

UFRRJ

INSTITUO DE BIOLOGIA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

DISSERTAÇÃO

**DIMORFISMO SEXUAL NO MODELO DE INFARTO DO
MIOCÁRDIO EM RATOS: ASPECTOS NEUROENDÓCRINOS,
AUTONÔMICOS CARDIOVASCULARES.**

NATALIA SOARES CARVALHO DE SOUZA

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

DIMORFISMO SEXUAL NO MODELO DE INFARTO DO
MIOCÁRDIO EM RATOS: ASPECTOS NEUROENDÓCRINOS E
AUTONÔMICOS CARDIOVASCULARES.

NATALIA SOARES CARVALHO DE SOUZA

Sob a Orientação do Professor

Emerson Lopes Olivares

Dissertação submetida como requisito parcial para
obtenção do grau de **Mestre em Ciências**
Fisiológicas no Programa Multicêntrico de Pós-
Graduação em Ciências Fisiológicas, área de
concentração em Fisiologia.

Seropédica, RJ

Agosto de 2014

616.1237

S729d

T

Souza, Natalia Soares Carvalho de, 1988-
Dimorfismo sexual no modelo de infarto
do miocárdio em ratos: aspectos
neuroendócrinos e autonômicos
cardiovasculares / Natalia Soares Carvalho
de Souza. - 2014.
100 f.: il.

Orientador: Emerson Lopes Olivares.

Dissertação (mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de
Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas,
2014.

Bibliografia: f. 77-100.

1. Infarto do miocárdio - Teses. 2.
Estrógenos - Efeito fisiológico - Teses. 3.
Hormônios tireoidianos - Teses. 4.
Dimorfismo sexual (Animais) - Teses. 5.
Rato como animal de laboratório - Teses. I.
Olivares, Emerson Lopes, 1973- II.
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

NATALIA SOARES CARVALHO DE SOUZA

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências Fisiológicas** no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM / / 2014

Prof. Dr. Emerson Lopes Olivares - UFRRJ
(Orientador)

Profª Drª Fabícia Viana Fonseca

Profª Drª Norma Aparecida dos Santos Almeida

Esta dissertação é dedicada aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Dr. Emerson Lopes Olivares, por todo ensinamento e encorajamento. Por me mostrar o que é ciência e me manter sempre empolgada com a pesquisa apesar de todas as dificuldades. Por toda atenção e importância que sempre deu aos meus experimentos e resultados, desde a Iniciação Científica!!! Agradeço também por ter sido além de um excelente orientador, um ótimo professor, me fazendo ter coragem de estagiar na área de Fisiologia, que eu já gostava, mas julgava difícil demais para mim.

Agradeço ao Programa Multicêntrico, por ter possibilitado que fizesse o Mestrado em Ciências Fisiológicas sem ser obrigada a sair da Rural e do DCF!!!!

Agradeço ao Prof. Luis por ter sido quem me apresentou a Fisiologia, nas suas aulas de graduação, que ele ministrava com tanto prazer e dedicação que me fizeram apaixonar por essa disciplina. À Prof^a. Michelle por todo suporte para as dosagens de hormônios tireoidianos e atividade de desidase, e principalmente pela imprescindível ajuda na análise dos resultados relacionados ao Radioimunoensaio!!!!!! Ao Cristiano, pelas INÚMERAS avaliações ecocardiográficas, tão importantes para o meu trabalho!!!! Ao Prof. Wellington, por todo ensinamento e ajuda, seja com seus conhecimentos sobre melhores vias de administração, drogas e doses, seja pela boa vontade em ajudar no que precisasse no laboratório. À Prof^a. Alba por facilitar e otimizar o nosso trabalho com toda sua organização e confecção dos protocolos!!!

Agradeço aos funcionários do DCF, representados pelo “seu Juca” e Dona Leni, por facilitarem o nosso trabalho de diversas formas. Ao Franklin, por toda atenção aos prazos e datas, pela ajuda com toda burocracia que por muitas vezes só ele entende sabe resolver.

Agradeço ao Raoni pela imensa ajuda em toda parte de estudo hidroeletrólítico!!!! Por ter me ensinado a trabalhar com a gaiola metabólica e também ter me ajudado na plotagem desses resultados. À Mari, anestesista oficial de todos os meus experimentos! Pela ajuda em todas as etapas, mas especialmente por fazer aumentar consideravelmente a sobrevida dos meus animais, com as técnicas anestésicas!!!

Agradeço ao Anderson e Rafael pela ajuda nas cirurgias!!!! À Brícia e Cema Por toda ajuda com seus conhecimentos sobre o estudo hidroeletrólítico!!! Aos colegas Verônica, Bruno, Fernando, Renata, Aline, Phelipe, Cema, Raoni, Mari, pela ajuda no último dia de cada etapa do experimento que começava às 18h e só terminava 1h!!!

Agradeço à Nati e Tine, pelos finais de semana e madrugadas realizando Radioimuno, para as dosagens de T3, T4 e atividade de D1!!!! Além da companhia nas disciplinas do Fundão! Ao Rodrigo e Nayana, também pela companhia nas disciplinas e nas atividades de Radioimuno. À Carla, pela companhia agradável e principalmente pela sua senha do email da Rural, pra que eu pudesse acessar os periódicos CAPES de casa e escrever a dissertação!!!!!!!!!!!!!! Ao Robertinho e Claudinho pela companhia agradável de sempre! E pela pronta ajuda sempre que necessário. À Güí, por me apresentar o laboratório, me ensinar a trabalhar com os ratos (sem medo!), a coletar sangue, administrar drogas etc, etc, etc! Por me ensinar a gostar de todo o trabalho no laboratório!!! E principalmente por fazer tudo isso sempre com muito carinho e boa vontade!!!

Agradeço aos grandes amigos Andrea e Raphael que me incentivaram a entrar no Departamento, mesmo não sendo eles do DCF!!!

Agradeço ao Fábio, meu namorado, por todo carinho, apoio e compreensão pelos finais de semana que eu precisava estar no laboratório!!!!

À minha irmã Fernanda, por ter sempre tanto cuidado e proteção comigo, apesar de tão pouca diferença de idade. Mas agradeço, principalmente, por me dar a minha sobrinha Manuela, linda, que faz a minha vida mais alegre todos os dias!!! E pela Manu, eu também tenho que agradecer ao meu cunhado (duas vezes!) Fabiano.

Agradeço especialmente aos meus pais por tudo que me ensinaram, pelo equilíbrio emocional que me proporcionaram e de que eu tanto precisei desde que fui para a Rural. Agradeço também pelo apoio incondicional e confiança que sempre tiveram nas minhas escolhas!!!! Obrigada por toda generosidade, amor e carinho. E por estarem sempre ao meu lado!

RESUMO

Sabe-se que mulheres na pré-menopausa apresentam menor prevalência de doenças cardiovasculares do que homens e, esta diferença desaparece após a menopausa. Sendo assim, o presente estudo buscou avaliar o dimorfismo sexual e a influência do estrógeno nas alterações da função cardíaca, do equilíbrio hidroeletrólítico e do *status* tireoidiano de ratos Wistar submetidos ao infarto do miocárdio (IM) experimental.

Na primeira etapa ratos wistar machos (n = 18) e fêmeas (n = 21) foram submetidos ao infarto experimental (INF.M e INF.F) ou à falsa cirurgia (Sham.M e Sham.F). Na primeira e quarta semana pós-IM foram colocados em gaiolas metabólicas e submetidos à ecodopplercardiografia (ECO) e eletrocardiografia (análise espectral), seguido de eutanásia para coleta de sangue (dosagem sérica de hormônios tireoidianos) e de tecidos (coração, pulmão e fígado, para biometria). Na segunda etapa, fêmeas foram ovariectomizadas (n = 24) ou mantidas intactas (n = 21) e após duas semanas submetidas ao infarto do miocárdio (INF_{OVX} e INF_{INT}) ou à falsa cirurgia (Sham_{OVX} e Sham_{INT}). Quatro semanas após pós-IM, as mesmas avaliações da etapa anterior foram realizadas exceto a eletrocardiográfica. Na terceira etapa, foi realizada ovariectomia e reposição com estrógeno (E2) (n = 13) ou veículo (n = 22). Após duas semanas foi realizada a cirurgia de indução ao infarto (INF_{OVX+E2} e INF_{OVX+Veic}) e a falsa cirurgia (Sham_{OVX+E2} e Sham_{OVX+Veic}). Decorridas quatro semanas foram feitas as mesmas avaliações da segunda etapa.

O grupo INF_M desenvolveu disfunção cardíaca (fração de encurtamento, FE_{Enc}%, ~70% de redução) e alterações na regulação hidroeletrólítica (aumento do apetite por sódio, ~146% e redução do volume urinário, ~55%), uma semana pós-IM e, portanto, mais cedo que as fêmeas, que apresentaram alterações na função cardíaca (FE_{Enc}%, ~28% de redução) e regulação hidroeletrólítica (aumento do apetite por sódio, ~143%) na quarta semana pós-IM. O grupo INF_M apresentou redução na relação LF/HF (~70%), uma semana pós-IM. E, apenas os ratos machos desenvolveram hipotireoidismo após o infarto. Também foi observada redução da FE_{Enc}% (~55%), aumento da relação átrio esquerdo/ aorta (AE/Ao, ~75%) e alterações na regulação hidroeletrólítica (redução do apetite por sódio, ~67% e do volume urinário, ~40%) mais pronunciadas em INF_{OVX} do que em INF_{INT}. O grupo INF_{OVX} também apresentou redução dos níveis séricos de T3 (~35%) pós-IM. O grupo INF_{OVX+Veic} mostrou redução da FE_{Enc}% (~55%) e aumento na relação AE/Ao (~75%) mais pronunciadas que o grupo INF_{OVX+E2}. INF_{OVX+Veic} reduziu o apetite por sódio (~67%) e, no volume urinário, foi observada redução significativa nos grupos Sham_{OVX+Veic} e INF_{OVX+Veic} em relação aos grupos Sham_{OVX+E2} e INF_{OVX+E2} (P<0,05). O T3 sérico reduziu significativamente (~35%) apenas no grupo INF_{OVX+Veic}. Houve diferença no desenvolvimento fisiopatológico da insuficiência cardíaca (IC) pós-IM entre machos e fêmeas, sendo mais brando nas fêmeas. E fêmeas infartadas apresentaram uma regulação hidroeletrólítica mais favorável e compatível com o desenvolvimento menos acentuado da IC. O estrógeno influenciou positivamente a regulação hidroeletrólítica de fêmeas infartadas, o que favoreceu a função cardíaca e atenuou desta forma, a disfunção que ocorre após o infarto. A manutenção do status eutireoideo não pareceu ser determinante para o desenvolvimento menos pronunciado da IC.

ABSTRACT

Premenopausal women are less prone to develop cardiovascular diseases than men and this advantage do not persist in postmenopausal women. Thus herein we aimed to investigate the gender difference and the estrogen influence in cardiac function, fluid balance and thyroid status, in Wistar rats subjected to experimental model of myocardial infarction (MI).

In the first step, adult male (n = 18) and female (n = 21) rats underwent experimental MI (MI_M and MI_F) or sham-operation (Sham_M and Sham_F) respectively. One and four weeks post-MI rats were placed in metabolic cages, subjected to echocardiography (ECHO), electrocardiography and then euthanized for blood sample collection and tissue collection (heart, lung and liver). In the second step female rats were ovariectomized (n = 24) or continued intact (n = 21), two weeks later they were subjected to MI (MI_{OVX} and MI_{INT}, respectively) or sham operation (Sham_{OVX} and Sham_{INT}). Four weeks post-MI, they were subjected to the same evaluations of the first step, not only the electrocardiography. In the third step, female rats were subjected to ovariectomy and treated with estrogen (E2) (n = 13) or vehicle (n = 22). Two weeks later they underwent experimental MI (MI_{OVX+E2} and MI_{OVX+Veh}). Four weeks post-MI they were subjected to the same evaluations of the second step.

Male infarcted rats developed cardiac dysfunction (shortening fraction, SF, reduction, ~70%) and fluid homeostasis changes (sodium intake increasing, ~146% and urinary volume reduction, ~55%) earlier than female, in the first week post-MI while female presented these changes (SF reduction, ~28% and sodium intake increasing, ~143%) only in the fourth week and attenuated compared to male. MI_M showed reduction in LF/HF ratio (~70%), one week post-MI. And only male rats presented hypothyroidism after MI (T4 ~52% and T3 ~38%, reduction). We also verified reduction in SF (~55%), increasing in LA/Ao ratio (~75%) and changes in fluid balance (sodium intake reduction, ~67% and urinary volume reduction, ~40%) more pronounced in MI_{OVX} than in MI_{INT}. MI_{OVX} group reduced thyroid hormone levels after MI (T3 ~35%). MI_{OVX+Veh} showed more pronounced reduction in SF (~55%) and increasing in LA/Ao ratio (~75%) than the MI_{OVX+E2} group. The sodium intake reduced in MI_{OVX+Veh} (~67%) and in the urinary volume we verified significant reduction in Sham_{OVX+Veh} and MI_{OVX+Veh} groups compared to Sham_{OVX+E2} and MI_{OVX+E2} groups (P < 0.05). Serum T3 reduced significantly (~35%) only in MI_{OVX+Veh} group.

The pathophysiological development of heart failure post-MI was attenuated in female compared to male. And female rats subjected to MI presented fluid balance more favorable and related to the less pronounced development of heart failure. Estrogen seems to influence positively the cardiac function and attenuate the dysfunction that occur post-MI. The euthyroid status in female intact do not seems to be determinant to the less pronounced development of heart failure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reações básicas de desidatação	11
Figura 2. Fórmula estrutural do colesterol	14
Figura 3. Biossíntese de estrógenos – Modelo duas células-dois hormônios	15
Figura 4. Algoritmo do racional dos experimentos planejados em cada etapa	25
Figura 5. Desenho representativo do procedimento para obtenção do infarto experimental.	27
Figura 6. Protocolo experimental da primeira etapa do projeto	35
Figura 7. Protocolo experimental da segunda etapa do projeto	36
Figura 8. Protocolo experimental da terceira etapa do projeto	37
Figura 9. Estudo da geometria e das funções sistólica e diastólica do coração por meio de exame ecodopplercardiográfico. A: Relação entre os diâmetros internos do átrio esquerdo e aorta. B: Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo. C: Fração de encurtamento. D: Relação das velocidades de fluxo diastólico transvalvar mitral. Nos grupos INF.M, Sham.M, INF.F e Sham.F.	40
Figura 10. Peso relativo do coração. A: 1 semana após infarto experimental. B: 4 semanas após infarto experimental. grupos INF.M, Sham.M, INF.F e Sham.F.	41
Figura 11. Peso relativo do pulmão. A: 1 semana após infarto experimental. B: 4 semanas após infarto experimental. grupos INF.M, Sham.M, INF.F e Sham.F.	41
Figura 12. Peso relativo do fígado. A: 1 semana após infarto experimental. B: 4 semanas após infarto experimental. grupos INF.M, Sham.M, INF.F e Sham.F.	41
Figura 13: Estudo da variabilidade da frequência cardíaca. A: Componente de baixa frequência . B: Componente de alta frequência. C: Relação do componente de baixa frequência pelo componente de alta frequência. Nos grupos INF.M, Sham.M, INF.F e Sham.F.	43

Figura 14. Avaliação da ingestão de água (A). Avaliação da ingestão de salina hipertônica (B). Avaliação da preferência por sódio (C). Dos grupos INF.M, Sham.M, INF.F e Sham.F.	45
Figura 15. Avaliação do volume urinário dos grupos INF.M, Sham.M, INF. e Sham.F.	46
Figura 16. Avaliação dos níveis séricos de T4 (A) e T3 (B). Grupos INF.M, Sham.M, INF.F e Sham.F.	47
Figura 17. Estudo da geometria e das funções sistólica e diastólica do coração por meio de exame ecodopplercardiográfico. A: Relação entre os diâmetros internos do átrio esquerdo e aorta. B: Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo. C: Fração de encurtamento. D: Relação das velocidades de fluxo diastólico transvalvar mitral. Nos grupos Sham _{INT} , INF _{INT} , Sham _{OVX} e INF _{OVX} .	40
Figura 18: Peso relativo do coração (A), pulmão (B) e fígado (C). Dos grupos Sham _{INT} , INF _{INT} , Sham _{OVX} e INF _{OVX} .	50
Figura 19. Avaliação da ingestão de água (A). Avaliação da ingestão de salina hipertônica (B). Avaliação da preferência por sódio (C). Dos grupos Sham _{INT} , INF _{INT} , Sham _{OVX} e INF _{OVX} .	52
Figura 20. Avaliação do volume urinário dos grupos Sham _{INT} , INF _{INT} , Sham _{OVX} e INF _{OVX} .	52
Figura 21. Avaliação dos níveis séricos de T4 (A) e T3 (B). Grupos Sham _{INT} , INF _{INT} , Sham _{OVX} e INF _{OVX} .	54
Figura 22. Determinação da atividade da iodotironina desiodase tipo 1 (D1) nos grupos Sham _{INT} , INF _{INT} , Sham _{OVX} e INF _{OVX} .	55
Figura 23. Estudo da geometria e das funções sistólica e diastólica do coração por meio de exame ecodopplercardiográfico. A: Relação entre os diâmetros internos do átrio esquerdo e aorta. B: Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo. C: Fração	56

de encurtamento. D: Relação das velocidades de fluxo diastólico transvalvar mitral. Nos grupos Sham_{OVX+Veic}, INF_{OVX+Veic}, Sham_{OVX+E2} e INF_{OVX+E2}.

Figura 24: Peso relativo do coração (A), pulmão (B) e fígado (C). Dos 57

grupos Sham_{OVX+Veic}, INF_{OVX+Veic}, Sham_{OVX+E2} e INF_{OVX+E2}.

Figura 25. Avaliação da ingestão de água (A). Avaliação da ingestão de salina 59

hipertônica (B). Avaliação da preferência por sódio (C). Dos grupos Sham_{OVX+Veic}, INF_{OVX+Veic}, Sham_{OVX+E2} e INF_{OVX+E2}.

Figura 26. Avaliação do volume urinário dos grupos Sham_{OVX+Veic}, 59

INF_{OVX+Veic}, Sham_{OVX+E2} e INF_{OVX+E2}.

Figura 27. Avaliação dos níveis séricos de T4 (A) e T3 (B). Grupos Sham_{OVX+Veic}, 59

INF_{OVX+Veic}, Sham_{OVX+E2} e INF_{OVX+E2}.

Figura 28. Determinação da atividade da iodotironina desiodase tipo 1 (D1) 55

nos grupos Sham_{OVX+Veic}, INF_{OVX+Veic}, Sham_{OVX+E2} e INF_{OVX+E2}.

LISTA DE ABREVIATURAS

AE	ÁTRIO ESQUERDO
AngioII	ANGIOTENSINA II
ANP	PEPTÍDEO NATRIURÉTICO ATRIAL
Ao	AORTA
AP	ÁREA PÓSTREMA
AT1	RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II TIPO 1
AVP	ARGININA VASOPRESSINA
CVOs	ÓRGÃOS CIRCUMVENTRICULARES
D1	DESIODASE TIPO 1
D2	DESIODASE TIPO 2
D3	DESIODASE TIPO 3
DDFVE	DIÂMETRO DIASTÓLICO FINAL DO VENTRÍCULO ESQUERDO
DSFVE	DIÂMETRO SISTÓLICO FINAL DO VENTRÍCULO ESQUERDO
ER	RECEPTOR DE ESTROGÊNIO
FEnc%	FRAÇÃO DE ENCURTAMENTO
HF	ALTA FREQUÊNCIA
HT	HORMÔNIO TIREOIDIANO
IAM	INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO
IC	INSUFICIÊNCIA CARDÍACA
ICC	INSUFICIÊNCIA CARDÍACA CONGESTIVA
ICM	INFARTO CICATRIZADO DO MIOCÁRDIO
IM	INFARTO DO MIOCÁRDIO
LAD	ARTÉRIA CORONÁRIA DESCENDENTE ANTERIOR
LF	BAIXA FREQUÊNCIA
MHC	CADEIA PESADA DE MIOSINA

NTS	NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO
OT	OCITOCINA
OVLT	ÓRGÃO VASCULOSO DA LÂMINA TERMINAL
OVX	OVARIECTOMIA
PDFVE	PRESSÃO DIASTÓLICA FINAL DO VENTRÍCULO ESQUERDO
PLB	FOSFOLAMBAM
SERCA	CÁLCIO ATPase DE RETÍCULO SARCO/ENDOPLASMÁTICO
SFO	ÓRGÃO SUBFORNICAL
SNA	SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO
SNC	SISTEMA NERVOSO CENTRAL
SRA	SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA
T3	TRIIODOTIRONINA
T4	TIROXINA
TR	RECEPTORES PARA HORMÔNIOS TIREOIDIANOS
TSH	TIROXINA
VDFVE	VOLUME DIASTÓLICO FINAL DO VENTRÍCULO ESQUERDO
VE	VENTRÍCULO ESQUERDO
VFC	VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos epidemiológicos das doenças cardiovasculares	1
1.2 Infarto cicatrizado	2
1.3 Modelo experimental do infarto cicatrizado do miocárdio	3
1.3.1 Características anatomohistopatológicas	4
1.3.2 Características funcionais	5
1.3.3 Respostas homeostáticas neuro-humorais	6
1.4 Regulação hidroeletrólítica	8
1.4.1 Regulação do fluido corporal	8
1.4.2 Regulação hidroeletrólítica e insuficiência cardíaca	9
1.5 Hormônios tireoidianos	10
1.5.1 Metabolismo dos hormônios tireoidianos	10
1.5.2 Hormônios tireoidianos e insuficiência cardíaca congestiva	12
1.6 Estrógeno	13
1.6.1 Síntese de estrógeno	13
1.6.2 Transporte e metabolismo de estrógenos	15
1.6.3 Mecanismo de ação do estrógeno	16
1.6.4 Estrógeno e o sistema cardiovascular	17
1.6.5 Estrógeno e a regulação hidroeletrólítica	19
1.6.6 Estrógeno e a função tireoidiana	20
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivos Gerais	21
2.2 Objetivos Específicos	22
3 JUSTIFICATIVA	22

4 MATERIA E MÉTODOS	23
4.1 Apreciação Bioética da Experimentação Animal	23
4.2 Animais	23
4.3 Grupos experimentais	23
4.4 Técnica de produção do infarto	25
4.5 Ovariectomia e reposição hormonal	27
4.6 Exame ecocoppler cardiográfico	27
4.6.1 Preparação dos animais	27
4.6.2 Ecocardiógrafo	28
4.6.3 Imagens	28
4.6.4 Medidas	28
4.6.4.1 Geometria do coração	29
4.6.4.2 Função sistólica	29
4.6.4.3 Função diastólica	29
4.7 Estudo da variabilidade da frequência cardíaca	30
4.7.1 Preparação dos animais e realização dos registros eletrocardiográficos	30
4.7.2 Processamento dos sinais da variabilidade da frequência cardíaca	31
4.8 Estudo hidroeletrólítico	31
4.8.1 Aferição da ingestão de água e sódio basais e volume urinário	31
4.9 Estudo bioquímico	32
4.9.1 Dosagem plasmática de tiroxina (T4) e triiodotironina (T3)	32
4.9.2 Atividade iodotironina desidase tipo 1 (D1)	32
4.10 Análise estatística	33
4.11 Protocolos experimentais	34
5 RESULTADOS	37

