que seria um forte indicativo da não houve ocorrência da caquexia.

Também foi estudada a densidade do m. sóleo a fim de traçar o quadro de CC. O quadro de intolerância aos esforços, frequente em pacientes com IC, pode estar relacionado à uma má perfusão periférica, principalmente da musculatura esquelética. No entanto, há estudos que não observaram essa diminuição na densidade capilar do músculo esquelético.

As adaptações periféricas (musculoesqueléticas) são observadas tardiamente em relação a adaptações centrais (cardíaca) (LUNDE et al., 2015). Portanto, é importante considerar alguns fatores que podem influenciar em diferentes respostas na densidade capilar em decorrência da IC, uma delas é o próprio modelo estudado, o grau de disfunção cardíaca, o

grupo muscular estudado e a metodologia empregada para a quantificação dos capilares (BACURAU, 2007).

No presente estudo não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, para a variável razão capilar- fibra (Fig.15).

Além disso, pode-se destacar que em modelos experimentais de IC nem sempre é observado o quadro de atrofia muscular, uma vez que este quadro parece estar relacionado com a gravidade da disfunção cardíaca e, conseqüentemente, com o tamanho do IM e da gravidade da IC.

Esperava-se que, após 12 semanas de disfunção cardíaca, as ratas (dos grupos IM) desenvolvessem algum grau de atrofia das fibras musculares e que esta atrofia estivesse agravada pela privação dos hormônios ovarianos (grupo OVX+IM), no entanto não observou-se diferenças significativas em nenhum dos grupos estudados.

Sumarizando os resultados das variáveis estudadas para a caracterização da CC: não houve diminuição do peso corporal no momento “Final” nos grupos IM (INT+IM e OVX+IM); também não foram observadas diferenças estatísticas na densidade capilar e na área de secção transversa do m. sóleo. As ratas não caracterizaram quadro de CC após 12 semanas de disfunção cardíaca pelo IM, pois talvez seja necessário um IM de maior magnitude, afim de promover uma IC mais grave ou ainda um tempo maior (mais que 12 semanas) para o desenvolvimento do quadro de CC.

6 – CONCLUSÕES

No presente estudo não se observou desenvolvimento da CC em ratas. Parece que o desenvolvimento de CC está condicionado à severidade da IC. Sobre o efeito da IC na produção de hormônios sexuais, deve-se aguardar a finalização das dosagens hormonais.

Referências Bibliográficas

7. – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMI ANDREOLLO, N. et al. RAT'S AGE VERSUS HUMAN'S AGE: WHAT IS THE RELATIONSHIP? Idade do rato versus idade humana: qual é a relação? **ABCD Arq Bras Cir Dig**, v. 25, n. 1, p. 49–51, 2012.

ALBUQUERQUE, D. C. DE et al. I Brazilian Registry of Heart Failure - Clinical Aspects, Care Quality and Hospitalization Outcomes. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 104, n. 6, p. 433–42, 2015.

ANKER, S.; CAMINITI, G.; VOLTERRANI, M. Gender related issues in the management of heart failure. **Current pharmaceutical design**, v. 17, n. 11, p. 1070–8, jan. 2011.

ANKER, S. D. et al. The influence of muscle mass, strength, fatigability and blood flow on exercise capacity in cachectic and non-cachectic patients with chronic heart failure. **European heart journal**, v. 18, n. 2, p. 259–69, fev. 1997.

BACURAU AVN. **Caracterização fenotípica do músculo esquelético na cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática** [dissertação] . São Paulo: Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo; 2007.

BELL, J. R. et al. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase inhibition suppresses post-ischemic arrhythmogenesis and mediates sinus bradycardic recovery in reperfusion. **International journal of cardiology**, v. 159, n. 2, p. 112–8, 23 ago. 2012.

BENEDICT, C. R. Neurohumoral aspects of heart failure. **Cardiology clinics**, v. 12, n. 1, p. 9–23, fev. 1994.

BLENCK, C. L. et al. The importance of biological sex and estrogen in rodent models of cardiovascular health and disease. **Circulation Research**, v. 118, n. 8, p. 1294–1312, 2016.

BRANDÃO RONDON, M. U. P. et al. Postexercise blood pressure reduction in elderly hypertensive patients. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 39, n. 4, p. 676–82, 20 fev. 2002.

BRUM, P. C. et al. Abnormal cardiac function associated with sympathetic nervous system hyperactivity in mice. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 283, n. 5, p. H1838–45, nov. 2002.

CHEN, Y. F. et al. Post-myocardial infarction left ventricular myocyte remodeling: Are there gender differences in rats? **Cardiovascular Pathology**, v. 20, n. 5, p. e189–e195, 2011.

CRABBE, D. L. et al. Gender differences in post-infarction hypertrophy in end-stage failing hearts. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 41, n. 2, p. 300–306, 2003.