5.1 1ª Etapa: estudo seriado no modelo de infarto do miocárdio em ratos machos e fêmeas - avaliação do dimorfismo sexual	37
5.1.1 Ecodopplercardiografia	38
5.1.2 Biometria	40
5.1.3 Balanço autonômico cardíaco – Análise espectral	42
5.1.4 Regulação hidroeletrólítica	43
5.1.4.1 Avaliação da ingestão de fluidos	43
5.1.4.2 Volume urinário	45
5.1.5 Avaliação endócrina	46
5.1.5.1 Dosagem sérica dos hormônios tireoidianos	46
5.2 2ª Etapa: estudo da participação das gônadas femininas nas alterações encontradas 4 semanas após o infarto do miocárdio	47
5.2.1 Ecodopplercardiografia	48
5.2.2 Biometria	49
5.2.3 Regulação hidroeletrólítica	51
5.2.3.1 Avaliação da ingestão de fluidos	51
5.2.3.2 Volume urinário	52
5.2.4 Avaliação endócrina	53
5.2.4.1 Dosagem sérica dos hormônios tireoidianos	53
5.2.4.2 Atividade da iodotironina desiodase tipo 1 (D1)	54
5.3 3ª Etapa: estudo da influência do estrógeno nas alterações encontradas 4 semanas após o infarto do miocárdio	55
5.3.1 Ecodopplercardiografia	55
5.3.2 Biometria	57
5.3.3 Regulação hidroeletrólítica	58

5.3.3.1 Avaliação da ingestão de fluidos	58
5.3.3.2 Volume urinário	59
5.3.4 Avaliação endócrina	60
5.3.4.1 Dosagem sérica dos hormônios tireoidianos	60
5.3.4.2 Atividade da iodotironina de desidase tipo 1 (D1)	60
6 DISCUSSÃO	61
6.1 1ª Etapa: estudo seriado no modelo de infarto do miocárdio em ratos machos e fêmeas - avaliação do dimorfismo sexual	61
6.2 2ª Etapa: estudo da participação das gônadas femininas nas alterações encontradas 4 semanas após infarto do miocárdio	67
6.3 3ª Etapa: estudo da influência do estrógeno nas alterações encontradas 4 semanas após infarto do miocárdio	72
7 CONCLUSÕES	75
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Segundo a Organização Mundial de Saúde, as doenças cardiovasculares lideram as causas de morte no mundo, sendo responsáveis por 30% das mortes no ano de 2008 em todo o mundo (WHO, 2011). Doenças isquêmicas graves assim como processos hipertensivos, relacionados principalmente ao estresse e a má alimentação, juntamente com o tabagismo e alcoolismo, têm sido os grandes causadores das doenças cardiovasculares (WHO, 2011). Dentre as doenças cardiovasculares, a hipertrofia ventricular constitui um indicador de grande relevância no risco de morbidade e mortalidade cardiovascular. Segundo *Framingham Heart Study*, os indivíduos que apresentam hipertrofia ventricular, diagnosticada por alterações eletrocardiográficas, apresentam risco de morte seis vezes maior que a população em geral (KANNEL *et al.*, 1983). No Brasil, o panorama não é diferente, as doenças cardiovasculares lideram o ranking de morte em nosso país, sendo responsáveis por 30,69% das mortes no ano de 2011, segundo dados do Ministério da Saúde (SIM, 2011). Considerando ainda a atual limitação farmacológica para o tratamento da insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (BEER *et al.*, 2007), a busca por novas estratégias terapêuticas mais eficazes, baseadas em estudos pré-clínicos, tem granjeado muita atenção da comunidade médica e científica. Para tanto, foi preciso encontrar modelos fidedignos de indução à ICC em animais de laboratório e utilizá-los em testes pré-clínicos e clínicos objetivando a descoberta de novas condutas terapêuticas.

O quadro de ICC é caracterizado por várias alterações como, acúmulo de fluido, aumento da influência do sistema nervoso autônomo simpático (SNAs) e alteração da regulação barorreflexa, dentre outras (ZUCKER *et al.*, 1995). Durante o seu desenvolvimento a função cardíaca é comprometida, e mecanismos neurohumorais são ativados em resposta ao baixo débito cardíaco. Alguns desses mecanismos são pouco eficientes e acabam acarretando mudanças em diversos parâmetros cardiovasculares que podem diminuir o bombeamento de sangue aos tecidos. A situação se agrava quando o processo hipertrófico do músculo cardíaco se estabelece em resposta a diversos estímulos locais e sistêmicos. A essas e outras alterações morfológicas do órgão, chamamos de “remodelamento cardíaco”.

A despeito dos recentes avanços da medicina, a insuficiência cardíaca (IC) continua sendo responsável por elevados níveis de morbidade e mortalidade no mundo

inteiro, como descrito anteriormente. No entanto, estudos epidemiológicos mostraram que dentre os pacientes que desenvolvem insuficiência cardíaca, existem diferenças marcantes quando se leva em consideração o sexo. Mulheres na pré-menopausa têm menor prevalência de hipertrofia cardíaca do que homens (GARDIN *et al.*, 1995) e o prognóstico para mulheres é melhor do que para homens com IC causada por doenças não-isquêmicas (SIMON *et al.*, 2001). Mulheres têm maior prevalência de função sistólica preservada e menor incidência de disfunção ventricular do que homens com IC (VASAN *et al.*, 1999; CLELAND *et al.*, 2003). Em pacientes idosos, com níveis similares de estenose aórtica, as mulheres apresentam a função cardíaca mais bem preservada do que os homens (BUTTRICK & SCHEUER, 1992). A diferença sexual também é nítida em modelos de hipertrofia e hipertensão em ratos. Neste caso, ratos machos apresentam uma progressão mais acelerada no desenvolvimento fisiopatológico da IC comparados as fêmeas (TAMURA *et al.*, 1999; WALLEN *et al.*, 2000). Embora esses estudos têm sugerido que as fêmeas apresentam evolução fisiopatológica de IC mais branda, os mecanismos que fundamentam esta hipótese estão longe de serem estabelecidos.

1.2 INFARTO CICATRIZADO

O infarto do miocárdio (IM) em humanos é caracterizado pela presença de tecido fibroso formado entre a 6^a e a 12^a semana após a fase aguda da doença isquêmica. Estruturalmente, o miocárdio lesado se modifica e apresenta uma cicatriz fibrosa neovascularizada, transmural ou subendocárdica, constituída por uma densa camada de fibras colágenas e fibroblastos, que define o “infarto cicatrizado do miocárdio” (ICM) (MALLORY *et al.*, 1939; FISHBEIN *et al.*, 1978b; FACTOR, 1990). O tecido miocárdico sobrevivente pode também sofrer modificações anatomopatológicas que variam em intensidade devido a fatores estruturais (extensão da lesão e características do processo cicatricial) e hemodinâmicos (sobrecarga volumétrica) que se instalam desde a fase aguda, devido à necrose tecidual. Estas modificações abrangem: hipertrofia, aumento da cavidade ventricular e, em alguns casos, formação de aneurisma, caracterizando um processo conhecido como “remodelamento cardíaco” (ELLIS *et al.*, 1962; FACTOR, 1990; PFEFFER & BRAUNWALD, 1990). Pacientes com ICM caracterizam-se clinicamente por apresentarem arritmias ventriculares, “angina *pectoris*”, e insuficiência cardíaca,

principalmente em infartos de grande extensão (JULIAN, 1989; MORRIS *et al.*, 1990), e tornam-se vulneráveis à morte súbita (HAGSTROM *et al.*, 1964; PANIDIS & MORGANROTH, 1983; KEMPF & JOSEPHSON, 1994). Nos primeiros cinco anos pós-infarto a taxa de mortalidade destes pacientes alcança 5 a 10% ao ano (NORRIS *et al.*, 1974; KANNEL *et al.*, 1979; POHJOLA *et al.*, 1980) e a incidência de morte súbita encontra-se aumentada, sobretudo devido à ocorrência de arritmias ventriculares complexas (batimentos prematuros repetitivos acoplados, multifocais ou precoces, e surtos de taquicardia ventricular) (KOTLER *et al.*, 1973; RUBERMAN *et al.*, 1981). Além dos trabalhos clínicos, citados anteriormente, utilizando o eletrocardiograma (ECG) contínuo tipo “Holter”, outras abordagens, como o mapeamento endocárdico por cateterização, sugerem mecanismos de reentrada, isto é, arritmias cardíacas induzidas pela condução lenta e bloqueio unidirecional, como responsáveis pela taquicardia ventricular em pacientes com ICM (JANSE & WIT, 1989), uma vez que há baixa velocidade de condução na região próxima ao infarto (WIENER *et al.*, 1982; MARCHLINSKI, 1990).

1.3 MODELO EXPERIMENTAL DO INFARTO CICATRIZADO DO MIOCÁRDIO

O modelo experimental de oclusão da artéria coronária em ratos foi descrito primeiramente no ano de 1946, por Robert F. Heimbürger, que estudava a revascularização do miocárdio através da injeção de substâncias no saco pericárdico. Oito anos mais tarde (1954), Johns & Olson se preocuparam em descrever a mesma técnica com mais propriedade, dando inclusive, detalhes sobre a distribuição das artérias coronárias em diferentes espécies de animais de laboratório e procurando estabelecer um modelo de infarto agudo do miocárdio (IAM). Em 1959, Kaufman, Gava, e Hill publicaram dados morfológicos e histoquímicos, observados em ratos com IAM, obtidos pela técnica de oclusão da artéria coronária descendente anterior; mas foi em 1978, com Fishbein *et al.* (1978a), que este modelo experimental promoveu grande contribuição, sendo até hoje um dos trabalhos mais citados como referência para detalhamento da técnica. A partir daí, multiplicaram-se os trabalhos destinados ao estudo do modelo de IAM. Trabalhos como os de Pfeffer *et al.* (1979), Spadaro *et al.* (1979), Pfeffer *et al.* (1985), e Pfeffer *et al.* (1991) deram também grande contribuição

ao modelo e são altamente recomendados para leitura tanto para os iniciantes como para os experientes da técnica.

1.3.1 Características anatomohistopatológicas

Em ratos, a completa oclusão da artéria coronária descendente anterior esquerda (LAD) leva a uma isquemia transmural e, conseqüentemente, ao infarto da parede livre do ventrículo esquerdo (VE), que varia em extensão dependendo do sucesso do procedimento cirúrgico e da anatomia particular do rato. O ICM do rato é, em geral, caracterizado por aumento da massa cardíaca total (NORMAN & COERS, 1960; ANVERSA *et al.*, 1984; OLIVETTI *et al.*, 1986; SPADARO *et al.*, 1989), devido ao aumento do ventrículo direito, ou seja, há aumento do peso absoluto e relativo, quando normalizado pelo peso corporal (NORMAN & COERS, 1960; TUREK *et al.*, 1978; FLETCHER *et al.*, 1981; ANVERSA *et al.*, 1984; OLIVETTI *et al.*, 1986; SPADARO *et al.*, 1989). Quanto ao ventrículo esquerdo, seu peso relativo tende a manter-se constante (TUREK *et al.*, 1978; PFEFFER *et al.*, 1979; SPADARO *et al.*, 1989) devido à perda tecidual da região necrosada e à hipertrofia da massa muscular remanescente, que se compensam (OLIVETTI *et al.*, 1986).

A evolução histopatológica do infarto experimental no rato tem características gerais similares às do infarto humano, sendo, porém, mais rápido e com resposta polimorfonuclear menos intensa (SELYE *et al.*, 1978). O rápido e completo desenvolvimento do infarto dá-se em função do baixo fluxo colateral nesta espécie (HEARSE *et al.*, 1988). Ao término da fase de cicatrização, por volta do 21º dia após a cirurgia, a análise histológica revela ausência quase total de necrose, sinais discretos de edema, hemorragia e congestão, poucos linfócitos, presença moderada de fibroblastos, células pigmentadas (hemossiderina), proliferação vascular e altos níveis de colágeno intersticial (FISHBEIN *et al.*, 1978a; NOVAES, 1992). A hipertrofia foi evidenciada em vários trabalhos através da análise histológica de miócitos de ambos os ventrículos, que mostraram aumento do diâmetro e da área de secção reta, além de aumento do comprimento dos cardiomiócitos ventriculares esquerdos (TUREK *et al.*, 1978; ANVERSA *et al.*, 1984; SPADARO *et al.*, 1989; OLIVETTI *et al.*, 1991). O grau de hipertrofia dos miócitos do VE parece variar de acordo com a distância a que se encontram da cicatriz da lesão. Assim, na borda da região cicatrizada (parede livre de VE) encontram-se miócitos com o diâmetro transversal maior do que aqueles situados a

uma distância maior desta região (septo interventricular, por exemplo) (OLIVETTI *et al.*, 1991).

A análise ultraestrutural das células ventriculares esquerda revelou, em corações com grande infarto, aumento do volume percentual das miofibrilas, redução do volume percentual de mitocôndrias e diminuição da relação volume mitocondrial/volume miofibrilar. Porém, no ventrículo direito e no ventrículo esquerdo de corações com infartos pequenos estas alterações não foram observadas. Quanto ao comprimento do sarcômero dos miócitos do VE, não houve alterações, independente do tamanho do infarto (ANVERSA *et al.*, 1986).

1.3.2 Características Funcionais

A função ventricular esquerda é imediatamente diminuída, como evidenciado pela depressão da pressão sistólica desenvolvida pelo ventrículo esquerdo, elevação da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo e diminuição do débito cardíaco, devido à perda do miocárdio viável (ZIMMER *et al.*, 1989). Sendo assim, o miocárdio não isquêmico precisa compensar a perda de tecido tanto no aspecto metabólico como funcional. No passado, os termos hipertrofia concêntrica e excêntrica eram aplicados, frequentemente, para caracterizar alterações morfológicas do ventrículo esquerdo em resposta às sobrecargas de pressão e de volume, respectivamente (LINZBACH, 1960; GROSSMAN *et al.*, 1975). A sobrecarga pressórica evoca aumento da espessura da parede com o volume da câmara essencialmente normal. Por outro lado, a sobrecarga de volume induz aumento do volume da câmara com alterações variáveis da espessura da parede. Assim, parece que a parede do ventrículo direito de ratos com intensa redução da função ventricular esquerda desenvolve, inicialmente, hipertrofia concêntrica, devido à sobrecarga de pressão. Apesar disso, ambas as câmaras estão distendidas e os miócitos estão similarmente alongados (ZIMMER *et al.*, 1990).

O clássico estudo de Pfeffer *et al.* (1979), classificaram os infartos em pequenos, moderados e grandes quando a percentagem da cicatriz alcançava de 4 a 30%, 31 a 46%, e 46 a 59% da área do VE, respectivamente, e detectaram, em infartos grandes, redução da pressão arterial sistólica, aumento da pressão diastólica final do VE (PDFVE), redução do débito cardíaco, do volume sistólico e do trabalho externo (produto do volume sistólico pela diferença entre as pressões arterial média e atrial direita) corrigidos pelo peso corpóreo. Em infartos moderados, houve redução da

pressão sistólica e, em pequenos infartos, nenhum dos parâmetros sofreu alterações significativas.

Utilizando critérios diferentes para a classificação dos infartos (cicatrizes com < 30%, entre 30 e 39% e > 39% da circunferência ventricular para infartos pequenos, médios e grandes respectivamente), Fletcher *et al.* (1981) observaram diminuição da pressão arterial sistólica e aumento da PDFVE apenas em infartos moderados e grandes. Porém, sinais de insuficiência foram observados quando os animais foram submetidos à sobrecarga de volume ou oclusão aórtica. Assim, as respostas esperadas a estas manipulações, isto é, aumentos do débito cardíaco, do volume sistólico e da pressão sistólica máxima do VE, foram diminuídos. Além disso, todos os grupos infartados exibiram resposta exagerada quanto ao aumento da PDFVE em relação ao controle.

Estudando corações isolados na forma de “workingheart”, Fellenius *et al.* (1985) relataram redução da contratilidade do VE de corações com infartos crônicos e diminuição da sensibilidade ao cálcio extracelular.

A despeito das alterações hemodinâmicas, distúrbios importantes das funções respiratória e metabólica, tais como: o coeficiente respiratório, pH e gases arteriais, concentração arterial do bicarbonato, saturação da hemoglobina, hematócrito e temperatura, não parecem ser relevantes em ratos com ICM, como verificado por Turek *et al.* (1978) e Musch *et al.* (1986).

Sob o aspecto bioquímico, Bester *et al.* (1972) demonstraram que o metabolismo da glicose e as concentrações de fosfatos de alta energia não se alteram no ICM com três meses de evolução, sugerindo que as alterações contráteis nestes corações não dependem destes fatores metabólicos.

1.3.3 Respostas Homeostáticas Neuro-humorais

Em um processo de infarto, como o causado por isquemia da artéria coronária, a perfusão sanguínea do músculo cardíaco fica diminuída, com conseqüente comprometimento de sua função. Isto leva a ativação de respostas homeostáticas, como o aumento da atividade do SNAs e do sistema Renina – Angiotensina – Aldosterona (SRAA), ambos vinculados à manutenção da função cardiovascular bem como a ativação de respostas concernentes a regulação hidroeletrólítica, tais como: aumento do

apetite e da reabsorção renal de sódio e água, que em longo prazo levam ao desenvolvimento de ICC.

A ICC, devido ao infarto do miocárdio, é iniciada por disfunção sistólica e dilatação das câmaras ventriculares, com aumento da pressão de enchimento ventricular esquerda, que se torna necessário para sustentar um débito cardíaco adequado e, conseqüentemente, perfusão tecidual normal. O recrutamento da alça neuro-humoral na ICC é similar ao de estados hipovolêmicos (COURNEYA & KORNER, 1991): o SNAs e o SRAA agem no sentido de restaurar a pressão arterial por meio da vasoconstricção e da retenção de fluídos. Porém, na insuficiência cardíaca, a homeostase não pode ser estabelecida devido à persistência da disfunção ventricular esquerda. Assim, na ausência de uma alça de *feedback* negativo, o que seria vantajoso sob o ponto de vista homeostático, torna-se parte de um ciclo vicioso que acaba por piorar ainda mais o quadro fisiopatológico.

Sabendo-se do aumento significativo da atividade do SNAs após o infarto do miocárdio, é razoável que se busque ferramentas para avaliar a atividade do sistema nervoso autônomo nesta condição. Neste contexto, Hon e Lee (1965) foram os primeiros a relatar a diferença entre intervalos RR em batimentos cardíacos sucessivos. E desde então, a variabilidade entre os intervalos RR passou a ser utilizada para avaliar a modulação do sistema nervoso autônomo no coração. Já o prognóstico significativo da variabilidade dos intervalos RR em pacientes após o infarto do miocárdio foi publicado pela primeira vez por Wolf e colaboradores em 1978. Após este trabalho, diversos estudos foram realizados abordando a variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e o IM em pacientes (LOMBARDI *et al.*, 1987; VAISHNAV *et al.*, 1994; MALIK *et al.*, 2000; STEIN *et al.*, 2000; CAMM *et al.*, 2004; STEIN *et al.*, 2005; CARPEGGIANI *et al.*, 2005). Em estudos que avaliaram a VFC ao longo do tempo, após o IM em pacientes, foi visto que há redução da VFC logo após o infarto, e que esta se mantém por duas semanas, sendo seguida de recuperação. Estes dados sugerem que há aumento da modulação simpática de forma aguda pós-IM, mas que, no entanto, esta não se sustenta por um período superior a duas semanas (LOMBARDI *et al.*, 1987; BIGGER *et al.*, 1991)

Francis *et al.* (2001), estudaram de forma seriada o *status* neuro-humoral na insuficiência cardíaca. Utilizando o clássico modelo de ligadura da artéria coronária descendente anterior em ratos, eles demonstraram que a fração de ejeção do ventrículo esquerdo foi reduzida imediatamente (um dia após a cirurgia) a níveis compatíveis com

o processo de insuficiência cardíaca e se manteve inalterada após a segunda, quarta e sexta semanas pós-infarto. Por outro lado, o volume diastólico final do ventrículo esquerdo (VDFVE) aumentou significativamente no primeiro dia e continuou aumentando progressivamente após a segunda, quarta e sexta semanas pós-infarto. Dentro dos limites impostos pelo aumento do estresse de parede ventricular, este aumento de volume do VE trouxe efeitos hemodinâmicos benéficos do ponto de vista do aumento do volume sistólico, a despeito da persistente diminuição da fração de ejeção. É claro que a ativação do SRA tem papel importante neste processo devido à sua conhecida participação no aumento da pressão de enchimento da câmara ventricular esquerda, neste caso, já dilatada. Após a segunda semana, e persistindo até a sexta semana pós-infarto, houve elevada ativação do SRA (medida em termos de “atividade da renina plasmática”), embora esta tenha reduzido suavemente a partir da quarta semana. Quando se correlacionou fração de ejeção e atividade do SRA, houve alta correlação entre esses parâmetros na sexta semana pós-infarto.

Os autores ainda salientaram no estudo de Francis *et al.* (2001) que, neste modelo, o volume sistólico estabilizou-se (a partir da 4ª semana) em nível máximo de compensação enquanto o VDFVE continuou aumentando progressivamente até o fim da observação (6ª semana). Assim, a dilatação progressiva, na ausência do aumento adicional do volume sistólico, determinou a exaustão do ganho compensatório produzido pelo remodelamento ventricular. Por fim, a continuidade da ativação neuro-humoral causou, dentre vários efeitos, retenção de fluidos, vasoconstrição periférica e taquicardia, impondo ao sistema homeostático características maladaptativas.

1.4 REGULAÇÃO HIDROELETROLÍTICA

1.4.1 Regulação do Fluido Corporal

Ao longo da vida, mudanças constantes ocorrem no meio externo e interno, que requerem uma perfusão sanguínea adequada de todos os tecidos do corpo, para que seja ofertado “combustível” suficiente para o metabolismo celular. O fluido corporal deve ser distribuído em volume e pressão apropriados para facilitar as trocas de gases e nutrientes e, além disso, manter a concentração de eletrólitos adequada para função enzimática e eletrofisiológica. Para isso, o organismo dispõe de uma série de mecanismos que regulam os fluidos corporais, incluindo mecanismos que induzem a

sede, retenção ou excreção de água e eletrólitos. Neste contexto, o cloreto de sódio (NaCl) constitui um importante componente do fluido extracelular, sendo o principal determinante da osmolalidade plasmática, assim como do volume do fluido extracelular.

O aumento de 1-2% na osmolalidade plasmática, assim como a redução no volume do fluido extracelular e redução de cerca de 10% no volume sanguíneo ou na pressão arterial, é suficiente para deflagrar uma respostas homeostáticas neuroendócrinas e comportamentais (indução a sede e apetite por sódio) (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2004). As principais áreas do SNC que integram informações periféricas que envolvem a regulação hidroeletrólítica incluem o núcleo do trato solitário (NTS), que recebe sinais neurais viscerais e os órgãos circumventriculares (CVOs), que recebem sinais transmitidos pelo sangue. Os CVOs incluem a área postrema (AP), o órgão subfornical (SFO) e o órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT). A elevação de Na⁺ no plasma induz a liberação de vasopressina (AVP) levando a retenção de água pelos rins. Simultaneamente há aumento da liberação de ocitocina (OT) e do peptídeo natriurético atrial (ANP), induzindo a excreção de Na⁺. Estas alterações resultam na diluição do Na⁺ plasmático. Além disso, o aumento adicional do Na⁺ plasmático é prevenido pela inibição de mecanismos centrais que induzem o apetite ao sódio, como a inibição de aldosterona e angiotensina II (AngioII), estes dois hormônios em sítios centrais estimulam a ingestão de sal além de agirem periféricamente levando a retenção de Na⁺ (CURTIS, 2009).

As alterações no volume do fluido corporal também induzem respostas regulatórias. A perda de volume vascular, detectada por barorreceptores localizados no coração e pelos grandes vasos levam a ativação do SNAs com consequente vasoconstrição e taquicardia. Além disso, devido a perda de volume há liberação de AVP e AngioII, que atuam diretamente nos vasos sanguíneos produzindo vasoconstrição aumentando, dessa forma, os efeitos da ativação simpática. A vasopressina promove também a retenção de fluido, prevenindo redução ainda maior do volume de fluido corporal, enquanto que AngioII age em sítios centrais induzindo a ingestão de água e sódio.

1.4.2 Regulação Hidroeletrólítica e Insuficiência Cardíaca Congestiva

Condições patológicas cardiovasculares podem levar a alterações na homeostase hidroeletrólítica. Durante o desenvolvimento da ICC, como após o infarto agudo do

miocárdio, uma série de alterações centrais e periféricas é observada, podendo levar a redução da excreção urinária de água e sódio, com conseqüente desordem no equilíbrio do fluido corporal. Dentre as alterações periféricas, destacam-se o aumento de angioII e aldosterona, produtos do sistema renina angiotensina aldosterona, que participam da regulação hidroeletrólítica (FRANCIS, 1998). Em relação às respostas à ICC que envolvem o SNC está o aumento da sede e do apetite por sódio, retenção de água, hiponatremia e aumento da atividade simpática (JOHNSON & THUNHORST, 1997; MANGIAPANE *et al.*, 1984; BURRELL *et al.*, 1998; KNEPPER, 1998; LEENEN,1999). A hipotensão e a hipovolemia também induzem a liberação de vasopressina e ocitocina dos neurônios magnocelulares do núcleo supraóptico e paraventricular no hipotálamo (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2004; SMITH & DAY, 2003).

O desenvolvimento da ICC ocorre entorno da inter-relação dessas alterações centrais e periféricas, como ocorre com a ativação simpática e a ativação periférica do SRA, parecendo haver uma alça de “feedforward” entre esses sistemas. Desta forma, a angioII proveniente do sangue, atua sobre receptores de angiotensina II tipo 1 (AT1) no prosencéfalo, aumentando a atividade simpática, que por sua vez, atua nos rins, estimulando a liberação de renina, com conseqüente aumento da síntese de angioII (FELDER *et al.*, 2002). A ativação destes mecanismos em curto prazo compensa a função cardíaca deficiente, no entanto em longo prazo tem efeitos deletérios sobre o sistema cardiovascular.

1.5 HORMÔNIOS TIREOIDIANOS

1.5.1 Metabolismo dos Hormônios Tireoidianos

O principal produto da secreção tireoidiana é a tiroxina (T4), que é conhecida como um pré-hormônio por não ser biologicamente ativo (NUNES, 2003). Para isso, há a necessidade da conversão tiroxina a triiodotironina (T3), o componente que pode efetivamente ligar-se aos receptores para hormônios tireoidianos (TR) e mediar ações celulares hormônio-dependente (BIANCO & KIM, 2006). Já que a meia-vida do T4 é longa (1 semana em humanos), o papel do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide em regular a disponibilidade de T3 é realizado complementado pela ação das iodotironinas desidases, enzimas que ativam ou inativam os hormônios tireoidianos (HT)

(BIANCO *et al.*, 2002; BIANCO & KIM, 2006). As enzimas desiodases são classificadas em duas classes: as ativadoras (desiodase tipo 1, D1; desiodase tipo 2, D2) e a inibidora (desiodase tipo 3, D3), dos hormônios tireoidianos, sendo mais recentemente reconhecida também a atividade inibidora da D1. A diferença quanto ao papel ativador ou inibidor dessas enzimas sobre T3 e/ou T4 está no local de desiodação (Figura 1): as enzimas ativadoras retiram resíduo de iodo da posição 3' ou 5' do anel externo da tiroxina, enquanto que para inibição, há remoção de tal resíduo do anel interno do T4 e do T3 (BIANCO & KIM, 2002; GEREBEN *et al.*, 2001).

A enzima D1, em humanos, está presente principalmente em fígado, rim, tireóide (ISHII, *et al.*, 1982), e na hipófise. Em ratos, a D1 é expressa fígado, rim, SNC, intestino, tireoide e placenta (BIANCO *et al.*, 2002), havendo maior atividade em fígado e rim do que demais tecidos (KÖHRLE, 1994; LEONARD & KÖHRLE, 1996). Estudos relacionam a enzima D1 com uma síndrome que é caracterizada pela ocorrência de níveis séricos normais de T4, associado a níveis séricos de T3 reduzidos, em pacientes com doenças graves agudas e crônicas (CHOPRA, 1997; MCIVER, 1997). Estudos apontam uma relação entre a redução do T3, com uma redução da enzima desiodase tipo 1 no fígado. A D1 seria induzida no hepatócito, a nível transcripcional pelo T3 (TOYODA *et al.*, 1995) e, segundo Yu (2000) e Yu (2006), determinadas citocinas, como a IL-1 e IL-6 que estão elevadas em doenças graves, prejudicariam esta indução de D1 via T3, resultando na redução de T3 e intensificando conseqüentemente a queda na expressão de D1.

Estudos mostram que a enzima D2 (que é amplamente expressa e apresenta uma elevada afinidade pelo T4) é a predominante via de geração do T3 apresentando, conseqüentemente, uma importante função na homeostasia dos hormônios tireoidianos (VISSER, 1983; CRANTZ, 1982; GEREBEN *et al.*, 2008). Já a enzima D3, que normalmente é expressa no sistema nervoso central e na placenta tem por função determinar o término da ação dos hormônios tireoidianos atuando, conjuntamente com a D2, num fino mecanismo de regulação externa ao eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (GEREBEN *et al.*, 2007).

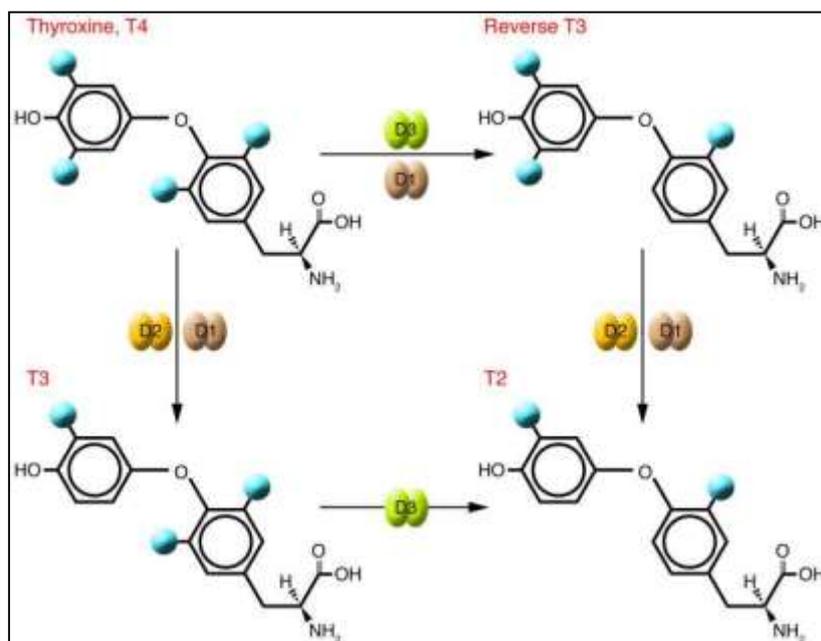


Figura 1: Reações básicas de desiodação. Fonte: BIANCO & KIM, 2006

1.5.2 Hormônios Tireoidianos e Insuficiência Cardíaca Congestiva

É bastante conhecida a modulação dos hormônios tireoidianos em, praticamente, todos os sistemas do organismo, influenciando o desenvolvimento, crescimento e metabolismo do indivíduo (BIANCO & KIM 2006). Sabe-se também que os hormônios tireoidianos têm como um de seus alvos principais o sistema cardiovascular (KLEIN & OJAMAA, 2001). Assim, esses hormônios modulam o sistema cardiovascular induzindo alterações no débito cardíaco, com a modulação na resistência vascular periférica e na contratilidade miocárdica. Condições de hipotireoidismo induzem disfunções sistólicas e diastólicas, com diminuição na frequência e na força de contração cardíaca, além de prolongar o relaxamento cardíaco. Desse modo, indivíduos com hipotireoidismo apresentam diminuição do cronotropismo e inotropismo cardíacos enquanto que, os hipertireóides, possuem alterações opostas (DILLMANN, 1990; KLEIN & OJAMAA, 1995; POLIKAR *et al.*, 1993; PAZOS-MOURA *et al.*, 2000). O metabólito celular ativo do hormônio tireoidiano, a triiodotironina (T3) regula, ainda, a expressão de genes no cardiomiócito independentes de seus efeitos no crescimento cardíaco e na síntese proteica (QI *et al.*, 1994). Alguns genes regulados pelo T3 incluem os da: cadeia pesada da miosina (MHC), fosfolambam (PLB) e a da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA-2), elementos importantes na contratilidade miocárdica (HE *et al.*, 1997; HOLT *et al.*, 1999; KAASIK *et al.*, 1997; KISS *et al.*, 1994). Nesse contexto, tendo em vista as ações diretas dos hormônios tireoidianos

sobre o sistema cardiovascular, iniciaram-se estudos visando avaliar possíveis alterações nessa relação, em condições patológicas. Alguns trabalhos têm reportado alterações no metabolismo dos hormônios tireoidianos em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva crônica. Hamilton *et al.*; (1990), por exemplo, relataram diminuição na conversão de T4 em T3 em pacientes humanos após infarto agudo do miocárdio, assim como Panciera & Refsal (1994) que demonstraram redução nas concentrações séricas desses hormônios em cães com histórico de cardiomiopatia congestiva. Franklin *et al.*, (1984) demonstraram que além da queda rápida e sustentada de T3 e da queda transiente de T4, houve aumento nos níveis séricos de T3 reverso. Já Hamilton *et al.*, (1993), estudando 84 pacientes com insuficiência cardíaca congestiva avançada, relatou queda de T3 plasmático e/ou aumento nos níveis de T3 reverso, a despeito dos níveis normais de T4. Aliás, este último resultado foi caracterizado pelos autores como parâmetro mais fidedigno de resposta ao processo de insuficiência cardíaca congestiva. Em um trabalho em nível experimental, Ojamaa *et al.* (2000), utilizando o modelo de infarto do miocárdio em ratos induzido pela oclusão permanente da artéria coronária esquerda, demonstraram queda de 54% nos níveis de T3 plasmático na terceira e na quarta semanas após a cirurgia. Nestes animais, houve redução paralela no RNA mensageiro para cadeia pesada de miosina da variedade α (α -MHC), Ca^{2+} ATPase de retículo sarco/endoplasmático isoforma 2 (SERCA-2) e canais para K^+ dependentes de voltagem Kv 1.5 e aumento do RNA mensageiro para β -MHC e fosfolambam (PLB). No ano de 2007, nosso grupo demonstrou que, imediatamente após o infarto do miocárdio em ratos, ocorre diminuição abrupta dos níveis séricos de T3 e de T4 provavelmente devido a indução ectópica da enzima desidase tipo 3, principal via metabólica dos hormônios tireoidianos, no tecido cardíaco infartado (OLIVARES *et al.* 2007). Entretanto, com a evolução do quadro os níveis séricos de T4 permanecem reduzidos a despeito da normalização das concentrações de T3 e tireotrofina (TSH). Até o momento, embora ainda não tenha sido descrita nenhuma hipótese para a normalização dos níveis séricos desses hormônios, dados do nosso laboratório sustentam a hipótese de hiperativação da D2 no tecido adiposo marrom de ratos infartados como um dos mecanismos responsáveis por este fenômeno (dados não publicados).

1.6 ESTRÓGENO

1.6.1 Síntese de Estrógeno

Os estrógenos endógenos, 17 β -estradiol, estrona e estriol, são esteróides com 18 átomos de carbono, derivados do colesterol e sintetizados nos ovários, testículos e glândulas adrenais (GRUBER *et al*, 2002). A síntese dos estrógenos é descrita a seguir.

Após se ligar a receptores lipoprotéicos, o colesterol é capturado por células esteroidogênicas e levado aos sítios de síntese de esteroides. Os diferentes hormônios esteroides são formados pela clivagem da cadeia lateral que se projeta do anel D do colesterol - reduzindo o número dos átomos de carbono de 27 para 18 - que ocorre nas mitocôndrias de tecidos formadores de hormônios esteroides. O passo limitante na produção de esteroides é a transferência do colesterol do citosol para a membrana interna mitocondrial, realizado pela proteína reguladora aguda da esteroidogênese - StAR. Todas as reações de hidroxilação e oxigenação que ocorrem durante a biossíntese de esteroides, são catalisadas por oxidases de função-mista (citocromo P450 mitocondrial), que utilizam NADPH e O₂ (NELSON & COX, 2000).

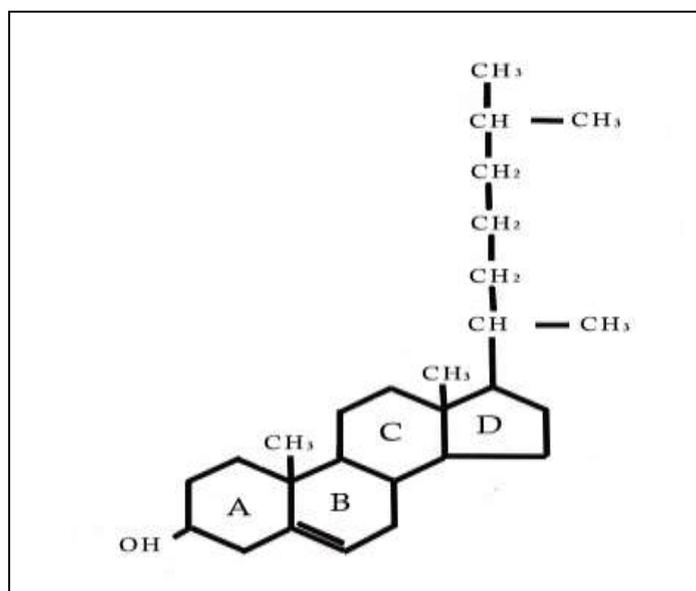


Figura 2: Fórmula estrutural do colesterol (Nelson & Cox, 2000)

A aromatização, último passo no processo de formação de estrógenos, é catalisada pelas aromatases do complexo enzimático citocromo P450, que funcionam

como desmetilases, e estão presentes no retículo endoplasmático liso (GRUBER *et al*, 2002). Essa etapa converte testosterona em estradiol, androstenediona em estrona e 16 α -hidroxiestrone em estriol (MEINHARDT & MULLIS, 2002). As fontes primárias de estradiol são as células da teca e as células granulosas dos ovários. Resumidamente, as células da teca secretam andrógenos, que se difundem para as células granulosas onde, sob ação das aromatasas, são transformadas em estrógenos. A estrona e o estriol são formados no fígado e ovários a partir do estradiol (GRUBER *et al*, 2002 e KLAASSEN, 2001).

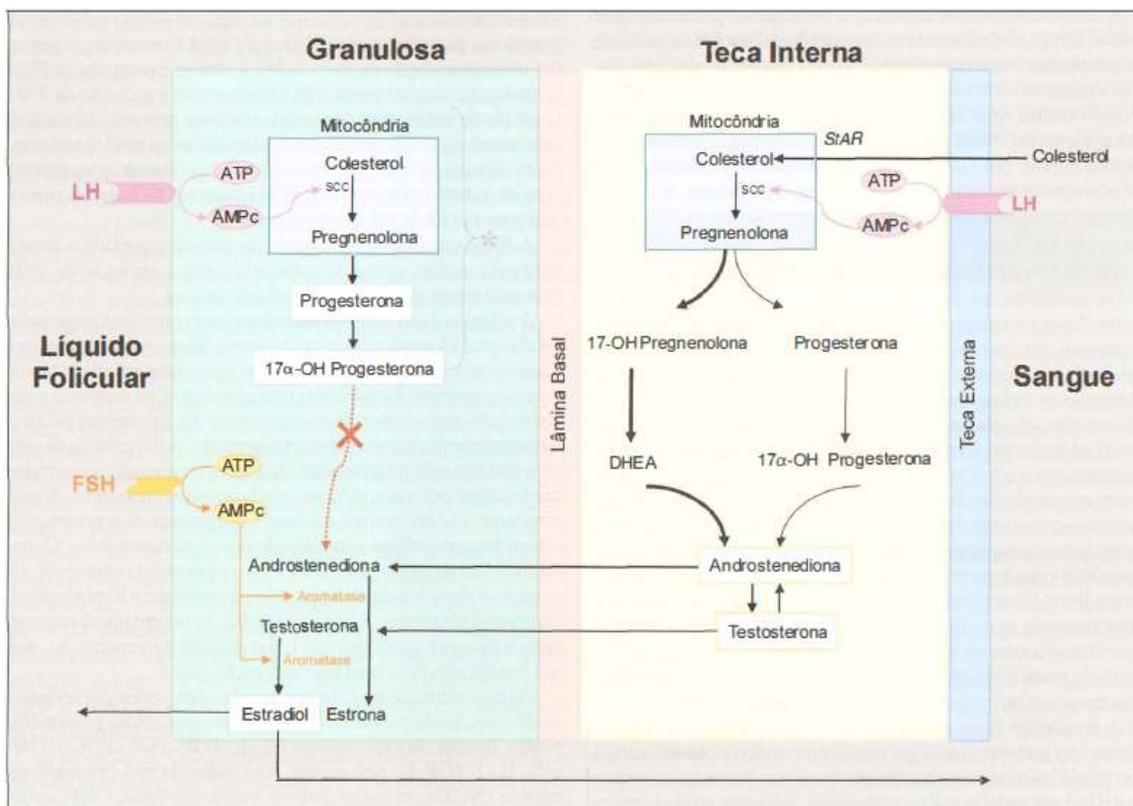


Figura 3: Biossíntese de estrógenos – Modelo duas células- dois hormônios (Aires, 3ª edição)

1.6.2. Transporte e Metabolismo de Estrógenos

Por serem altamente hidrofóbicos, os hormônios esteroides são transportados, por proteínas carreadoras específicas, dos órgãos produtores até os respectivos tecidos-alvos, onde passam para o meio intracelular por difusão simples e se ligam a receptores nucleares. (GRUBER *et al*, 2002).

O estradiol se liga de modo reversível a uma β -globulina (ligante de hormônios esteroides) e, com menos afinidade, à albumina. Cerca de 2 a 3 % do estradiol total se encontra livre no plasma (GRUBER *et al*, 2002).

Segundo Blom e colaboradores (2001), os estrógenos são metabolizados por sulfotransferases (sulfatação) ou pela UDP-glucuronosiltransferase (glucuronidação) e os conjugados são excretados na bile e na urina. A hidrólise desses conjugados pela flora intestinal possibilita a subsequente reabsorção do estrógeno, resultando em uma recirculação entero-hepática.

Os estrógenos também são metabolizados por hidroxilação e subsequente metilação, formando catecóis e estrógenos metoxilados (OSAWA *et al*, 1993). A hidroxilação de estrógenos leva a formação dos catecóis estrógenos, e.g., 2-hidroxiestrógenos, 4-hidroxiestrógenos e 16 α -hidroxiestrógenos. Dentre estes, a 4-hidroxiestrone e o 16 α -hidroxiestradiol são considerados carcinogênicos (GRUBER *et al*, 2002 e ZHU & LIEHR, 1993). A metilação de 2-hidroxiestrógenos e 4-hidroxiestrógenos pela catecol-O-metiltransferase dá origem a metabólitos metoxilados (GRUBER & HUBER, 2001). Os catecóis-estrógenos se ligam a receptores de estrogênio e possuem fraca atividade estrogênica em animais. Além disso, os catecóis-estrógenos são capazes de manter um processo de oxi-redução cíclico e contínuo formando quinonas intermediárias (GRUBER *et al*, 2002). Devido à formação de radicais livres durante esse processo, e a ligação covalente desses intermediários ao DNA, os estrógenos podem apresentar atividade genotóxica (LIEHR, 2000).

2.5.3 Mecanismo de Ação do Estrógeno

Os estrógenos desencadeiam suas ações biológicas (agonistas e antagonistas) em diferentes tipos celulares, por meio de ligação a receptores nucleares específicos, os receptores de estrogênio (ER), membros da superfamília dos receptores nucleares (que incluem também os receptores do ácido retinóico e de hormônios tireoidianos).

O ER livre no citoplasma ou localizado na membrana nuclear se encontra ligado a proteínas receptores-associadas. Estas proteínas servem como 'chaperones' que

estabilizam o receptor no seu estado inativo ou “mascaram” o domínio de ligação ao DNA do próprio receptor (SMITH & TOFT, 1993). A localização exata do ER (assim como de outros receptores de esteroides) não é totalmente conhecida, embora o mais provável seja que os receptores se encontrem distribuídos igualmente entre o citoplasma e o núcleo celular, equilíbrio este alterado após a ligação a estrógenos (GRUBER *et al.*, 2002).

Quando o estrógeno se difunde para o meio intracelular, ele se liga ao domínio de ligação ao ligante do receptor que, por sua vez, se dissocia dos seus ‘chaperones’. Esse complexo formado pelo receptor e pelo estrógeno (ER-E), se difunde para o interior do núcleo da célula e se liga a sequências específicas nas regiões promotoras do DNA, chamadas elementos de resposta a estrógenos. Dessa maneira ocorre a estimulação ou supressão da transcrição dos genes alvo dos estrógenos, também influenciada pela ligação a proteínas co-reguladoras (coativadores e co-repressores) (PETTERSSON *et al.*, 1997). Os estrógenos também podem regular a transcrição de genes que não possuem os elementos de resposta a estrógenos, interferindo com a atividade de outros fatores de transcrição, como por exemplo, ligando-se a subunidades da proteína de ativação-1 (WEBB *et al.*, 1995).

Estudos demonstram a presença de receptores do estrógeno alfa e beta nos cardiomiócitos e fibroblastos. Estes receptores do estrógeno são funcionais e tem mostrado regular a expressão de genes específicos do coração e o gene da conexina 43, responsáveis pela junção gap e regulada pelo estrógeno (SAUNDERS *et al.*, 1997, GROHE *et al.*, 1997). Níveis do RNAm do receptor alfa são os mesmos no coração de homens e mulheres. Por outro lado, os níveis do receptor beta são maiores nos corações de fêmeas (MAHMOODZADEH *et al.*, 2006).

Estudos mostram que o estrógeno também possui ações rápidas, através da ligação a receptores de membrana plasmática. A ligação do estrógeno a ERs de membrana promove sinalizações celulares que geram segundos mensageiros e desencadeiam potenciais ações biológicas em uma variedade de células alvo (PIETRAS e SZEGO, 1977 e 1980; KELLY *et al.*, 1976; KELLY e LAGRANGE, 1998). A transdução de sinal pode ocorrer devido à ativação de proteínas G pelo estrógeno, que pode ocorrer direta ou indiretamente (KELLY e WAGNER, 1999). A ativação de proteína G leva a modulação de etapas de “*downstream*”, que possui ações celulares discretas, que incluem a ativação de canais para K⁺ (KELLY, 1980). É provável que os ERs de membrana utilizem a ativação via tirosina kinase para importantes ações como a

proliferação celular (MIGLIACCIO, 1996). Dessa forma, uma variedade de ações celulares pode ser influenciada por ações do estrógeno sobre receptores de membrana.