CUNHA, T. F. et al. Exercise training prevents oxidative stress and ubiquitin-proteasome system overactivity and reverse skeletal muscle atrophy in heart failure. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 2012.

CURL, C. L.; WENDT, I. R.; KOTSANAS, G. Effects of gender on intracellular. **Pflügers Archiv : European journal of physiology**, v. 441, n. 5, p. 709–16, fev. 2001.

DANTAS, E. M. et al. Carvedilol recovers normal blood pressure variability in rats with myocardial infarction. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 177, n. 2, p. 231–236, 2013.

ELIAS LLK, ROSA FF, ANTUNES-RODRIGUES J, CASTRO M. Glândula Adrenal. In: Aires MM. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 1080-1095

ER, F. et al. Testosterone induces cytoprotection by activating ATP-sensitive K⁺ channels in the cardiac mitochondrial inner membrane. **Circulation**, v. 110, n. 19, p. 3100–7, 9 nov. 2004.

EVANS, W. J. et al. Cachexia: A new definition. **Clinical Nutrition**, v. 27, n. 6, p. 793–799, 2008.

FLETCHER, P. J. et al. Left ventricular diastolic pressure-volume relations in rats with healed myocardial infarction. Effects on systolic function. **Circulation research**, v. 49, n. 3, p. 618–26, 1 set. 1981.

FLORES, L. J. et al. Effects of exercise training on autonomic dysfunction management in an experimental model of menopause and myocardial infarction. **Menopause (New York, N.Y.)**, v. 17, n. 4, p. 712–717, 2010.

GOLDMAN, S.; RAYA, T. E. Rat infarct model of myocardial infarction and heart failure. **Journal of cardiac failure**, v. 1, n. 2, p. 169–77, mar. 1995.

GOLDSTEIN, J.; SITES, C. K.; TOTH, M. J. Progesterone stimulates cardiac muscle protein synthesis via receptor-dependent pathway. **Fertility and sterility**, v. 82, n. 2, p. 430–6, ago. 2004.

GOMES-SANTOS IL. **Angiotensina II e treinamento físico na Insuficiência Cardíaca: implicações para a miopatia esquelética** [tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2013.

GOMES-SANTOS, I. L. et al. Effects of exercise training on circulating and skeletal muscle renin-angiotensin system in chronic heart failure rats. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–11, 2014.

GROSS, M.-L. et al. Effects of estrogens on cardiovascular structure in uninephrectomized SHRsp rats. **Kidney international**, v. 67, n. 3, p. 849–57, mar. 2005.

HE, J. et al. Risk factors for congestive heart failure in US men and women: NHANES I epidemiologic follow-up study. **Archives of internal medicine**, v. 161, n. 7, p. 996–1002, 9 abr. 2001.

HUANG, C. et al. Testosterone-down-regulated Akt pathway during cardiac ischemia/reperfusion: a mechanism involving BAD, Bcl-2 and FOXO3a. **The Journal of surgical research**, v. 164, n. 1, p. e1–11, nov. 2010.

IRIGOYEN, M.-C. et al. Exercise training improves baroreflex sensitivity associated with oxidative stress reduction in ovariectomized rats. **Hypertension**, v. 46, n. 4, p. 998–1003, out. 2005.

- ISHIHARA, Y. et al. Suppression of myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibitors of cytochrome P450 in rats. **European journal of pharmacology**, v. 611, n. 1-3, p. 64–71, 2 jun. 2009.
- JANKOWSKA, E. A et al. Anabolic deficiency in men with chronic heart failure: prevalence and detrimental impact on survival. **Circulation**, v. 114, n. 17, p. 1829–37, 24 out. 2006.
- JAZBUTYTE, V. et al. Aromatase inhibition attenuates desflurane-induced preconditioning against acute myocardial infarction in male mouse heart in vivo. **PloS one**, v. 7, n. 8, p. e42032, jan. 2012.
- JOHNSTONE, D. et al. Clinical characteristics of patients in studies of left ventricular dysfunction (SOLVD). **The American journal of cardiology**, v. 70, n. 9, p. 894–900, 1 out. 1992.
- KOVACHEVA, E. L. et al. Testosterone supplementation reverses sarcopenia in aging through regulation of myostatin, c-Jun NH2-terminal kinase, Notch, and Akt signaling pathways. **Endocrinology**, v. 151, n. 2, p. 628–38, fev. 2010.
- LANG, R. M. et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography. **Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography**, v. 18, n. 12, p. 1440–63, dez. 2005.
- LISUREK, M.; BERNHARDT, R. Modulation of aldosterone and cortisol synthesis on the molecular level. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 215, n. 1-2, p. 149–159, 2004.
- LITWIN, S. E. et al. Gender differences in postinfarction left ventricular remodeling. **Cardiology**, v. 91, n. 3, p. 173–183, 1999.
- LIU, A. et al. Testosterone enhances estradiol's cardioprotection in ovariectomized rats. **The Journal of endocrinology**, v. 212, n. 1, p. 61–9, jan. 2012.
- LIU, J.; TSANG, S.; WONG, T. M. Testosterone is required for delayed cardioprotection and enhanced heat shock protein 70 expression induced by preconditioning. **Endocrinology**, v. 147, n. 10, p. 4569–77, out. 2006.
- LOPES, R. D. et al. Changes in the Production of IL-10 and TNF- α in Skeletal Muscle of Rats with Heart Failure Secondary to Acute Myocardial Infarction. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 94, n. 3, p. 293–300, 2010.
- LUNDE, P. K. et al. Contraction and Intracellular Ca²⁺ Handling in Isolated Skeletal Muscle of Rats With Congestive Heart Failure. 2015.
- MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian journal of biology = Revista brasileira de biologia**, v. 62, n. 4A, p. 609–14, nov. 2002.
- MARTINEZ, PF; ZORNOFF, LAM; CAMPOS, DHF; OLIVEIRA JR, AS; DAMATO, RL; COSUEN, C. Caracterização clínica e anátomo-patológica da insuficiência cardíaca induzida