1.6.4 Estrógeno e o Sistema Cardiovascular

A incidência de doenças cardiovasculares difere significativamente entre homens e mulheres em decorrência de fatores de riscos e hormonais (BARRETT-CONNOR, 1997).

Existem fortes evidências do efeito cardioprotetor direto do estrógeno em diferentes espécies (VAN EICKELS *et al.*, 2001). Sabe-se que a mulher tem menor incidência de doenças isquêmicas cardíacas antes da menopausa mas perde esta vantagem quando entra na menopausa, sugerindo que o hormônio feminino, particularmente o estrógeno representa um importante papel na redução do risco de doenças isquêmicas cardíacas. (SULLIVAN *et al.*, 1998; GRODSTEIN & STAMPFER, 1995). Estudo realizado por Hale e colaboradores 1996 demonstrou que o estrógeno reduziu o tamanho do infarto e arritmias ventriculares induzidas por isquemia sem alterar os parâmetros hemodinâmicos, sugerindo que o estrógeno tenha ação direta no coração.

As mulheres apresentam menor incidência de hipertrofia ventricular esquerda, porém esta vantagem se perde na pós-menopausa, aumentando dramaticamente sua incidência quando comparadas aos homens (AGABITI 2002). Estudos experimentais vêm colaborando para o melhor entendimento dos processos envolvidos no aumento do risco cardiovascular após a menopausa (ADAMS, 1981; SHWAER, 1997). Estes estudos sugerem que o principal mecanismo de cardioproteção dos estrogênios seria a preservação da função endotelial, pela inibição da proliferação da célula muscular lisa, das ações antioxidantes e da melhora da reatividade vascular, os quais induziriam um melhor equilíbrio na função vasodilatadora/vasoconstritora, com consequente diminuição dos riscos cardiovasculares (LIMA, 2005)

O estrógeno protege o coração contra a morte por apoptose e necrose, bem como a deposição de fibrose no tecido cardíaco (CAMPER-KIRBY *et al.*, 2001). O Estrógeno possui efeitos na parede dos vasos envolvendo numerosos mecanismos moleculares, podendo modular a função vascular pelo aumento da produção do óxido nítrico pela estimulação da sintetase óxido nítrico endotelial (WEINER *et al.*, 1994) e pela diminuição dos níveis de endotelina-1 (YLIKORKALA *et al.*, 1995). Além disso,

vários estudos sugerem uma atenuação no remodelamento cardíaco (incluindo a hipertrofia cardíaca) devido às ações do estrogênio (BUTTRICK & SCHEUER, 1992; VAN EICKELS et al., 2001; BABIKER et al., 2004).

No passado, a terapia de reposição hormonal era comumente usada para prevenir doença cardiovascular em mulheres na pós-menopausa (GRODSTEIN *et al.*, 1997, 2000; REIS, *et al.*, 2000; ALEXANDERSEN, *et al.*, 2006). No entanto, o resultado da “Women's Health Initiative” sugeriu que o estrogênio não estabelece proteção contra o desenvolvimento de doenças coronarianas e infarto do miocárdio (ROSSOUW, 2002).

Já foi demonstrado que a administração aguda de 10^{-9} M de 17 β -estradiol inibiu o influxo de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} tipo L pela inibição dos receptores β -adrenérgicos cardíaco (MEYER *et al.*, 1998 ; LI *et al.*, 2000). Acredita-se que esta modulação inibitória do estrogênio sobre os receptores β -adrenérgicos no influxo de cálcio deva diminuir a frequência cardíaca e a força de contração. Deste modo, há redução do consumo de oxigênio e conseqüentemente cardioproteção (LI *et al.*, 2000). Por outro lado, Kenneth e colaboradores 2004, demonstraram que a administração aguda de 10^{-9} M 17 β -estradiol no coração isolado de ratas ovariectomizadas não promoveu cardioproteção.

Curiosamente, estudos clínicos não conseguiram demonstrar redução dos episódios de doença cardíaca em mulheres na pós-menopausa submetidas à terapia de reposição com estrogênio (GRADY *et al.*, 1992 , MENDELSON, *et al.*, 2001) e o papel terapêutico do 17- β estradiol continua controverso e pouco conhecido (ROSSOUW *et al.*, 2002).

1.6.5 Estrogênio e a Regulação Hidroeletrólítica

Antunes-Rodrigues *et al.* 1963 foram os primeiros a demonstrar redução espontânea da ingestão de água por ratas fêmeas intactas durante o estro e aumento durante o diestro, sugerindo uma possível influência do estrogênio no controle do fluido corporal. Posteriormente outros estudos observaram aumento da ingestão de água em ratas ovariectomizadas (OVX), sendo este comportamento atenuado pela reposição com estrogênio (VIJANDE *et al.*, 1978; CARLBERG et al., 1984; KRAUSE et al., 2003). O estrogênio também parece influenciar no apetite por sódio, como observado no estudo de Stricker e colaboradores (1991), em que foi observado aumento do consumo de NaCl por ratas OVX após privação de sódio e, este efeito foi atenuado pela reposição com

estrógeno. Corroborando estes dados, já foi descrito que a reposição com estrógeno reduz a ingestão de sal induzida por injeções intracerebroventriculares de angioII em ratas OVX (DO-VALE *et al.* 1995; MECAWI *et al.* 2007). Neste contexto, tem sido evidenciada a influência do estrógeno sobre SRA em estudos que demonstram inibição do receptor de angioII do tipo 1 e da expressão da enzima conversora de angiotensina no SFO (DEAN *et al.*, 2006; KISLEY *et al.*, 1999; KRAUSE *et al.*, 2006). Acredita-se que o estrógeno desenvolva ações centrais sobre a regulação hidroeletrolítica, também devido à localização de receptores para estrógeno em áreas centrais envolvidas no controle hidroeletrolítico (SIMERLY *et al.*, 1990; ROSAS-ARELLANO *et al.* 1999; STERN *et al.*, 2003). Estes efeitos centrais do estrógeno sobre a homeostase hidroeletrolítica são amplamente discutidos entorno da sua ação clássica, por meio da ligação aos receptores ER α e ER β com efeitos sobre a expressão e transcrição gênica. No entanto tem sido evidenciado que as ações do estrógeno sobre a regulação hidroeletrolítica não se restringem aos seus efeitos genômicos, mas também a efeitos não genômicos, que ocorrem mais rapidamente (FANNON *et al.*, 2001; FALKENSTEIN *et al.*, 2000). Sendo assim, ações centrais do estrógeno podem alterar a regulação do fluido corporal durante o ciclo reprodutivo e, além disso, respostas compensatórias a alterações na homeostase hidroeletrolítica podem ser influenciadas pelo estrógeno.

1.6.6 Estrógeno e a Função Tireoidiana

Em humanos, o sexo feminino apresenta maior prevalência de doenças tireoidianas em relação ao sexo masculino. Essas alterações, frequentemente aparecem associadas a alterações hormonais femininas, como durante a puberdade, gravidez e menopausa (FUKUDA *et al.*, 1975; URBAN, 1992; DONDA *et al.*, 1990).

Em ratos adultos, têm sido descritas várias diferenças na função tireoidiana relacionadas ao sexo, em particular menor concentração de T4 e TSH plasmáticos e elevado nível de T3 em fêmeas comparadas com ratos machos (RAPP & PYUN, 1974; FUKUDA *et al.*, 1975; GREELEY *et al.*, 1983; CHEN 1984; CORRÊA DA COSTA *et al.*, 2001; MOREIRA *et al.*, 2005).

Donda *et al.*, (1990) e Santini *et al.*, (1994) demonstraram, em ratos, menor atividade e conteúdo da desidase tipo 1 (D1) no fígado de fêmeas comparado com machos, não havendo diferença no rim. Esta diferença, que foi abolida

após a castração dos animais, também foi observada por Harris *et al.*, (1979). Corroborando estes resultados, Miyashita *et al.* (1995) detectaram, em animais normais ou tireoidectomizados, atividade e RNAm para D1 hepática menores em fêmeas. Contrário a estes achados, Lisbôa (1997) observou que a atividade D1 no fígado, e D1 e D2 na hipófise, eram significativamente menores nos machos do que nas fêmeas; e Corrêa da Costa *et al.* (2001) também mostraram que a atividade D1 hepática é menor nos ratos machos, não havendo diferenças entre os sexos na D1 tireoidiana, enquanto que Lisbôa (2001) encontrou a atividade da D1 na tireoide menor nas fêmeas, e a atividade D2 tireoidiana não sendo influenciada pelo sexo.

Farbota *et al.* (1987), e Chen & Walfish (1978a e 1978b), não observaram alterações do TSH em ratas castradas por 4 e 2 semanas, respectivamente. Lisbôa *et al.* (1997) demonstraram que a ovariectomia e a reposição com estradiol em doses fisiológicas não modificaram o TSH sérico, mas com doses suprafisiológicas houve elevação do TSH sérico. Christianson *et al.* (1981) e Lisbôa *et al.* (1997) não detectaram alterações no T3 e T4 séricos em ratas castradas tratadas ou não com estradiol, mas Lima *et al.* (2006) demonstraram diminuição significativa do T3 sérico em ratas castradas e sua normalização após reposição com estrógeno. Miyashita *et al.* (1995) relataram que a ovariectomia, ou o tratamento com β -estradiol, não alteraram o RNAm nem a atividade D1 hepática. Em contrapartida, Harris *et al.* (1979) sugeriram haver aumento da atividade D1 hepática em ratas castradas tratadas com benzoato de estradiol. Lisbôa *et al.* (1997 e 2001) verificaram que três semanas após a castração de ratas a atividade D1 hepática e hipofisária diminuíram, e a reposição com benzoato de estradiol aumentou a atividade de D1 nestes dois tecidos para valores similares aos do controle, além de ter causado aumento da D1 na tireoide, e não ter alterado a D2 hipofisária. Foi observado, ainda, que a administração de progesterona a ratas castradas inibiu a atividade D1 hepática, sem afetar a hipofisária, porém reduziu o efeito do estrogênio em ambos os tecidos.

Resumindo, a importância do estrógeno na função tireoidiana de ratos ainda não está totalmente esclarecida e a maioria desses estudos relatam dados controversos. Provavelmente, isso acontece não só devido as diferentes linhagens de ratos utilizadas, mas principalmente aos diferentes estágios de desenvolvimento desses animais e as diferentes metodologias empregadas.

Porém, mesmo com a dificuldade de racionalizar os dados referentes a influência do estrógeno (e de outros hormônios sexuais femininos) na fisiologia do eixo

hipotálamo-hipófise tireoide, bem como, no metabolismo dos hormônios tireoidianos, a busca por alças de integração endócrina, não devidamente estudadas até então, mas que impactam sobremaneira no sistema cardiovascular, pode abrir novas perspectivas para o melhor entendimento das diferenças fisiopatológicas na evolução da ICC entre machos e fêmeas e propiciar abordagens terapêutica mais eficazes que as atuais em futuro próximo.

Neste estudo, pretende-se avaliar o impacto da ovariectomia, bem como da reposição com estrógeno, em aspectos relativos à regulação hidroeletrólítica e a função cardiovascular em fêmeas infartadas e contribuir para o melhor entendimento do dimorfismo sexual concernente a evolução e gravidade da insuficiência cardíaca induzida pelo infarto do miocárdio em ratos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o dimorfismo sexual e o papel do estrógeno nas alterações da função cardíaca, do equilíbrio hidroeletrólítico e do *status* tireoidiano de ratos Wistar submetidos ao infarto do miocárdio experimental.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudar o possível dimorfismo sexual nas alterações morfofuncionais cardíacas durante a progressão do infarto do miocárdio em ratos.

Avaliar o papel das alterações do sistema nervoso autônomo no dimorfismo sexual da função cardíaca durante a progressão da insuficiência cardíaca em ratos.

Investigar as alterações hidroeletrólíticas e relacioná-las com as alterações funcionais durante a progressão fisiopatológica do infarto do miocárdio em ratos machos e fêmeas.

Caracterizar o *status* tireoidiano e relacioná-lo com as alterações na função cardíaca de ratos machos e fêmeas.

Investigar o papel do ovário, bem como especificamente do estrógeno, nas possíveis alterações funcionais cardíacas, autonômicas, hidroeletrólíticas e tireoidianas em ratas submetidas ao infarto experimental.

3. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a importância das doenças cardiovasculares, é indispensável o aprofundamento no conhecimento dos seus mecanismos fisiopatológicos, bem como, a possibilidade de novas estratégias terapêuticas para o combate dessas doenças, principais causadoras de mortes no mundo. Nesse contexto, a diferença de incidência das doenças cardiovasculares e do desenvolvimento da insuficiência cardíaca entre homens e mulheres, torna de grande importância o entendimento do dimorfismo sexual dos sistemas que apresentam importante influência no desenvolvimento da insuficiência cardíaca, como o sistema nervoso autônomo simpático e os sistemas de regulação hidroeletrólítica e que podem ser influenciados pelos hormônios gonadais e tireoidianos. Diante da ausência de estudos que relacionem a influência da regulação hidroeletrólítica em ratos fêmeas, após o infarto do miocárdio, torna-se imperativo o desenvolvimento de estudos que busquem preencher esta lacuna na literatura.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 APRECIÇÃO BIOÉTICA DA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Este projeto de pesquisa seguiu as normas e conceitos éticos da Comissão de Ética na Pesquisa da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (COMEP). O projeto foi aprovado pelo comitê de ética Institucional, sob o número do protocolo experimental 23083004369-2012/66. Além disso, todas as normas propostas pelo “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*”, publicado pelo Instituto de Nacional de Saúde dos Estados Unidos (*NIH Publication No. 85-23, revised 1996*) foram também respeitadas.

4.2 ANIMAIS

Ratos Wistar machos e fêmeas pesando entre 200 e 250g foram obtidos do biotério da UFRuralRJ e permaneceram ao longo do experimento no Laboratório de Farmacologia do Departamento de Ciências Fisiológicas da presente Universidade com climatização, fotoperíodo (12 horas por período) e em caixas contendo no máximo 4 animais e com água potável e ração *ad libitum*.

4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os grupos experimentais foram montados de acordo com o objetivo de cada etapa. Assim, foram montadas três etapas para a investigação de hipóteses levantadas a partir dos resultados prévios, obtidos da etapa anterior.

ETAPA 1: estudo seriado no modelo de infarto do miocárdio em ratos machos e fêmeas – avaliação do dimorfismo sexual.

Nesta etapa a hipótese central a ser testada era a de que a função cardíaca e o remodelamento cardíaco das fêmeas estariam mais bem preservados que a dos machos após o infarto do miocárdio experimental. Caso esta hipótese fosse confirmada, investigações adicionais seriam realizadas para justificar, pelo menos em parte, tais diferenças. Assim, o foco desta etapa foi avaliar o possível dimorfismo sexual i) no balanço simpato-vagal cardíaco, ii) na regulação hidroeletrólítica e iii) nos níveis séricos de hormônios tireoidianos. Para tanto, os seguintes grupos foram montados nessa etapa:

- a) Grupo Sham.M (n = 8) – Ratos machos falso-operados para a cirurgia de IM.
- b) Grupo INF.M (n = 10) – Ratos machos submetidos ao IM.
- c) Grupo Sham.F (n = 10) – Ratas fêmeas falso-operadas para a cirurgia de IM
- d) Grupo INF.F (n = 11) – Ratas fêmeas submetidas ao IM.

ETAPA 2: Estudo da participação das gônadas femininas nas alterações encontradas 4 semanas após infarto do miocárdio.

Como destacado anteriormente, nesta Etapa, os parâmetros alterados na Etapa 1 foram investigados com o objetivo de buscar argumentos que justificassem tais alterações. Assim, a hipótese principal a ser testada nesta fase foi a de que os hormônios gonadais femininos pudessem, pelo menos em parte, justificar as alterações encontradas na etapa anterior. Para tanto, os seguintes grupos experimentais foram montados:

- a) Grupo Sham_{INT} (n = 10): Ratas fêmeas intactas e falso-operadas para cirurgia de IM.
- b) Grupo INF_{INT} (n = 11): Ratas fêmeas intactas e submetidas ao IM experimental.
- c) Grupo Sham_{OVX} (n = 14): Ratas fêmeas ovariectomizadas e falso-operadas para a cirurgia de IM.
- d) Grupo INF_{OVX} (n = 10): Ratas fêmeas ovariectomizadas e submetidas ao IM.

ETAPA 3: Estudo da influência do estrógeno nas alterações encontradas 4 semanas após infarto do miocárdio.

- a) Grupo Sham_{OVX+Veic.} (n = 12): Ratas fêmeas ovariectomizadas tratadas com veículo (óleo de girassol) e falso-operadas para a cirurgia de IM.
- b) Grupo INF_{OVX+Veic.} (n = 10): Ratas fêmeas ovariectomizadas tratadas com veículo submetidas ao infarto experimental.
- c) Grupo Sham_{OVX+E2} (n = 6): Ratas fêmeas ovariectomizadas e tratadas com cipionato de estradiol na dose de reposição e falso-operadas para a cirurgia de infarto.
- d) Grupo INF_{OVX+E2} (n = 7): Ratas fêmeas ovariectomizadas e tratadas com cipionato de estradiol na dose de reposição e submetidas ao infarto do miocárdio.

Para efeito de melhor entendimento do racional utilizado nas etapas sucessivas deste estudo, a Figura 4 mostra um algoritmo simplificado utilizado para a decisão dos estudos realizados em cada etapa

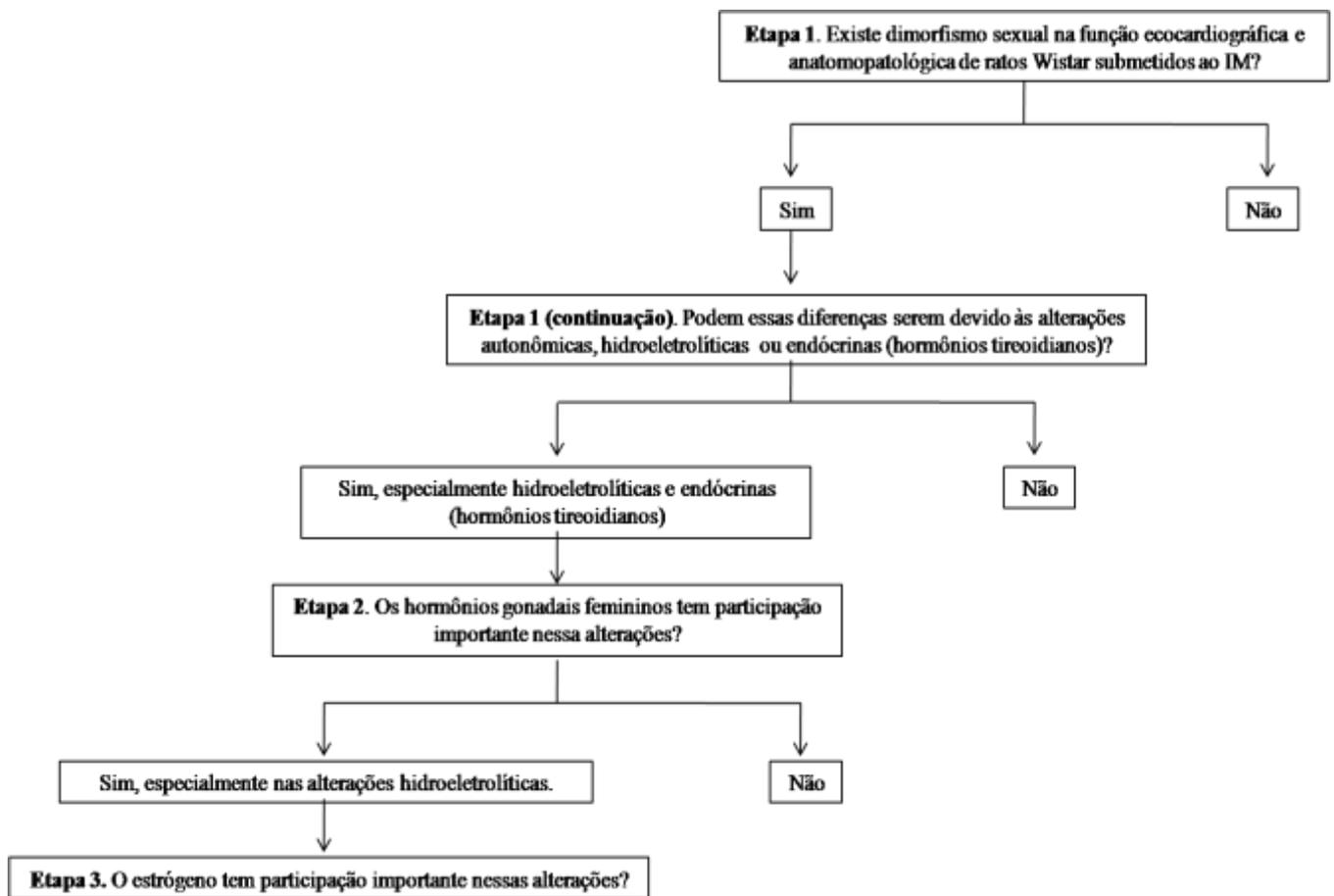


Figura 4. Algoritmo do racional dos experimentos planejados em cada etapa. Note que as etapas foram montadas de acordo com os resultados mais relevantes obtidos na etapa imediatamente anterior.

4.4 TÉCNICA DE PRODUÇÃO DO INFARTO CICATRIZADO DO MIOCÁRDIO

O infarto experimental em ratos foi realizado como descrito por Johns&Olson (1954) e Selye *et al* (1960) e modificado pelo nosso grupo (OLIVARESet *al.*, 2004; OLIVARESet *al.*, 2007; TRINDADE *et al.*, 2007). Assim, os animais foram mantidos sob anestesia inalatória com o anestésico inalatório Isoflurano (Isoflurano, Biochimico), fixados em uma pequena mesa cirúrgica de madeira em decúbito dorsal e intubados em nível traqueal para a ventilação mecânica (ventilador mecânico – Insight®). Após a tricotomia em nível torácico, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico. A cirurgia iniciou-se com incisão da pele em nível para-esternal esquerdo de aproximadamente 1 cm de comprimento e localizada a 1 cm da linha esternal média, na junção dos terços inferior e médio da distância entre a clavícula e o rebordo costal. Em seguida, os músculos peitoral maior e menor foram dissecados objetivando a visualização do gradil costal esquerdo.

Neste momento, foi procedida uma sutura em bolsa da pele e dos músculos da região, deixando o nó aberto até o término da cirurgia. Com o auxílio de uma pinça

hemostática (Kelly reta) foi feita a incisão entre o 4º ou 5º espaço intercostal esquerdo, através do qual o coração foi exteriorizado por meio de uma suave compressão manual torácica direita. Após a localização da artéria coronária esquerda (geralmente sob a aurícula esquerda), a mesma foi ligada com fio de seda 6-0 através de um nó duplo o mais próximo possível de sua origem na aorta. Em seguida o coração foi recolocado rapidamente em sua posição anatômica original e o nó da sutura em bolsa foi finalmente fechado. Caso fosse necessário, após a extubação, os animais foram submetidos à ventilação mecânica através de um pequeno ambú, de fabricação doméstica, com o intuito de estimular os movimentos respiratórios espontâneos.

No caso do grupo controle (animais falso-operados) o procedimento foi semelhante, excetuando a etapa de ligadura da artéria coronária. Neste caso, o fio de sutura foi passado pelo músculo cardíaco sem promover o nó cirúrgico. Para a analgesia e antibioticoterapia foram administradas 0,03mL/rato do analgésico/antiinflamatório Ketoflex® (cetoprofeno 1%) e 0,2mL/rato de Pentabiótico Veterinário® (Fort Dodge Saúde Animal) respectivamente.

Após a recuperação da anestesia, isto é, animais exibindo atividade motora espontânea e deambulação, os mesmos foram reconduzidos ao biotério e mantidos com água e ração *ad libitum*.

A Figura 5 mostra uma representação esquemática do procedimento empregado para a realização da cirurgia de infarto.

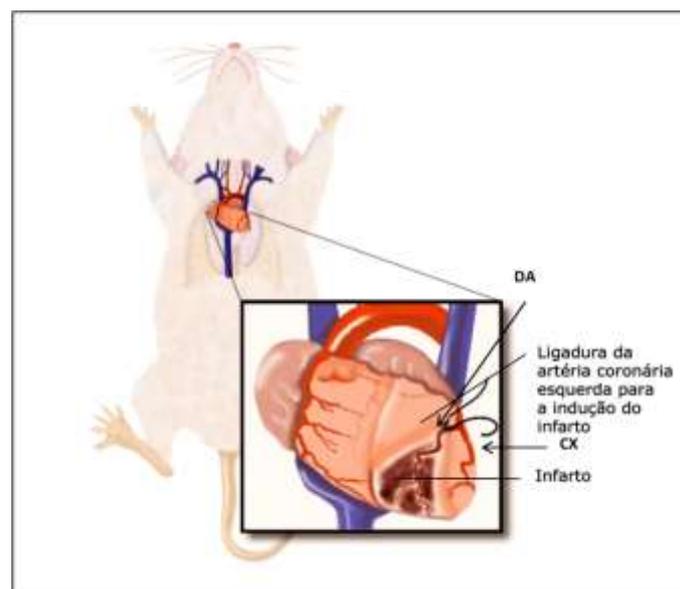


Figura 5. Desenho representativo do procedimento para a obtenção do infarto experimental. Note que a ligadura da artéria coronária esquerda é feita somente no ramo descendente anterior (DA), deixando livre o ramo circunflexo (CX). (Obtido de Terese Winsiow & Lydia Kibiuk, NHI - Junho 2001).

4.5 OVARIECTOMIA E REPOSIÇÃO HORMONAL

Para ovariectomia as fêmeas foram submetidas à anestesia com uma mistura de cloridrato de ketamina (50 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (5 mg/kg) IP, tendo em seguida, foi realizada a excisão bilateral dos ovários. Um grupo de ratas ovariectomizadas foi então submetido à reposição com cipionato de estradiol (Pfizer) na dose de 1,0 µg/100g de peso corporal por dia, por via subcutânea e outro grupo recebeu veículo (óleo de girassol) no mesmo volume, como descrito anteriormente por MECAWI *et al.* 2011.

4.6 EXAME ECODOPPLERCARDIOGRÁFICO

4.6.1 Preparação dos Animais

Os exames foram realizados como descrito anteriormente pelo nosso grupo (OLIVARES *et al.*, 2004; OLIVARES *et al.*, 2007; TRINDADE *et al.*, 2007). Após a anestesia, como já descrita para o infarto experimental, foi realizada a tricotomia desde a região torácica até, aproximadamente, o terço superior da região abdominal. Em seguida os animais foram colocados em decúbito dorsal para a realização do exame.

4.6.2 Ecocardiógrafo

Foi utilizado um equipamento comercialmente disponível (Sonosite, modelo Titan) que permite a obtenção de imagens nos modos unidimensional e bidimensional e análise das velocidades de fluxo pelas técnicas de Doppler pulsado e contínuo, além do mapeamento de fluxo em cores. Os transdutores utilizados foram do tipo linear na faixa de 7,0 a 10 MHz.

4.6.3 Imagens

Os cortes ecocardiográficos obtidos seguiram a nomenclatura descrita pela Sociedade Americana de Ecocardiografia (ASE). O animal foi colocado em decúbito dorsal e as imagens longitudinais, transversais, e apicais sequencialmente obtidas. Estas foram gravadas em pendrive para posteriormente serem realizadas as análises e a digitalização das imagens representativas de cada animal.

4.6.4 Medidas

A análise ecodopplercardiográfica foi realizada por um único observador experiente da técnica, que desconhecia a procedência dos animais quanto aos grupos experimentais aos quais eles pertenciam. As medidas realizadas no Modo-M, orientadas pelo bidimensional, incluíram os seguintes parâmetros: geometria cardíaca e a função sistólica e diastólica do VE. Tais valores são obtidos de acordo com o padrão da Sociedade Americana de Ecocardiologia e descrito por Sahnet *al.* (1978). O diâmetro do átrio esquerdo e da aorta, os valores de espessura da parede anterior e parede posterior do VE em diástole e os diâmetros diastólico e sistólico finais do VE foram determinados em mm no Modo-M.

4.6.4.1 Geometria do coração

Para a análise da anatomia cardíaca foram selecionados os seguintes parâmetros:

- a) diâmetro interno do átrio esquerdo (AE) em mm;
- b) diâmetro interno da aorta (Ao) mm;
- c) relação AE/Ao;
- d) diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DDFVE) mm;
- e) diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (DSFVE) mm.

4.6.4.2 Função sistólica

Para a função sistólica foi determinada a fração de encurtamento do VE.

a) Fração de encurtamento – a FEnc% foi calculada através da diferença entre o DDFVE e o DSFVE, dividida pelo DDFVE e multiplicado por 100. Da seguinte forma:

$$\text{FEnc\%} = [(\text{DDFVE} - \text{DSFVE}) / \text{DDFVE}] \times 100$$

4.6.4.3 Função diastólica

Para a função diastólica, foram utilizados os índices derivados da velocidade de fluxo diastólico mitral obtido pela técnica de Doppler pulsátil. Tais índices compreenderam:

- a) onda E: maior valor da velocidade de fluxo inicial do enchimento ventricular;
- b) onda A: maior valor da velocidade de fluxo telediastólico mitral;
- c) relação E/A: relação entre a velocidade máxima da onda E e a velocidade máxima da onda A. Os animais que apresentaram relação E/A acima de 3 foram classificados como padrão “restritivo”. (LITWIN et al., 1994, 1995; TANAKA et al., 1996; HOIT et al, 1997; OLIVARES et al., 2004)

4.7 ESTUDO DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

A frequência cardíaca apresenta flutuações, que em grande parte são periódicas, estas alterações são moduladas, principalmente, pelo sistema nervoso autônomo, sendo o parassimpático o componente que reduz a frequência cardíaca e aumenta a variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e o simpático, o componente que aumenta a frequência cardíaca e reduz a VFC. Isto permite que a VFC determinada em registros eletrocardiográficos e seja avaliada através de medidas no domínio da frequência. Sendo assim, o registro contínuo do eletrocardiograma durante períodos curtos ou prolongados (24h) e a subsequente representação gráfica dos intervalos RR normais em relação ao tempo (tacograma), dá origem a um fenômeno ondulatório complexo, que pode ser decomposto em ondas mais simples, por meio de algoritmos matemáticos, como a transformação rápida de Fourier ou o modelo autorregressivo. Este processo é denominado análise espectral e permite decompor o sinal eletrocardiográfico oriundo do

tacograma (série temporal) em seus diferentes componentes de frequência, ou seja, nas chamadas bandas de frequências. Vale lembrar que a frequência refere-se ao número de vezes que um determinado fenômeno ocorre em relação ao tempo. A unidade de frequência comumente utilizada é o Hertz (Hz), que equivale a um ciclo por segundo.

Portanto, uma série temporal determinada por ciclos cardíacos sucessivos pode ser decomposta em seus componentes periódicos e, cada uma das frequências que compõem a análise espectral pode ser quantificada em sua amplitude (magnitude). Além disso, o cálculo da área compreendida em cada faixa de frequência (que é proporcional ao quadrado da amplitude do sinal original) permite separar a quantidade de variância (potência) atribuída a cada frequência.

Esta forma de análise permite avaliar individualmente a participação do sistema nervoso simpático e parassimpático em diferentes situações fisiológicas e fisiopatológicas, podendo assim ser mais bem estudadas.

4.7.1 Preparação dos animais e realização dos registros eletrocardiográficos

Os animais foram imobilizados e tricotomizados em toda a extensão torácica, sendo acoplado, a cada hemitórax, um eletrodo de espuma (3M do Brasil Ltda, Sumaré-SP, Brasil) de aproximadamente 1,5 centímetros de diâmetro. Momentos antes do registro foram conectados ao sistema de aquisição eletrocardiográfico do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFRRJ (ADinstruments[®]), para registro do ECG. Os sinais foram adquiridos com a frequência de 10 k-hertz e amplitude com resolução de 12 bits e, para visualização e análise dos registros, foi utilizado o software AcqKnowledge[®] (versão 3.8.1).

4.7.2 Processamento dos sinais da variabilidade da frequência cardíaca

Todo o processamento dos sinais da VFC foi feito utilizando algoritmos baseados em Matlab (PEREIRA-JÚNIOR *et al*, 2006) do software Cardioseries (Versão1.1). Após a detecção de pico da onda R, foram gerados tacogramas de 600 segundos, contando todas as flutuações cardíacas dentro deste período de tempo (PEREIRA-JÚNIOR *et al*, 2006). Para análise espectral da VFC (domínio da frequência), os tacogramas foram redimensionados para intervalos iguais, pelo método de interpolação cúbica, a 10 Hz, e a tendência linear foi removida (PEREIRA-JÚNIOR *et al*, 2006;

AUBERT *et al*, 2009). O espectro de potência foi obtido com uma decomposição rápida baseada no método de Fourier (periodograma de Welch: 256 pontos, 50% de sobreposição, e janela Hamming). Duas faixas de frequência foram determinadas: baixa frequência (LF: 0,2-0,8 Hz) – correspondente a variações cardíacas com modulação predominante do SNA simpático; e alta frequência (HF: 0,8-2,5 Hz) – correspondente a variações cardíacas tipicamente moduladas pelo SNA parassimpático. A potência (ms^2) foi estimada como a área sob o espectro dentro dessas amplitudes de frequência (PEREIRA-JÚNIOR *et al*, 2006; AUBERT *et al*, 1999). A medida relação LF/HF foi realizada para estudo do balanço entre o SNA simpático e parassimpático.

4.8 ESTUDO HIDROELETROLÍTICO

4.8.1 Aferição da ingestão de água e sódio basais e volume urinário

A aferição da ingestão de água e sódio (após oferta de NaCl, 1,8%) foi realizada em gaiolas metabólicas dotadas de bebedouros volumétricos. A salina hipertônica é normalmente aversiva ao paladar de ratos, bem como para os seres humanos. A ingestão de salina por ratos ocorre apenas quando se manifesta um déficit na concentração de sódio e no volume dos líquidos corporais. A ingestão de fluidos foi expressa como média do grupo (em ml/animal), em avaliação de 24h, com início às 18h seguido da avaliação após 24h (uma e quatro semanas após a cirurgia). O parâmetro de preferência por sódio foi quantificado pelo volume de ingestão de salina hipertônica dividido pelo volume de fluidos totais (salina hipertônica e água). A coleta da urina para quantificação do volume foi realizada nos mesmos períodos que o dos fluidos.

Em todas as avaliações do estudo hidroeletrolítico, foram utilizados 6 animais por grupo, em função do número de gaiolas metabólicas disponíveis em nosso departamento.

4.9 ESTUDO BIOQUÍMICO

4.9.1 Dosagem plasmática de tiroxina (T4) e triiodotironina (T3)

Para as dosagens plasmáticas os animais foram submetidos à anestesia inalatória com o anestésico inalatório Isoflurano (Isoflurano, Biochimico) e coleta de sangue através da veia jugular, com a utilização de anticoagulante (heparina, na concentração de 10µg/mL). A seguir, o sangue foi centrifugado (5000 rpm por 20 minutos) e o soro foi coletado e armazenado em ependorfs, numa temperatura de -20°C.

As concentrações séricas de T3 e T4 foram determinadas através de Kit comercial para radioimunoensaio (RIE) de T3 (DLS – 3100 Active[®], TX, EUA) e T4 (DLS – 3200, Active[®], TX EUA) totais, contendo anticorpos específicos aderidos à parede dos tubos de polipropileno e com T3 e T4 ligados ao radiotraçador (125I) com atividade específica de 5 µCi/µg (185 KBq/µg). As curvas padrão foram realizadas com T3 e T4 em soro de rato livre de iodotironinas (soro zero) nas concentrações de 25 a 1000 ng/dl e 1 a 50 µg/dl, respectivamente. Todo o procedimento foi realizado seguindo-se as recomendações do fornecedor. Os resultados foram expressos em ng/dl para o T3 e em µg/dl para o T4. Em todos os radioimunoensaios as amostras foram dosadas em duplicata e a detecção da radioatividade foi realizada em um cintilador de fase sólida Wizard(2470 WallacWizard[™] automatic gamma counter).

4.9.2 Atividade iodotironina desidase tipo 1 (D1)

Para a determinação da atividade de D1 no fígado, foi utilizado 25mg de fígado/ml de tampão as amostras foram homogeneizadas em tampão sucrose-DTT (0,25 M sucrose e 10 mM DTT). Os homogeneizados foram armazenados a -70°C até o dia do ensaio. Alíquotas de 20 µl foram guardadas separadamente a -20°C para dosagem de proteínas pelo método de Bradford (1976). As amostras foram solubilizadas com NaOH 2,5 N pelo menos 30 minutos antes da dosagem (sempre em duplicata) e a albumina bovina sérica (BSA – Sigma, MO, EUA) foi utilizada para a construção de uma curva padrão. O traçador radioativo foi purificado em virtude das desidotações espontâneas das iodotironinas marcadas, mesmo na ausência da enzima. Para a purificação, foi utilizada uma coluna de 2ml de Sephadex L20 para se obter somente o rT3 radioativo presente na solução. Uma alíquota de 70 µl do rT3 marcado foi diluída em 12 ml de H₂O Milliq destilada e aplicada à coluna, seguindo uma lavagem com 6 ml de H₂O Milliq. Desprezou-se os eluatos contendo radioiodeto e o rT3 marcado foi eluído com 4,5 ml de etanol 70%. O eluato de etanol 70% contendo a iodotironina foi colhido em nove tubos de vidro, de onde foram retirados 5 µl para

contagem da radiação gama no contador Wizard (2470 WallacWizard™ automatic gamma counter). Os tubos com mais de 5.000 cpm/5 µl foram reunidos e guardados a 4°C, ao abrigo da luz, até o dia seguinte, quando era realizado o ensaio.

A atividade da D1 foi determinada em tampão PE (100 mM fosfato de sódio, 1 mM EDTA, pH 6,9) contendo ditioneitol (DTT) 10 mM (cofator da enzima), rT3 frio 1 µM, volume de homogeneizado tecidual calculado para conter 30 µg de proteína por fígado, sendo a reação iniciada pela adição de 50 µl do rT3-125I (50000 cpm). Durante 60 minutos os tubos foram incubados a 37°C. Decorrido o tempo de incubação, a reação foi interrompida colocando-se os tubos em banho de gelo. Em seguida, foram adicionados 200 µl de soro fetal bovino gelado e 100 µl de ácido tri-cloro acético (TCA) 50% para a precipitação das proteínas. Os tubos foram agitados vigorosamente no vortex durante 1 minuto e centrifugados (10000 rpm por 3 minutos, microcentrífuga). Finalmente, 360 µl do sobrenadante foram transferidos para tubos de contagem para medir a radioatividade no contador gama. A atividade da enzima foi expressa em pmoles de rT3/ min. mg de ptn.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram expressos como médias ± erro padrão da média e submetidos à análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni. Os valores médios foram comparados nos diferentes grupos experimentais com o grau mínimo de significância considerado 95% ($P < 0,05$) ou 99% ($P < 0,01$).

4.11 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Etapa1: Estudo seriado no modelo de infarto do miocárdio em ratos machos e fêmeas – avaliação do dimorfismo sexual.

Uma e quatro semanas após a cirurgia de indução ao infarto do miocárdio de ratos machos e fêmeas (grupos Sham-M e Sham-F: falsa operação e grupos INF-M e INF-F: cirurgia de indução ao infarto do miocárdio) foi realizada a avaliação morfofuncional dos animais de todos os grupos experimentais, por meio da ecodopplercardiografia, como descrito no item 4.5, bem como a

avaliação da variabilidade da frequência cardíaca, como descrito no item 4.6. No mesmo período, os animais foram anestesiados para coleta de sangue pela veia jugular direita para dosagens de T3 e T4. Além disso, na primeira e na quarta semanas após a cirurgia de indução ao infarto do miocárdio, foi realizado o estudo do equilíbrio hidroeletrólítico (item 4.7). Na quarta semana foi realizada a eutanásia dos animais de cada grupo para coleta de tecidos para biometria. A Figura 6 representa o protocolo experimental que foi utilizado nesta primeira etapa:

Protocolo 1

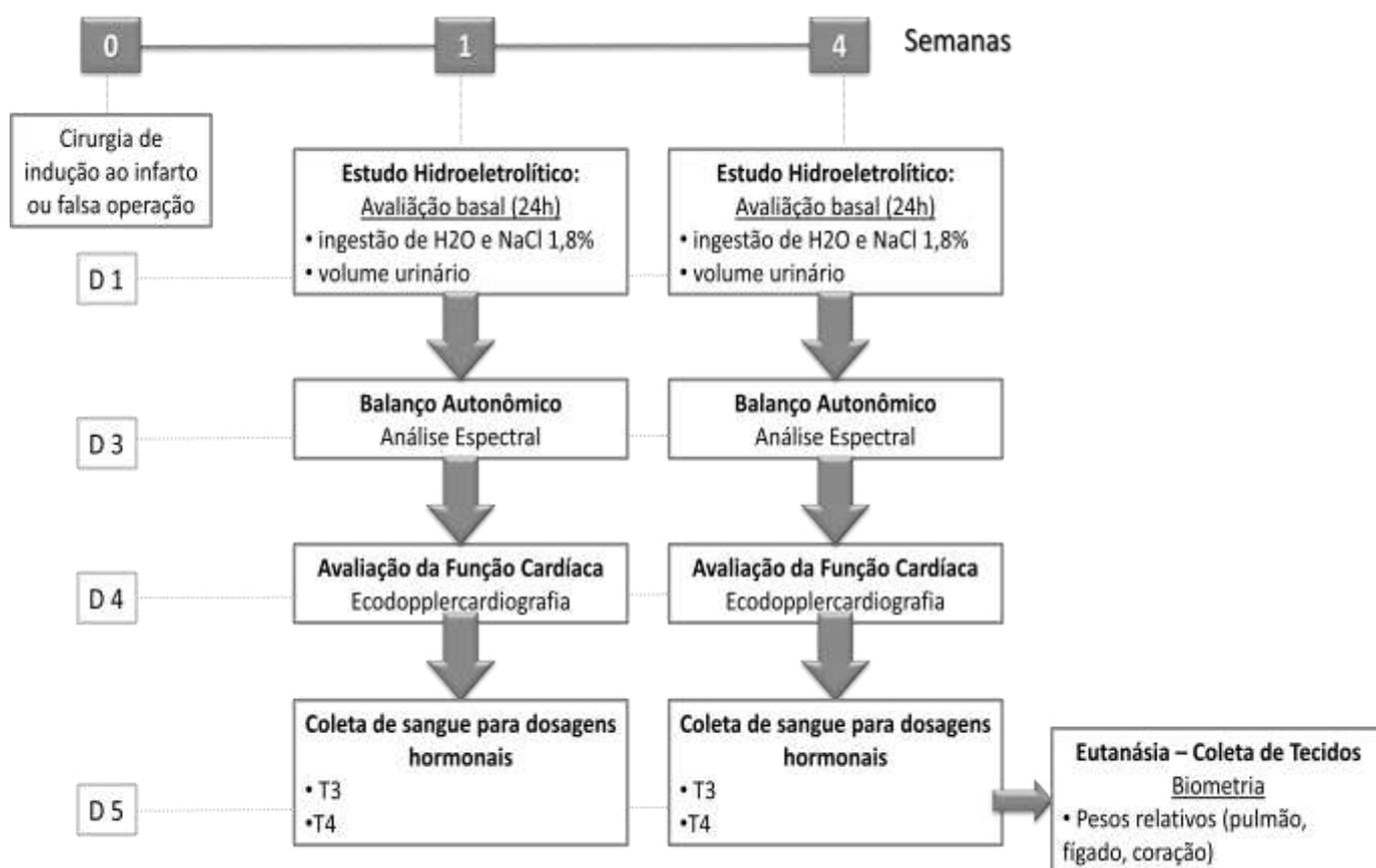


Figura 6: Protocolo experimental da primeira etapa do projeto. Grupos Sham-M e Sham-F (falsa operação em machos e fêmeas, respectivamente) e INF-M e INF-F (cirurgia de indução ao infarto do miocárdio em machos e fêmeas, respectivamente). À esquerda, D refere-se ao dia.

Etapa 2: Estudo da participação das gônadas femininas nas alterações encontradas 4 semanas após infarto do miocárdio.

Nesta etapa, foi realizada a excisão bilateral dos ovários das ratas que compuseram o grupo OVX. Duas semanas após a cirurgia de ovariectomia, os animais foram submetidos à cirurgia de indução ao IM ou à falsa operação (grupos INF-OVX e Sham-OVX, respectivamente). Quatro semanas após a LAD, foi feita a avaliação da função cardíaca por meio da ecodopplercardiografia, coleta de sangue, estudo do equilíbrio hidroeletrólítico e eutanásia, como pormenorizado na etapa 1. A Figura 7 representa o protocolo experimental que foi utilizado na segunda etapa:

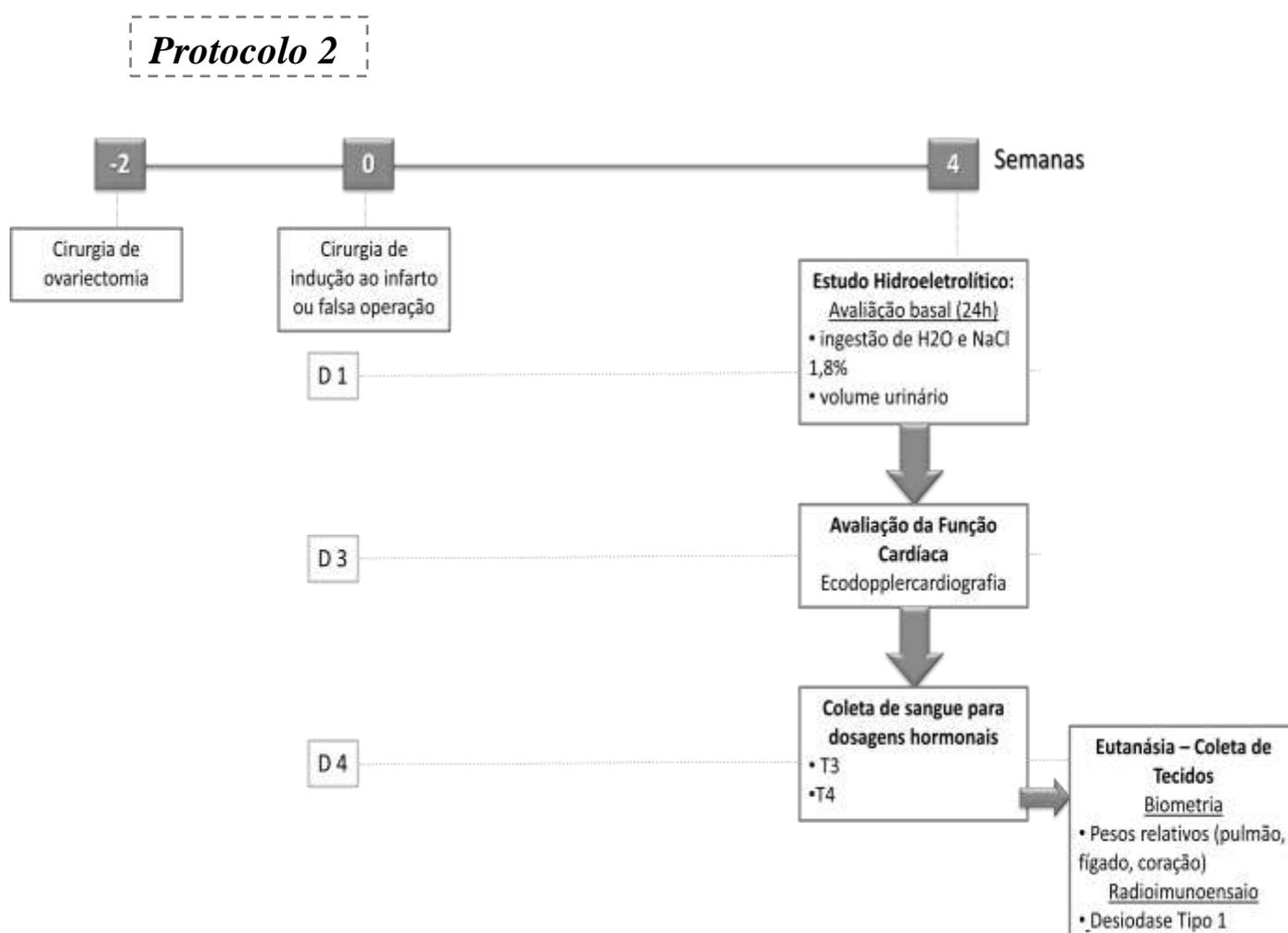


Figura 7: Protocolo experimental da segunda etapa do projeto. Grupos Sham-Intacta e Sham-OVX (falsa operação de indução ao IM em ratas intactas e em ratas ovariectomizadas, respectivamente) e INF-Intacta e INF-OVX (cirurgia de indução ao infarto do miocárdio em ratas intactas e em ratas ovariectomizadas, respectivamente). À esquerda, D refere-se ao dia.