por infarto do miocárdio em ratos. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 88 (14), 2007.

MARTINEZ, D. G. et al. Effects of long-term exercise training on autonomic control in myocardial infarction patients. **Hypertension**, v. 58, n. 6, p. 1049–1056, 2011.

MCMURRAY, J. et al. Trends in hospitalization for heart failure in Scotland 1980-1990. **European heart journal**, v. 14, n. 9, p. 1158–62, set. 1993.

MOREIRA, J. B. N. et al. High- versus moderate-intensity aerobic exercise training effects on skeletal muscle of infarcted rats. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 114, n. 8, p. 1029–41, abr. 2013.

NAM, U. H. et al. The effect of chronic exogenous androgen on myocardial function following acute ischemia-reperfusion in hosts with different baseline levels of sex steroids. **The Journal of surgical research**, v. 142, n. 1, p. 113–8, set. 2007.

NEKOOEIAN, A. A.; PANG, C. C. Estrogen restores role of basal nitric oxide in control of vascular tone in rats with chronic heart failure. **Am.J.Physiol**, v. 274, n. 0002-9513 (Print) LA - eng PT - Journal Article PT - Research Support, Non-U.S. Gov't RN - 0 (Delayed-Action Preparations) RN - 0 (Drug Implants) RN - 0 (Enzyme Inhibitors) RN - 0 (Vasodilator Agents) RN - 15078-28-1 (Nitroprusside) RN - 50-28-2 (Estradio, p. H2094–H2099, 1998.

O'MEARA, E. et al. Sex differences in clinical characteristics and prognosis in a broad spectrum of patients with heart failure: results of the Candesartan in Heart failure: Assessment of Reduction in Mortality and morbidity (CHARM) program. **Circulation**, v. 115, n. 24, p. 3111–20, 19 jun. 2007.

PALUS, S. et al. The influence of age and sex on disease development in a novel animal model of cardiac cachexia. **International journal of cardiology**, v. 133, n. 3, p. 388–93, 17 abr. 2009.

PAVÓN, N. et al. Sexual hormones: Effects on cardiac and mitochondrial activity after ischemia-reperfusion in adult rats. Gender difference. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 132, n. 1-2, p. 135–146, 2012.

PFEFFER, M. A et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. **Circulation research**, v. 44, n. 4, p. 503–12, abr. 1979.

POCHMANN, D. et al. Ovariectomy and estradiol replacement therapy alters the adenine nucleotide hydrolysis in rat blood serum. **Thrombosis research**, v. 114, n. 4, p. 275–81, jan. 2004.

RAYA, T. E. et al. Serial changes in left ventricular relaxation and chamber stiffness after large myocardial infarction in rats. **Circulation**, v. 77, n. 6, p. 1424–1431, 1 jun. 1988.

RODINO-KLAPAC, L. R. et al. Inhibition of myostatin with emphasis on follistatin as a therapy for muscle disease. **Muscle & nerve**, v. 39, n. 3, p. 283–96, mar. 2009.

ROESCH, D. M. et al. Rat model for investigating ACTH-independent angiotensin-induced aldosterone secretion. **Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS**, v. 1, n. 1, p. 36–9, mar. 2000.

ROLIM, N. P. L. et al. The decreased oxygen uptake during progressive exercise in ischemia-induced heart failure is due to reduced cardiac output rate. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 39, n. 2, p. 297–304, fev. 2006.