Etapa 3: Estudo da influência do estrógeno nas alterações encontradas 4 semanas após infarto do miocárdio.

Esta etapa consistiu na cirurgia de ovariectomia duas semanas antes da indução ao IM ou falsa cirurgia, com reposição diária com cipionato de estradiol ou veículo ao longo de todo o protocolo experimental, compondo os grupos INF_{OVX+E2} , $Sham_{OVX+E2}$, $INF_{OVX+Veic.}$ e $Sham_{OVX+Veic.}$. Em seguida, foram realizados estudo da função cardíaca, da regulação hidroeletrólítica, coleta de sangue e eutanásia, assim como na etapa 2. O protocolo experimental desta terceira etapa está representado pela figura 8.

Protocolo 3

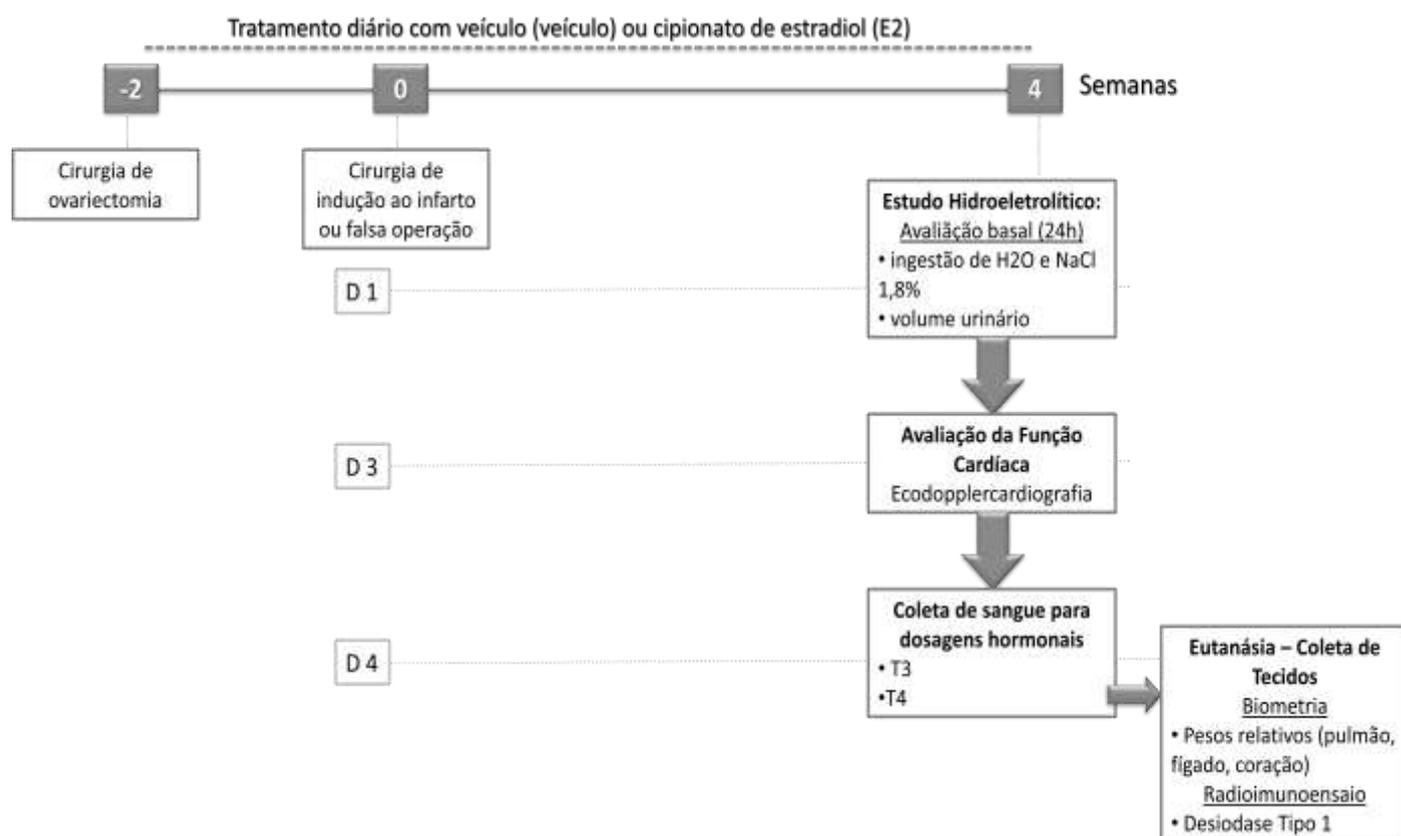


Figura 8: Protocolo experimental da terceira etapa do projeto. Grupos $Sham.Ovx+Veic.$ e $Sham.Ovx+E2$ (falsa operação de indução ao IM em ratas ovariectomizadas tratadas com veículo e tratadas com cipionato de estradiol, respectivamente) e $INF.Ovx+Veic.$ e $INF.Ovx+E2$ (cirurgia de indução ao infarto do miocárdio em ratas ovariectomizadas tratadas com veículo e tratadas com E2, respectivamente). À esquerda, D refere-se ao dia.

5. RESULTADOS

5.1 1ª ETAPA: ESTUDO SERIADO NO MODELO DE INFARTO DO MIOCÁRDIO EM RATOS MACHOS E FÊMEAS – AVALIAÇÃO DO DIMORFISMO SEXUAL

Como descrito nos materiais e métodos, a hipótese central a ser testada nesta etapa era a de que a função e o remodelamento cardíacos das fêmeas estariam mais bem preservados que a dos machos após o infarto do miocárdio experimental. Para tanto, exames ecodopplercardiográficos para a avaliação da geometria cardíaca, do processo congestivo e das funções sistólica e diastólica foram investigados e complementados com os achados biométricos *post-mortem* de avaliação da hipertrofia cardíaca e dos pesos relativos de pulmão e fígado objetivando uma análise indireta do processo congestivo esquerdo e direito respectivamente. Os dados foram apresentados a seguir.

5.1.1 Ecodopplecardiografia

Quanto a geometria cardíaca, na Figura 9A podemos observar que na primeira semana após cirurgia de infarto houve aumento significativo da relação AE/Ao no grupo INF.M comparado ao seu controle (Sham.M) e ao grupo INF.F ($2,11 \pm 0,08$ vs. $1,25 \pm 0,08$ e vs. $1,35 \pm 0,09$ cm, respectivamente. $P < 0,01$). Não houve alteração deste parâmetro nas fêmeas infartadas (INF.F) em relação ao seu controle (Sham.F) neste período ($P > 0,05$). Já na quarta semana após a cirurgia o grupo INF.F apresentou aumento da relação AE/Ao comparado ao seu controle ($1,8 \pm 0,14$ vs. $1,2 \pm 0,08$ cm. $P < 0,01$), e o grupo INF.M apresentou aumento adicional deste parâmetro, uma vez que foi observada diferença significativa em relação ao seu controle ($2,4 \pm 0,1$ vs. $1,27 \pm 0,07$ cm. $P < 0,01$) e também em relação ao grupo INF.F neste período ($2,4 \pm 0,1$ vs. $1,8 \pm 0,14$ cm. $P < 0,05$). Esses dados sugerem em conjunto, que o processo congestivo, medido indiretamente pela relação AE/Ao, foi mais precoce e intenso nos machos comparados as fêmeas.

O padrão de alteração do parâmetro relação AE/Ao se repetiu no parâmetro DDFVE (Figura 9B), com aumento no grupo INF.M em relação a Sham.M e INF.F

($0,49 \pm 0,02$ vs. $0,56 \pm 0,03$ cm. $P < 0,01$) na primeira semana. Houve aumento significativo deste parâmetro no grupo INF.M comparado ao grupo INF.F ($0,49 \pm 0,02$ vs. $0,61 \pm 0,03$ cm. $P < 0,01$). Na quarta semana, também foi evidenciado aumento no grupo INF.F em relação a Sham.F ($0,78 \pm 0,04$ vs. $0,62 \pm 0,04$ cm. $P < 0,01$), porém menos intenso do que aquele observado no grupo INF.M comparado ao Sham.M. ($0,98 \pm 0,02$ vs. $0,58 \pm 0,04$ cm. $P < 0,01$). O grupo INF.M apresentou aumento significativo neste parâmetro comparado ao grupo INF.F ($0,98 \pm 0,02$ vs. $0,78 \pm 0,04$ cm. $P < 0,01$). Esses dados indicam que a dilatação da câmara ventricular esquerda foi mais intensa e também se desenvolveu mais rapidamente nos machos comparados às fêmeas. Isso deve explicar, pelo menos em parte, os resultados observados no parâmetro anterior, i.e., relação AE/Ao.

As alterações na geometria cardíaca induzidas pelo infarto refletiram na disfunção cardíaca sistólica que foram tão intensas quanto as alterações das câmaras nos diferentes sexos. Assim, como mostra a Figura 9C, houve redução significativa da FEnc% no grupo INF.M em relação ao Sham.M e INF.F ($16,14 \pm 3,34$ vs. $55,5 \pm 2,1$ e vs. $48,69 \pm 5,23$ cm, respectivamente. $P < 0,01$) já na primeira semana pós-infarto. Quatro semanas após a cirurgia o grupo INF.F apresentou redução da FEnc% em relação a Sham.F ($44,71 \pm 6,32$ vs. $62,34 \pm 0,77$ cm. $P < 0,05$) no entanto mais branda que aquela observada nos machos (INF.M $14,0 \pm 6,88$ vs. INF.F $44,71 \pm 6,32$ cm. $P < 0,01$)

Já no parâmetro relação E/A, que indica a função diastólica, não foi observada alteração em nenhum dos grupos uma semana após a cirurgia. No entanto quatro semanas pós-IM o grupo INF.M apresentou aumento em relação a Sham.M e INF.F ($4,69 \pm 0,28$ vs. $1,68 \pm 0,36$ e vs. $1,02 \pm 0,29$ cm, respectivamente. $P < 0,01$). Estes dados reforçam que as alterações hemodinâmicas, estudadas aqui indiretamente por meio da avaliação do fluxo transvalvar mitral (relação E/A), foram mais intensas nos machos do que nas fêmeas, apresentando os machos um fluxo do tipo restritivo, i.e., determinado por uma provável elevação das pressões intraventriculares no momento da diástole. A presença de um fluxo transvalvar mitral normal (ou “normalizado”) nas fêmeas infartadas sugerem que neste sexo, o infarto não altera de forma importante a pressão diastólica final do VE, pelo menos neste tempo de avaliação (4 semanas após a cirurgia de infarto).

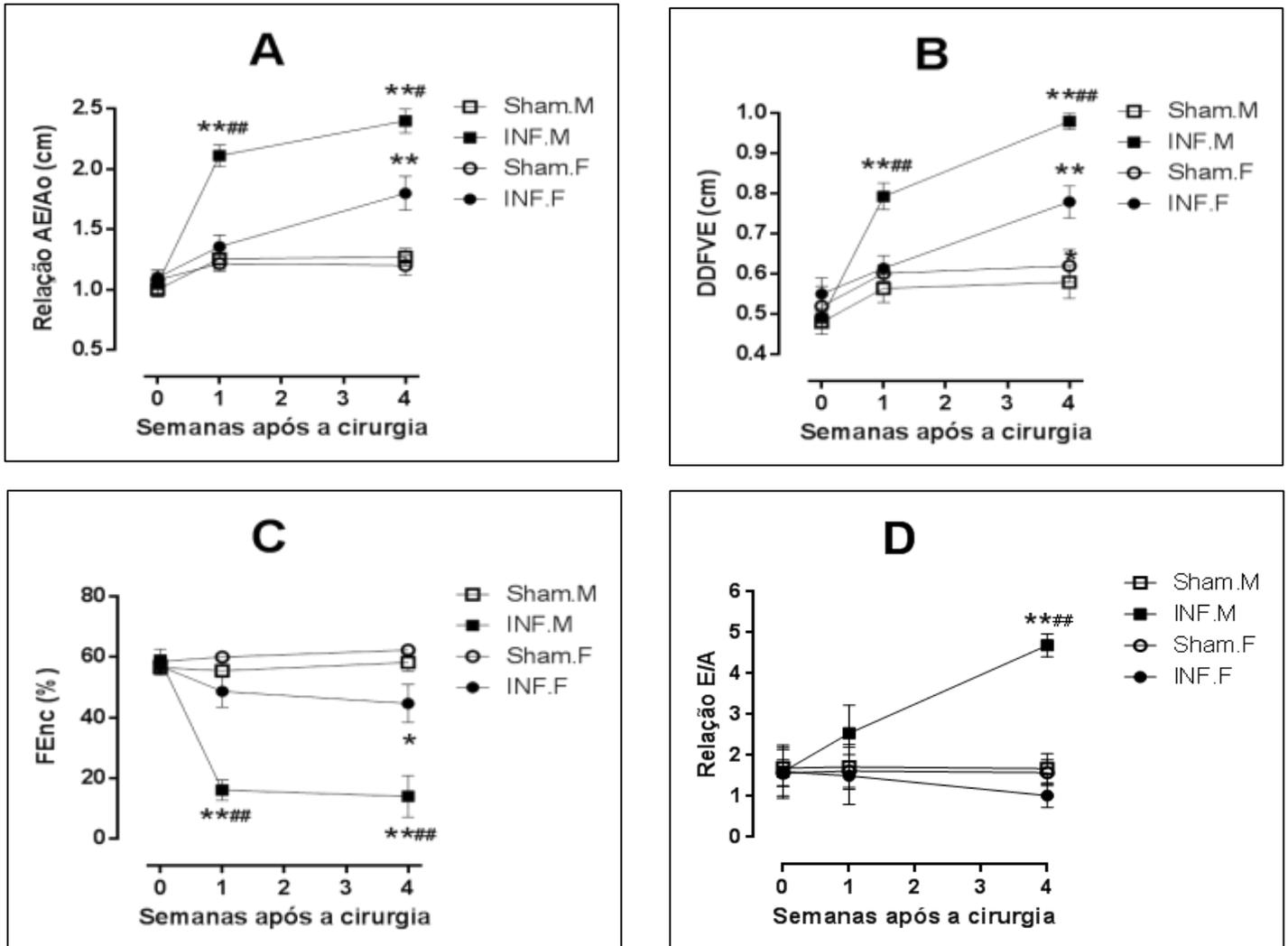


Figura 9. Estudo da geometria e das funções sistólica e diastólica do coração por meio de exame ecodopplercardiográfico realizado em todos os grupos. **A:** Relação entre os diâmetros internos do átrio esquerdo e da aorta (relação AE/Ao em cm) obtidas por exame ecodopplercardiográfico, uma e quatro semanas após o infarto experimental. **B:** Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DDFVE em cm). **C:** Fração de encurtamento (FEnc%) obtida pelo Modo-M. **D:** Relação das velocidades de fluxo diastólico transvalvar mitral obtido pela técnica de Doppler pulsátil. Sendo a relação E/A, a relação entre a velocidade máxima da onda E e a velocidade máxima da onda A. Todos os parâmetros foram avaliados nos grupos Sham.M, INF.M, Sham.F. e INF.F, sendo *P < 0,05 e **P < 0,01 em relação ao respectivo grupo controle (Sham.M ou Sham.F), assim como #P < 0,05 e ##P < 0,01 em relação grupo INF do sexo oposto.

5.1.2 Biometria

O peso relativo do coração apresentou aumento estatisticamente significativo no grupo INF.M uma semana após a cirurgia de infarto, sugerindo a ocorrência de hipertrofia cardíaca, que parece evoluir na quarta semana pós IM. Já as fêmeas apresentaram aumento deste parâmetro apenas na quarta semana e este pareceu ser mais brando em relação aos machos, uma vez que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos INF.M e INF.F neste período (figura 10A e 10B). Na figura 11A e 11B, foi evidenciado aumento do peso relativo do pulmão, tanto no grupo INF.M quanto no grupo INF.F apenas na quarta semana pós cirurgia, sugerindo a ocorrência de um processo congestivo neste tecido e que novamente pareceu ser atenuado nas fêmeas em relação aos machos. Já o peso relativo do fígado não apresentou alteração ao longo de todo o protocolo experimental (figura 12A e 12B).

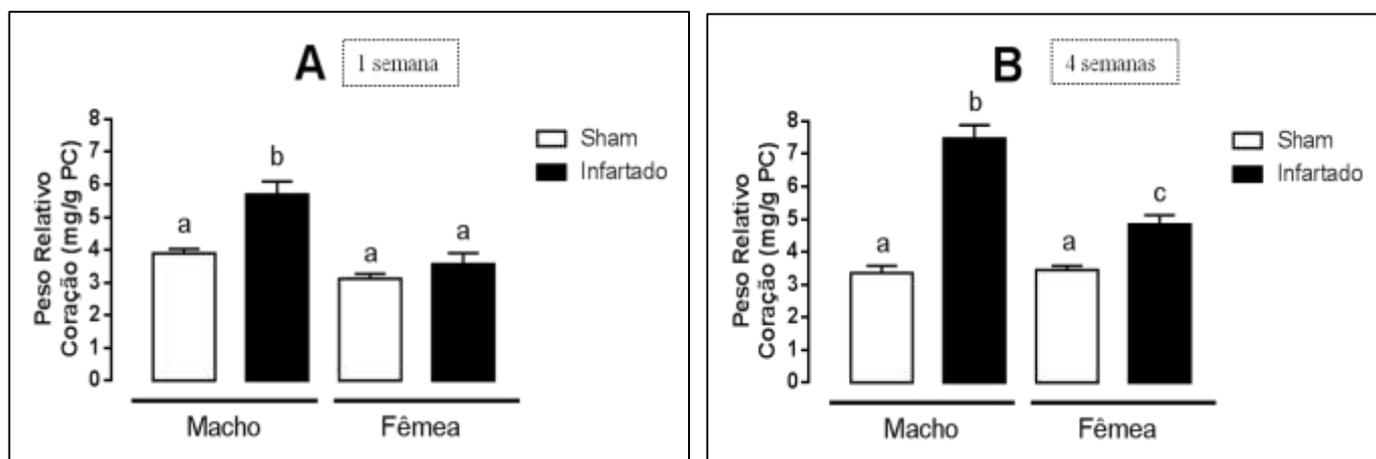


Figura 10. Peso relativo do coração (mg/g de peso corporal) dos animais dos grupos INF.M, Sham.M, INF.F e Sham.F. Em **A**: 1 semana após infarto experimental e em **B**: 4 semanas após cirurgia de infarto. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas.

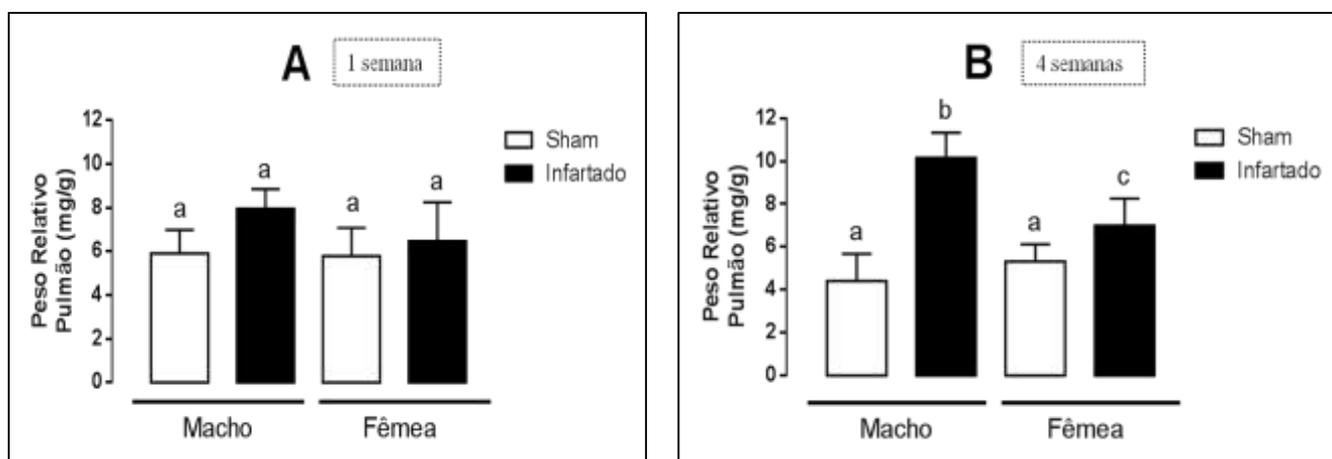


Figura 11. Peso relativo do pulmão (mg/g de peso corporal) dos animais dos grupos INF.M, Sham.M, INF.F e Sham.F. Em **A**: 1 semana após infarto experimental e em **B**: 4 semanas após cirurgia de infarto. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas.

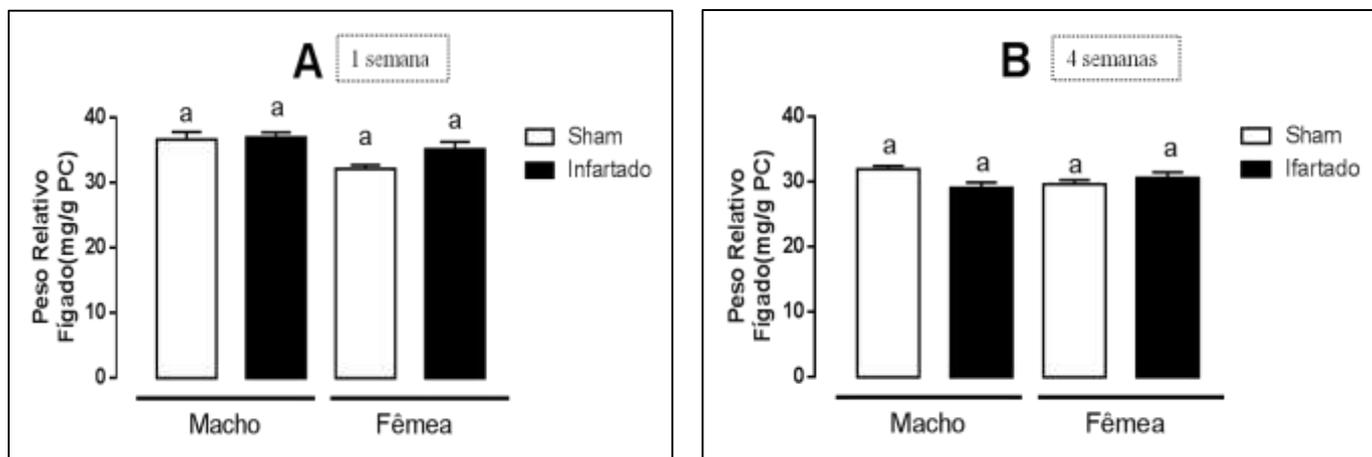


Figura 12. Peso relativo do fígado (mg/g de peso corporal) dos animais dos grupos INF.M, Sham.M, INF.F e Sham.F. Em **A**: 1 semana após infarto experimental e em **B**: 4 semanas após cirurgia de infarto. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas.

Assim, pode-se concluir preliminarmente que os dados da biometria refletiram de forma fidedigna os resultados encontrados no exame ecodopplercardiográfico, i.e., enquanto a hipertrofia cardíaca e o conseqüente processo congestivo se iniciam mais precocemente (1 semana pós-infarto) e mais intensamente nos machos, nas fêmeas a dilatação e a congestão esquerda é mais branda e só acontece mais tardiamente (4 semanas pós-infarto).

Em conjunto, os dados ecodopplercardiográficos e biométricos indicam uma pior adaptação tanto morfológica (remodelamento cardíaco) quanto funcional dos machos em resposta ao infarto do miocárdio comparados as fêmeas.

Buscando fundamentar os mecanismos responsáveis por este dimorfismo, o balanço autonômico cardíaco, a regulação hidroeletrólítica e o *status* tireoidiano foram investigados e os dados foram apresentados a seguir.

5.1.3 Balanço Autonômico Cardíaco – Análise espectral

Para a análise espectral foi determinado o componente de baixa frequência (LF) que é interpretado principalmente como a influência do SNA simpático e o componente de alta frequência (HF) interpretado principalmente como a influência do SNA

parassimpático. Para avaliação do balanço autonômico foi utilizada a relação LF/HF. Na Figura 13A observamos aumento do parâmetro LF do grupo INF.M em relação a Sham.M ($26,99 \pm 3,91$ vs. $5,61 \pm 1,88$ ms². $P < 0,01$), na primeira semana após cirurgia, no entanto, na quarta semana pareceu haver normalização deste parâmetro, uma vez que ele apresentou valores semelhantes aos do controle neste período.

O parâmetro HF não apresentou alteração em nenhum dos grupos tanto na primeira quanto na quarta semana após infarto experimental, como visto na figura 13B ($P > 0,05$).

A relação LF/HF (Figura 13C) aumentou no grupo INF.M em relação a Sham.M ($1,75 \pm 0,2$ vs. $0,48 \pm 0,3$. $P < 0,05$) na primeira semana, sugerindo aumento da modulação simpática, entretanto esta alteração não se manteve até a quarta semana após infarto, visto que não houve alteração significativa entre os grupos.

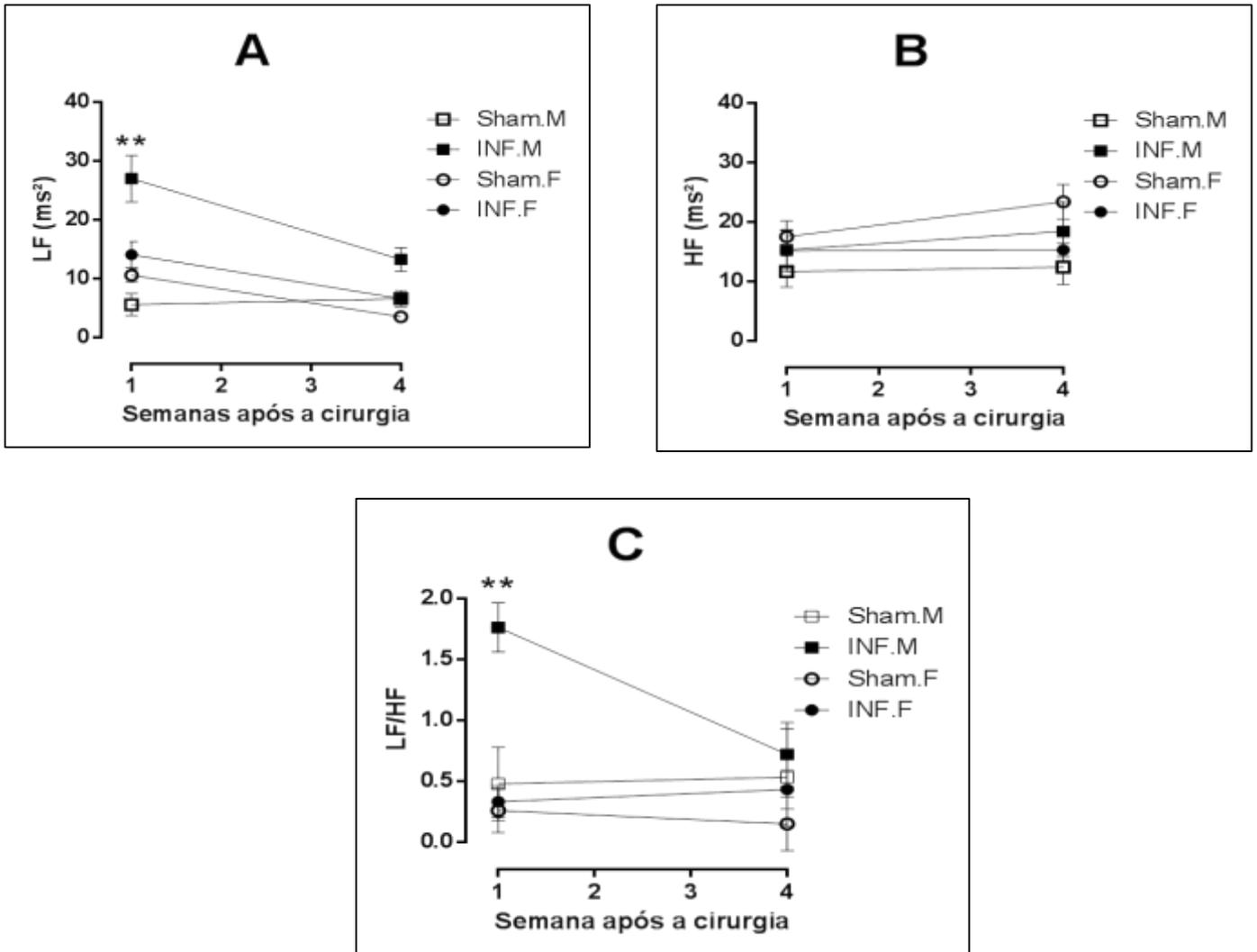


Figura 13. Estudo da variabilidade da frequência cardíaca, nos grupos INF.M, Sham.M, INF.F e Sham.F. A: Componente de baixa frequência (LH). B: Componente de alta frequência (HF). C: Relação do componente de baixa frequência pelo componente de alta frequência (LF/HF). **P < 0,01 vs. grupo controle (Sham.M).

Em conjunto, esses dados sugerem que o aumento da modulação simpática somente nos machos na primeira semana pós-infarto parece ser importante para explicar o dimorfismo sexual nas alterações morfofuncionais cardíacas, mas o mesmo não é verdadeiro quando a análise é feita na quarta semana pós-infarto. Portanto, não consideramos o balanço autonômico importante, pelo menos no período de avaliação deste estudo, para justificar os resultados concernentes às diferenças observadas na função e no remodelamento cardíaco entre os sexos.

5.1.4 Regulação hidroeletrólítica

5.1.4.1 Avaliação da ingestão de fluidos

Não foram observadas alterações estatisticamente significativas na ingestão de água em nenhum dos grupos estudados, uma e quatro semanas após IM (Figura 14A). Por outro lado, foi observada resposta natriorexigênica (aumento da ingestão de NaCl 1,8%) do grupo INF.M comparado a Sham.M ($25,0 \pm 2,39$ vs. $5,1 \pm 2,56$ ml; $P < 0,01$) e do grupo INF.F em relação a Sham.F ($15,0 \pm 2,87$ vs. $6,6 \pm 1,59$ ml; $P < 0,05$) apenas na quarta semana após indução ao IM (Figura 14B). Curiosamente, seguindo o padrão das alterações morfofuncionais cardíaca e do processo congestivo, a resposta natriorexigênica das fêmeas, embora tenha aumentado, foi significativamente menos intensa que a dos machos na quarta semana pós-IM (INF.M $25,0 \pm 2,39$ vs. INF.F $15,0 \pm 2,87$ ml; $P < 0,05$).

Na avaliação do índice de preferência por sódio (Figura 14C) observamos aumento na primeira semana, somente no grupo INF.M em relação ao grupo Sham.M ($30,6 \pm 4,5$ vs. $13,12 \pm 9,70$ %. $P < 0,01$). Ainda neste mesmo parâmetro, quatro semanas após a cirurgia, foi evidenciado aumento adicional no grupo INF.M em relação ao seu controle e ($50,25 \pm 5,60$ vs. $15,4 \pm 8,30$ %. $P < 0,01$) e, como esperado, INF.F apresentou aumento da preferência por sódio menos intensa que a dos machos ($40,54 \pm 5,6$ vs. $50,25 \pm 5,60$ %; $P < 0,05$).

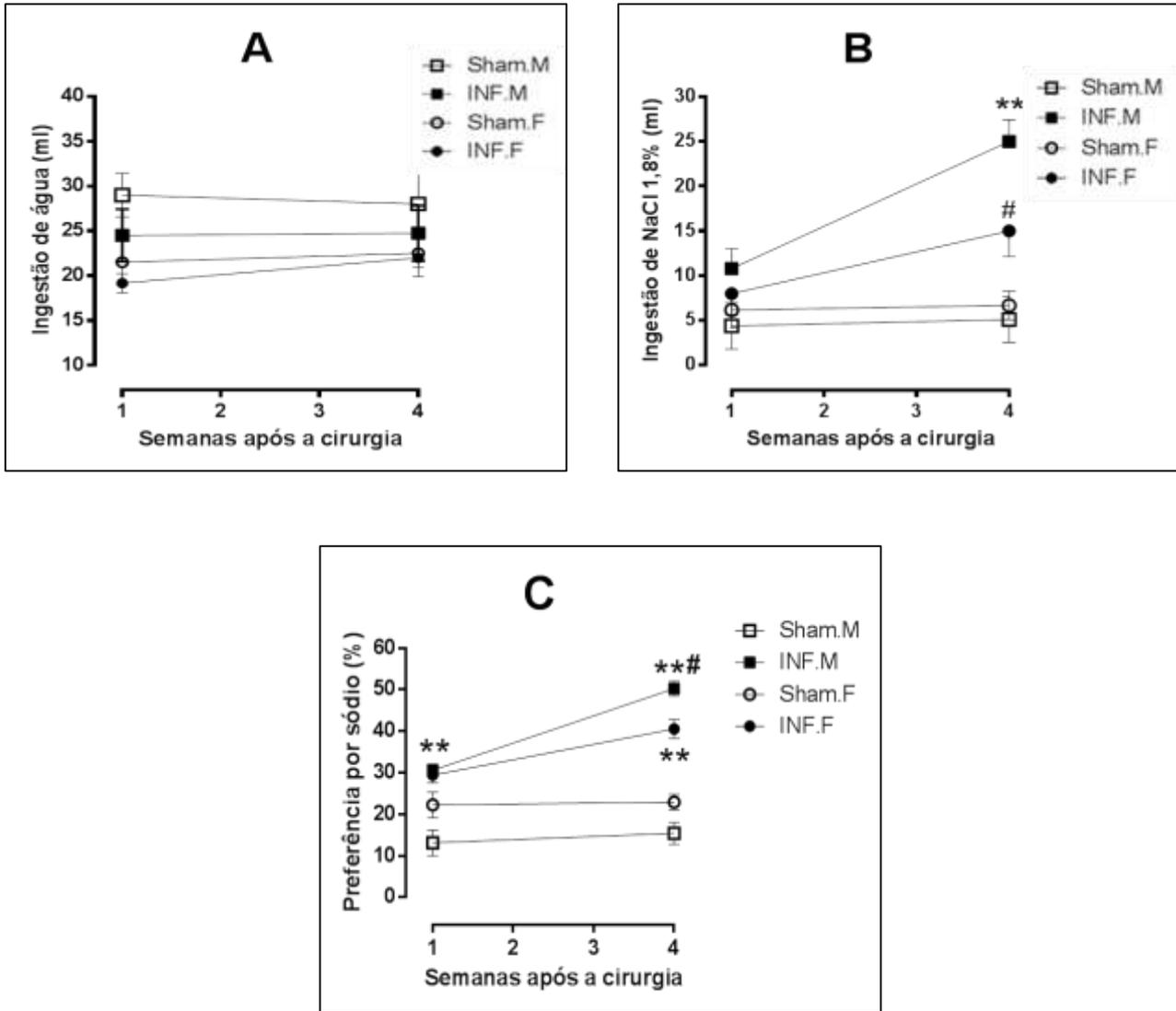


Figura 14. A: Avaliação da ingestão de água. B: Avaliação da ingestão de salina hipertônica (NaCl 1,8%). C: Avaliação da preferência por sódio. Dos grupos INF.M, Sham.M, INF.F e Sham.F. Sendo *P < 0,05 e **P < 0,01 vs. o respectivo controle e, #P < 0,05 e ##P < 0,01 vs. o sexo oposto.

5.1.4.2 Volume urinário

Na avaliação do volume urinário podemos observar redução deste parâmetro no grupo INF.F em relação a Sham.F ($14,21 \pm 1,16$ vs. $20,01 \pm 2,41$) e uma alteração ainda mais acentuada no grupo INF.M, uma vez que este reduziu significativamente em relação ao seu controle e em relação a INF.F ($8,1 \pm 1,1$ vs. $18,88 \pm 1,6$ ml; $P < 0,01$ e vs. $14,21 \pm 1,16$ ml; $P < 0,05$, respectivamente) na primeira semana pós-IM. Já na quarta semana após o IM, o grupo INF.F normalizou o volume urinário, enquanto o grupo

INF.M mostrou redução adicional no volume urinário em relação a Sham.M e INF.F (3,69 vs. 19,0 ± 1,5 e vs. 22,46 ± 1,34), como mostrado na Figura 15.

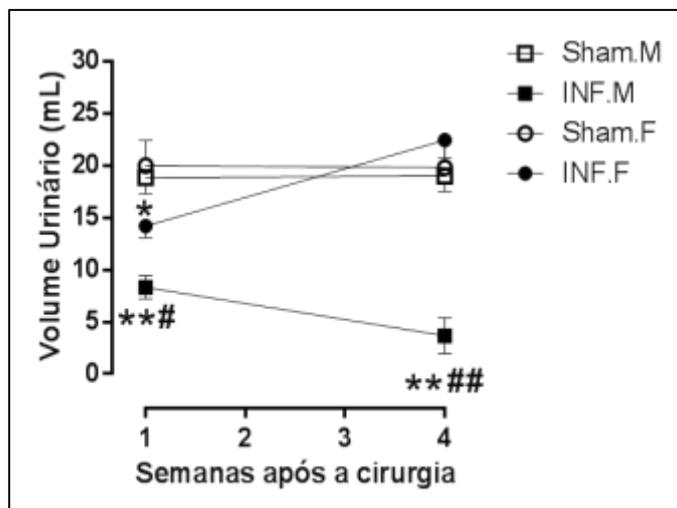


Figura 15. Avaliação do volume urinário dos grupos INF.M, Sham.M, INF.F e Sham.F. Sendo *P < 0,05 e **P < 0,01 vs. o respectivo controle e, #P < 0,05 e ##P < 0,01 vs. o sexo oposto.

Esses dados em conjunto sugerem distúrbios hidroeletrólíticos mais intensos e precoces nos machos e que se sobrepõem perfeitamente às alterações morfofuncionais cardíacas apresentadas anteriormente em machos e fêmeas infartados. Portanto, consideremos as alterações hidroeletrólíticas fundamentais para explicar, até aqui, o dimorfismo na geometria e função cardíacas.

5.1.5 Avaliação endócrina

5.1.5.1 Dosagem sérica dos hormônios tireoidianos

Observamos redução dos níveis séricos de T4 na primeira semana após indução ao IM no grupo INF.M comparado a Sham.M (1,22 ± 0,24 vs. 2,52 ± 0,11 µg/dl. P < 0,01). Esta redução se manteve até a quarta semana pós-IM (INF.M 1,54 ± 0,19 vs. Sham.M 2,55 ± 0,19 µg/dl. P < 0,01), como observado na Figura 16 A.

Os níveis séricos de T3 seguiram o mesmo padrão de alteração do T4. O grupo INF.M apresentou redução estatisticamente significativa em relação a Sham.M na primeira (83,0 ± 4,87 vs. 133,5 ± 3,3 µg/dl P < 0,01) e na quarta (87,89 ± 3,09 vs. 125,3

$\pm 9,48 \mu\text{g/dl}$ $P < 0,01$ semanas pós-IM (Figura 16B). Já o grupo INF.F não apresentou alteração tanto para os níveis séricos de T4 quanto de T3 em nenhum dos tempos estudados (Figura 16A e 16B).

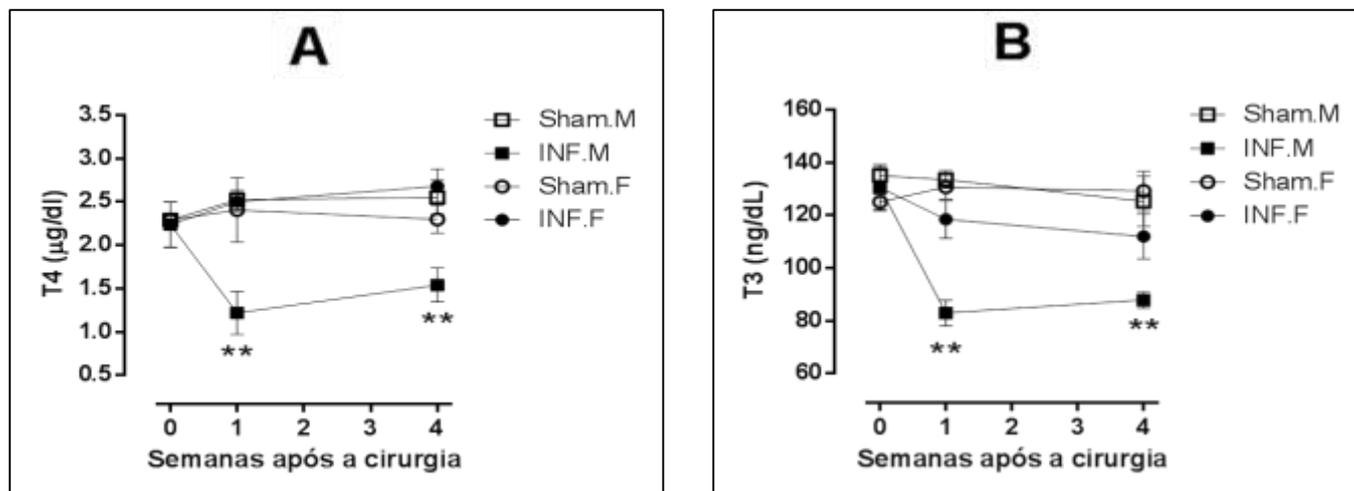


Figura 16. Avaliação dos níveis séricos de T4 (A) e T3 (B), 1 e 4 semanas pós-IM. Grupos INF.M, Sham.M, INF.F e Sham.F. Sendo ** $P < 0,05$ vs. Sham.M.

As alterações nas concentrações séricas dos hormônios tireoidianos nos animais infartados sugerem que o hipotireoidismo reflete qualitativamente, mas não quantitativamente a disfunção cardíaca observada nos machos, pois, embora haja evolução do processo congestivo e da disfunção do VE neste sexo, a queda dos hormônios tireoidianos se mantém praticamente constante na primeira e na quarta semanas pós-IM. Além disso, embora haja disfunção cardíaca, mesmo que mais branda nas fêmeas, não há alteração significativa desses hormônios em nenhum tempo de avaliação nessas ratas.

Portanto, consideramos as alterações do *status* tireoidiano parcialmente relevantes para explicar o dimorfismo na geometria e função cardíacas.

5.2 2ª ETAPA: ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DAS GÔNADAS FEMININAS NAS ALTERAÇÕES ENCONTRADAS 4 SEMANAS APÓS INFARTO DO MIOCÁRDIO.

5.2.1 Ecodopplecardiografia

Na Figura 17A, como esperado, observamos aumento estatisticamente significativo da relação AE/Ao no grupo INF_{INT} em relação ao grupo Sham_{INT} (~25% de aumento em relação ao seu controle sham). No entanto, quando a análise é feita nas fêmeas ovariectomizadas, esse aumento é mais acentuado (~75% de aumento em relação ao seu controle sham).

Quanto ao parâmetro que mede dilatação câmara ventricular esquerda (Figura 17B) os grupos INF_{INT} e INF_{OVX} apresentaram aumentos significativos similares do DDFVE comparados aos seus respectivos controles (INF_{INT} ~24% de aumento e INF_{OVX} ~16% de aumento).

Em relação à função sistólica (FEnc%) do VE, ambos os grupos infartados apresentaram redução deste parâmetro em relação aos seus respectivos controles ($P < 0,05$). No entanto, esta redução foi mais acentuada nas fêmeas infartadas ovariectomizadas (~54% de redução) do que nas fêmeas infartadas intactas (~28% de redução) em relação aos seus respectivos controles sham.

No estudo da função diastólica, relação entre as ondas E e A (relação E/A), apenas o grupo INF_{OVX} apresentou alteração estatisticamente significativa, com redução de ~35% em relação ao seu controle ($P < 0,05$).

Em conjunto, os dados da ecodopplecardiografia sugerem uma disfunção sistólica acompanhada de um processo congestivo e alteração no relaxamento ventricular esquerdo mais pronunciados nas fêmeas infartadas previamente ovariectomizadas, comparadas as inteiras também infartadas.