SCHANK, J. C. Do Norway rats (*Rattus norvegicus*) synchronize their estrous cycles? **Physiology & Behavior**, v. 72, n. 1-2, p. 129–139, jan. 2001.

SINOWAY, L. I.; LI, J. A perspective on the muscle reflex: implications for congestive heart failure. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 99, n. 1, p. 5–22, jul. 2005.

SMITH, M. S.; FREEMAN, M. E.; NEILL, J. D. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. **Endocrinology**, v. 96, n. 1, p. 219–26, jan. 1975.

TOFLER, G. H. et al. Effects of gender and race on prognosis after myocardial infarction: adverse prognosis for women, particularly black women. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 9, n. 3, p. 473–82, mar. 1987.

TUFFERY, A. . **Laboratory Animals: an introduction for experimenters**. 2nd. ed. [s.l.] Chichester: John Wiley, 1995.

VESCOVO, G. et al. Apoptosis of skeletal muscle myofibers and interstitial cells in experimental heart failure. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 30, n. 11, p. 2449–59, nov. 1998.

VOLTERRANI, M.; ROSANO, G.; IELLAMO, F. Testosterone and heart failure. **Endocrine**, 24 jun. 2012.

WATTANAPERMPOOL, J. Increase in calcium responsiveness of cardiac myofilament activation in ovariectomized rats. **Life sciences**, v. 63, n. 11, p. 955–64, jan. 1998.

WU, Y. et al. Acute myocardial infarction in rats. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 48, p. 2–5, jan. 2011.

ZORNOFF, L. A. M. et al. Infarto do miocárdio experimental em ratos: análise do modelo. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 93, n. 4, p. 434–440, out. 2009.

ANEXO 1

Anexo 1 – Tabela com o peso corporal dos diferentes tecidos normalizados pela tíbia e pelo peso corporal dos animais

Grupo Variáveis	INT+SHAM n = 10	INT+IM n = 14	OVX+SHAM n = 9	OVX+IM n = 10	P
Tíbias (cm)	4,20 ± 0,11	4,10 ± 0,17	4,2 ± 0,18	4,18 ± 0,17	0,879
Úteros					
Úteros (g)	0,95 ± 0,28	0,76 ± 0,26	0,22 ± 0,07 *†	0,13 ± 0,03 *†	<0,001
Úteros/Tíbia* (g/cm)	22 (18 - 27)	16 (14 - 21)	4,8 (4,2 - 6,1) *†	3,2 (2,6 - 3,9) *†	0,001
Úteros/PC* (g/g)	0,31 (0,24 - 0,35)	0,23 (0,19 - 0,27)	0,05 (0,05 - 0,07) *†	0,03 (0,03 - 0,04) *†	<0,001
Adrenais					
Adrenais (mg)	29 ± 5	30 ± 7	23 ± 4	20 ± 4 *†	0,002
Adrenais/Tíbia (mg/cm)	6,9 ± 1,3	7,1 ± 1,8	5,7 ± 0,9	5,0 ± 1,0 *†	0,007
Adrenais/PC** (g/g)	0,08 (0,07-0,10)	0,10 (0,07-0,11)	0,06 (0,05-0,06) *†	0,05 (0,04-0,06) *†	<0,001
Pulmão					
Pulmões (mg)	2457 (2134 - 2771)	2476 (2027 - 3017)	2722 (2081 - 3507)	2299 (1987-3340)	0,074
Pulmões/Tíbia (mg/cm)	582 (507 - 650)	572 (530 - 680)	664 (520 - 816)	540 (464 - 801)	0,342
Pulmões/PC * (g/g)	0,74 (0,66 - 0,91)	0,76 (0,64 - 0,90)	0,71 (0,56 - 0,95)	0,60 (0,50 - 0,89)	0,552

As variáveis estão expressas como média ± desvio padrão da média e mediana (IQR). INT= ratas intactas; IM= infarto do miocárdio; SHAM= cirurgia fictícia do IM; OVX= ooforectomia; Tíbias= comprimento da tíbia; Úteros = peso dos úteros; Úteros/Tíbia* = peso dos úteros normalizados pelo comprimento da tíbia (multiplicados por 100); Adrenais = média do peso das glândulas adrenais; Adrenais/Tíbia* = média do peso das glândulas adrenais normalizados pelo comprimento da tíbia (multiplicados por 100); Adrenais/PC**= média do peso das glândulas adrenais normalizados pelo peso corporal dos animais (multiplicado por 1000); Pulmões= peso dos pulmões; Pulmões/Tíbia= peso dos pulmões normalizados pelo comprimento da tíbia; Pulmões/PC*= peso dos pulmões normalizados pelo peso corporal (multiplicados por 100). *= P<0,05 vs INT+SHAM; †=P<0,05 vs INT+IM; ‡=P,0,05vs OVX+SHAM.