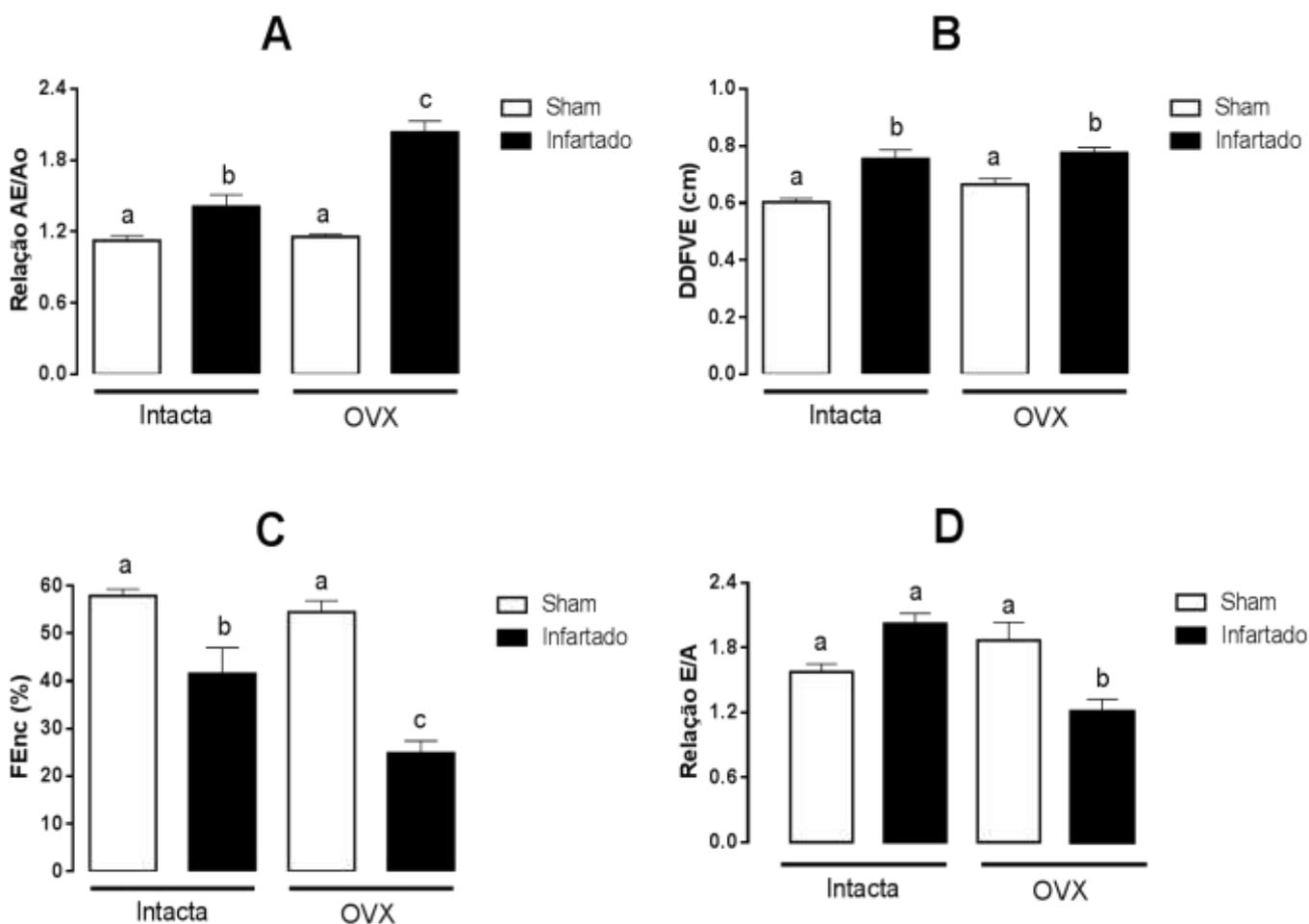


Figura 17. Estudo da geometria e das funções sistólica e diastólica do coração por meio de exame ecodopplercardiográfico realizado em todos os grupos. **A:** Relação entre os diâmetros internos do átrio esquerdo e da aorta (relação AE/Ao em cm) obtidas por exame ecodopplercardiográfico, uma e quatro semanas após o infarto experimental. **B:** Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DDFVE em cm). **C:** Fração de encurtamento (FEnc%) obtida pelo Modo-M. **D:** relação das velocidades de fluxo diastólico transvalvar mitral obtido pela técnica de Doppler pulsátil. Sendo a relação E/A, a relação entre a velocidade máxima da onda E e a velocidade máxima da onda A. Todos os parâmetros foram avaliados nos grupos Sham_{INT}, INF_{INT}, Sham_{OVX} e INF_{OVX}. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas.

5.2.2 Biometria

A Figura 18A mostra aumento similar ($P < 0,05$) do peso relativo dos corações dos grupos INF_{INT} e INF_{OVX}, comparados aos seus respectivos controles (INF_{INT} ~35% de aumento e INF_{OVX} ~45% de aumento).

Já no peso relativo do pulmão, apesar de ambos grupos infartados terem aumentado em relação aos seus respectivos controles (INF_{OVX} ~147% de aumento em

relação ao Sham_{OVX} e INF_{INT} ~ 55% de aumento em relação ao Sham_{INT}), o grupo INF_{OVX} pareceu desenvolver aumento mais acentuado do que no INF_{INT}, uma vez que houve diferença estatística também entre eles (INF_{OVX} vs. INF_{INT}, P < 0,05).

Não houve diferença no peso relativo do fígado entre os grupos (Figura 18C).

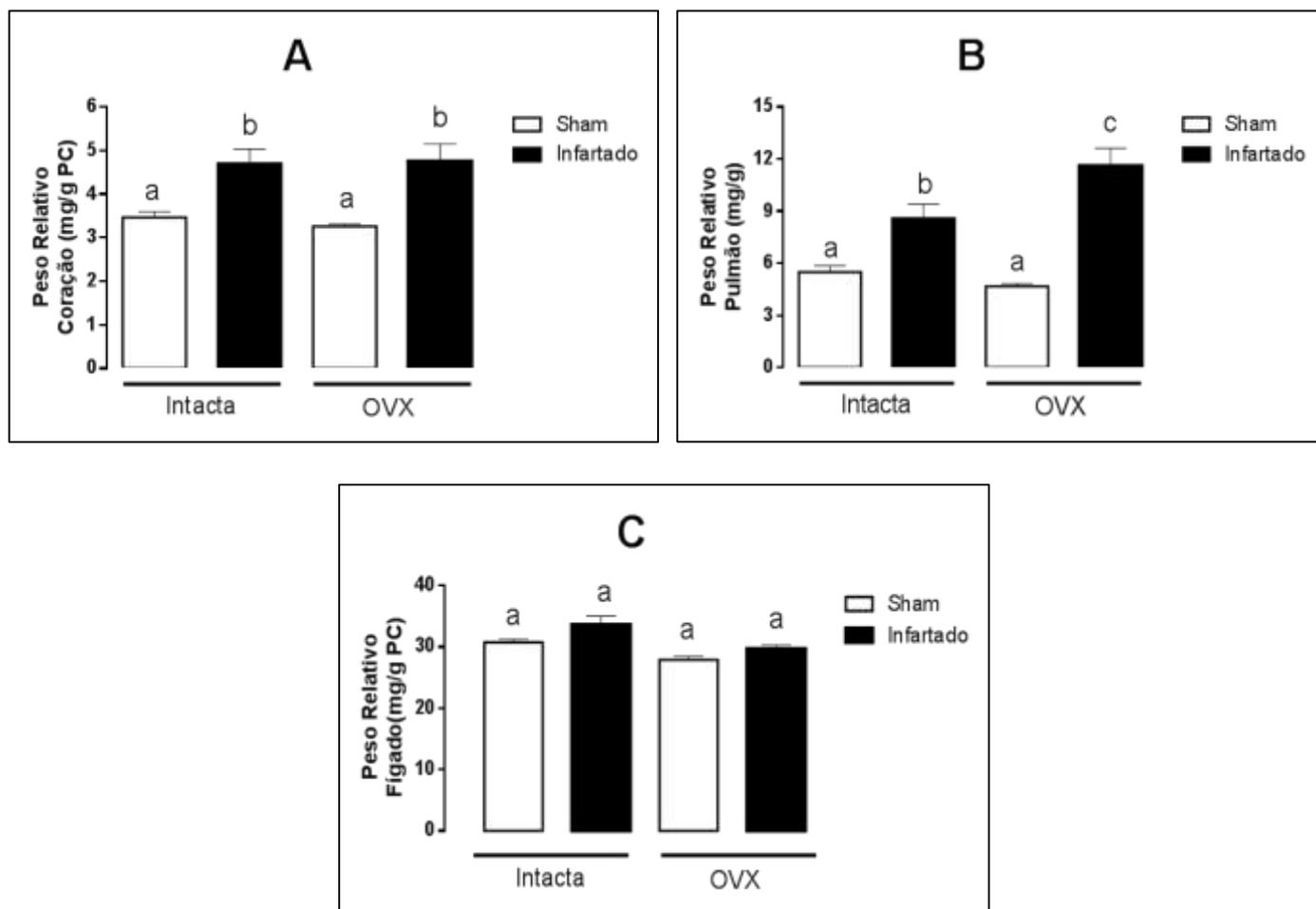


Figura 18: Peso relativo do coração (A), pulmão (B) e fígado (C) – mg/g de peso corporal; 4 semanas pós-IM. Dos grupos Sham_{INT}, INF_{INT}, Sham_{OVX} e INF_{OVX}. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas.

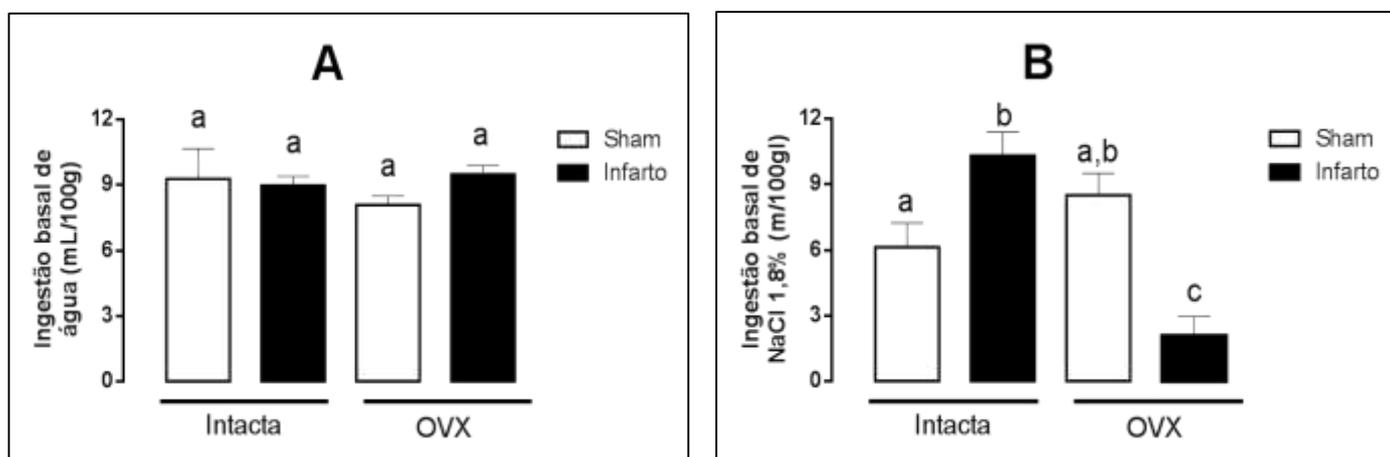
Os dados da biometria reforçam a tese de que o processo congestivo (medido aqui indiretamente em termos de peso relativo do pulmão) foi mais intenso nas fêmeas infartadas previamente ovariectomizadas comparadas às inteiras também infartadas. Corroborando os dados do ecocardiograma, a biometria sugere que a câmara ventricular esquerda tenha hipertrofiado/dilatado de forma similar entre esses grupos.

5.2.3 Regulação hidroeletrólítica

5.2.3.1 Avaliação da ingestão de fluidos

No estudo da ingestão de fluidos, não foi observada alteração na ingestão de água por nenhum dos grupos estudados (Figura 19A). Já na ingestão de salina hipertônica, como mostra a Figura 19B, o grupo INF_{INT} apresentou característica natriorexigênica, com aumento da ingestão de NaCl 1,8%, em relação ao seu controle (~70% de aumento) e, curiosamente, no grupo INF_{OVX} foi observada redução acentuada deste parâmetro (~76% de redução), sendo estatisticamente menor que o seu controle e que o grupo INF (P < 0,05). Intacta.

Estes dados anteriores em conjunto, tornarama preferência por sódio, Figura 19C, um reflexo do padrão da ingestão de salina hipertônica, com aumento estatisticamente significativo no grupo INF_{INT} em relação ao seu controle (~60% de aumento), e redução acentuada e estatisticamente significativa comparado ao grupo Sham_{OVX} e INF_{INT} (~55% de redução).



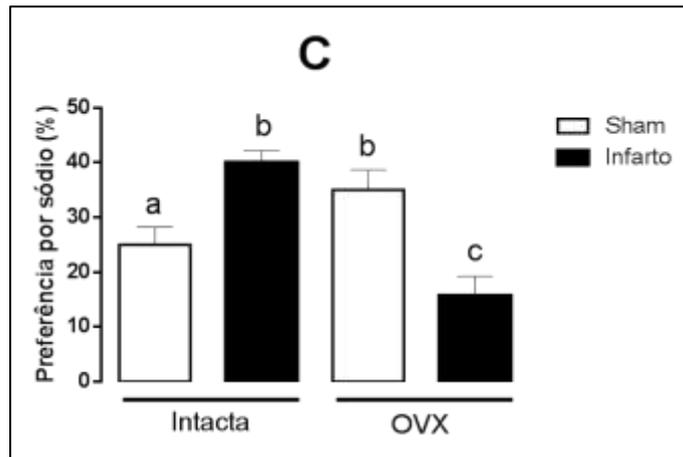


Figura 19. A: Avaliação da ingestão de água. B: Avaliação da ingestão de salina hipertônica (NaCl 1,8%). C: Avaliação da preferência por sódio; 4 semanas pós-IM. Dos grupos Sham_{INT}, INF_{INT}, Sham_{OVX} e INF_{OVX}. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (P<0,05).

5.2.3.2 Volume urinário

Na avaliação do volume urinário (Figura 20) os grupos infartados não apresentaram variação em relação aos seus respectivos controles (P > 0,05). No entanto, na ausência das gônadas (grupos Sham_{OVX} e INF_{OVX}), há redução do volume urinário, visto que foi observada diferença estatisticamente significativa dos grupos Sham_{OVX} e INF_{OVX} em relação aos grupos Sham_{INT} e INF_{INT} (P < 0,05).

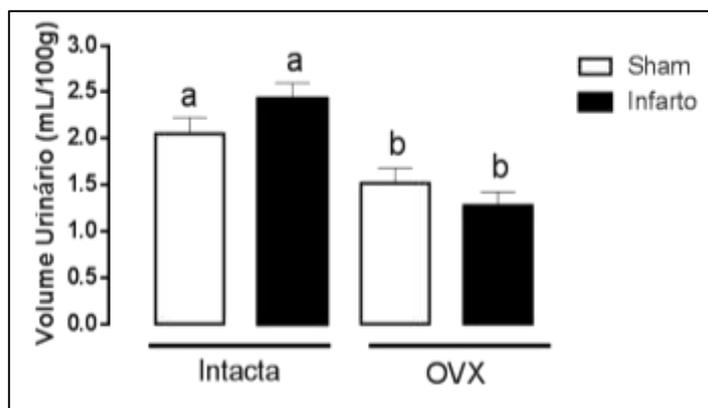


Figura 20. Avaliação do volume urinário, 4 semanas pós-IM, dos grupos Sham_{INT}, INF_{INT}, Sham_{OVX} e INF_{OVX}. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas.

Os dados do estudo hidroeletrólítico sugerem processos de regulação hidroeletrólítica diferentes nas fêmeas infartadas ovariectomizadas ou não. Enquanto, as intactas infartadas respondem com aumento da ingestão de salina hipertônica e excreção urinária de sódio normal, as ovariectomizadas reduzem a ingestão de salina, provavelmente, secundariamente a retenção urinária de sódio. A redução na excreção de sódio neste caso parece ser dependente da ausência dos ovários e não necessariamente devido ao infarto do miocárdio.

Em suma, mesmo perante uma resposta natriorexigênica aumentada as fêmeas infartadas intactas diante de uma excreção urinária de sódio normal, parecem conseguir promover regulação hidroeletrólítica dentro dos limites fisiológicos (ou alostáticos), mesmo com perda funcional cardíaca.

Por outro lado, nas fêmeas ovariectomizadas, a limitação na excreção de sódio pode ter comprometido o sistema em relação à maior retenção hídrica, sugerido fortemente pelas análises ecodopplercardiográficas (aumento da relação AE/Ao) e biométricas (aumento do peso relativo do pulmão), e sobrecarga do sistema cardiovascular, interferindo sobremaneira com aumento de pré-carga (refletindo no aumento da pressão diastólica final do VE) e conseqüentemente diminuição da função diastólica (sugerido pela baixa relação E/A no doppler) e sistólica (sugerido pela baixa FEnc% no ecocardiograma).

5.2.4 Avaliação Endócrina

5.2.4.1 Dosagem sérica dos hormônios tireoidianos

Na avaliação dos níveis séricos dos hormônios tireoidianos, não foi observada variação de T4 em nenhum dos grupos estudados (Figura 21A). No entanto, nos níveis séricos de T3, houve redução estatisticamente significativa apenas no grupo INF_{OVX} comparado ao seu controle Sham_{OVX} ($P < 0,05$), como observada na Figura 21B.

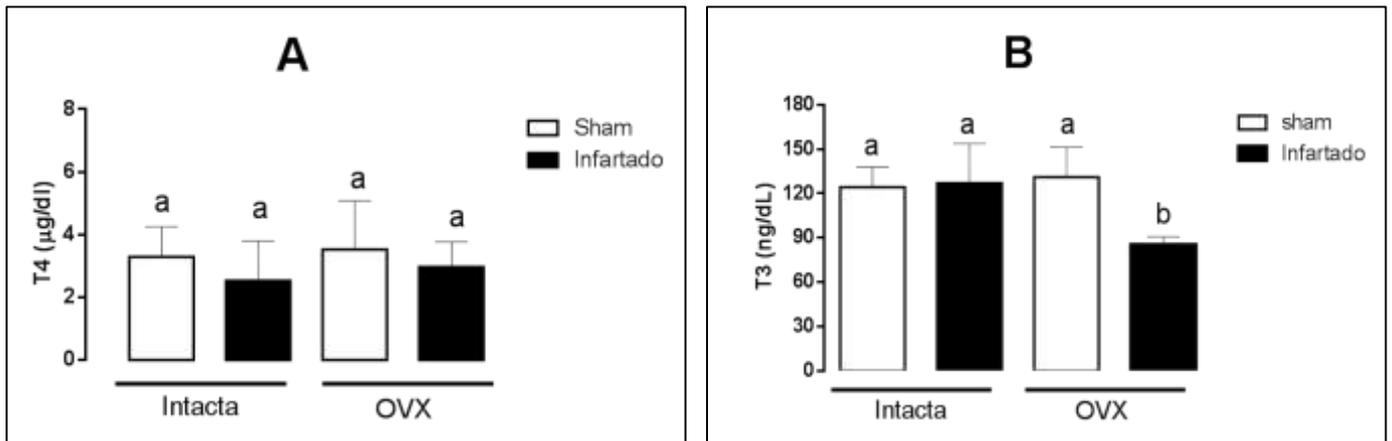


Figura 21. Avaliação dos níveis séricos de T4 (A) e T3 (B) por meio de radioimunoensaio; 4 semanas após as cirurgias nos grupos Sham_{INT}, INF_{INT}, Sham_{OVX} e INF_{OVX}. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente diferentes ($P < 0,05$).

Devido a discrepância nos níveis de T3 nas fêmeas infartadas intactas vs. infartadas ovariectomizadas, procurou-se investigar uma das principais vias de ativação de T4 em T3 no organismo, i.e., a atividade da desidase do Tipo 1 (D1) no fígado, um dos tecidos de maior atividade desta enzima. A hipótese era de que esta via de ativação do hormônio tireoidiano pudesse estar comprometida e, portanto, explicar os resultados de baixo T3 nesse grupo. Os resultados foram apresentados a seguir.

5.2.4.2 Atividade da iodotironina desidase tipo 1 (D1)

Como observado na Figura 22, não foi observada alteração no grupo das fêmeas intactas após o infarto em relação as fêmeas controles ($P > 0,05$). Já as fêmeas INF_{OVX} apresentaram redução estatisticamente significativa da atividade da D1, apenas em comparação ao grupo das intactas ($P < 0,05$). Quando comparadas ao seu próprio controle, o grupo INF_{OVX} apesar de apresentar uma tendência a redução, esta não foi estatisticamente significativa (Figura 22).

Estes dados sugerem que a presença do ovário é fundamental para a atividade normal da D1 hepática no infarto do miocárdio, e que a redução da atividade desta contribui para a queda do T3 nesses animais e provavelmente, contribui também para a disfunção cardíaca observada mais claramente neste grupo.

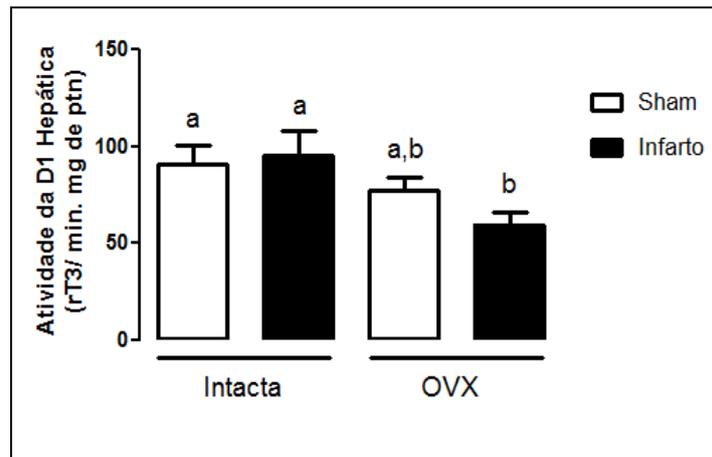


Figura 22. Determinação da atividade da iodotironina desiodase tipo 1 (D1) 4 semanas após as cirurgias nos grupos Sham.intacta, INF.intacta, Sham.OVX e INF.OVX. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

Estes dados sugerem que a presença do ovário é fundamental para a atividade normal da D1 hepática no infarto do miocárdio, e que a redução da atividade desta contribui para a queda do T3 nesses animais e provavelmente, contribui também para a disfunção cardíaca observada mais claramente neste grupo.

5.3 3ª ETAPA: ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO ESTRÓGENO NAS ALTERAÇÕES ENCONTRADAS 4 SEMANAS APÓS INFARTO DO MIOCÁRDIO

5.3.1 Ecodopplerardiografia

No estudo ecodopplercardiográfico desta fase, foi observado aumento significativo tanto na relação AE/Ao (Figura 23A), quanto no DDFVE (Figura 23B) apenas no grupo $INF_{OVX+Veic}$ em relação a $Sham_{OVX+Veic}$. Curiosamente, o grupo INF_{OVX+E2} não mostrou quaisquer diferenças significativas em relação ao seu controle ($INF_{OVX+Veic}$).

Embora a FEnc% tenha reduzido significativamente nos grupos $INF_{OVX+Veic}$ e INF_{OVX+E2} , em relação aos seus controles ($P < 0,05$), redução foi mais acentuada no grupo $INF_{OVX+Veic}$ vs, $Sham_{OVX+Veic}$ (~54% de redução) do que no INF_{OVX+E2} vs.

$INF_{OVX+Vei}$ (~24% de redução), sendo os valores de $F_{Enc\%}$ superiores no grupo INF_{OVX+E2} em relação ao grupo $INF_{OVX+Vei}$ ($P < 0,05$).

Em relação a função diastólica, a relação E/A reduziu no grupo $INF_{OVX+Vei}$ comparado a $Sham_{OVX+Vei}$, mas não foi estatisticamente diferente entre o INF_{OVX+E2} e seu respectivo controle ($P < 0,05$, Figura 23D).

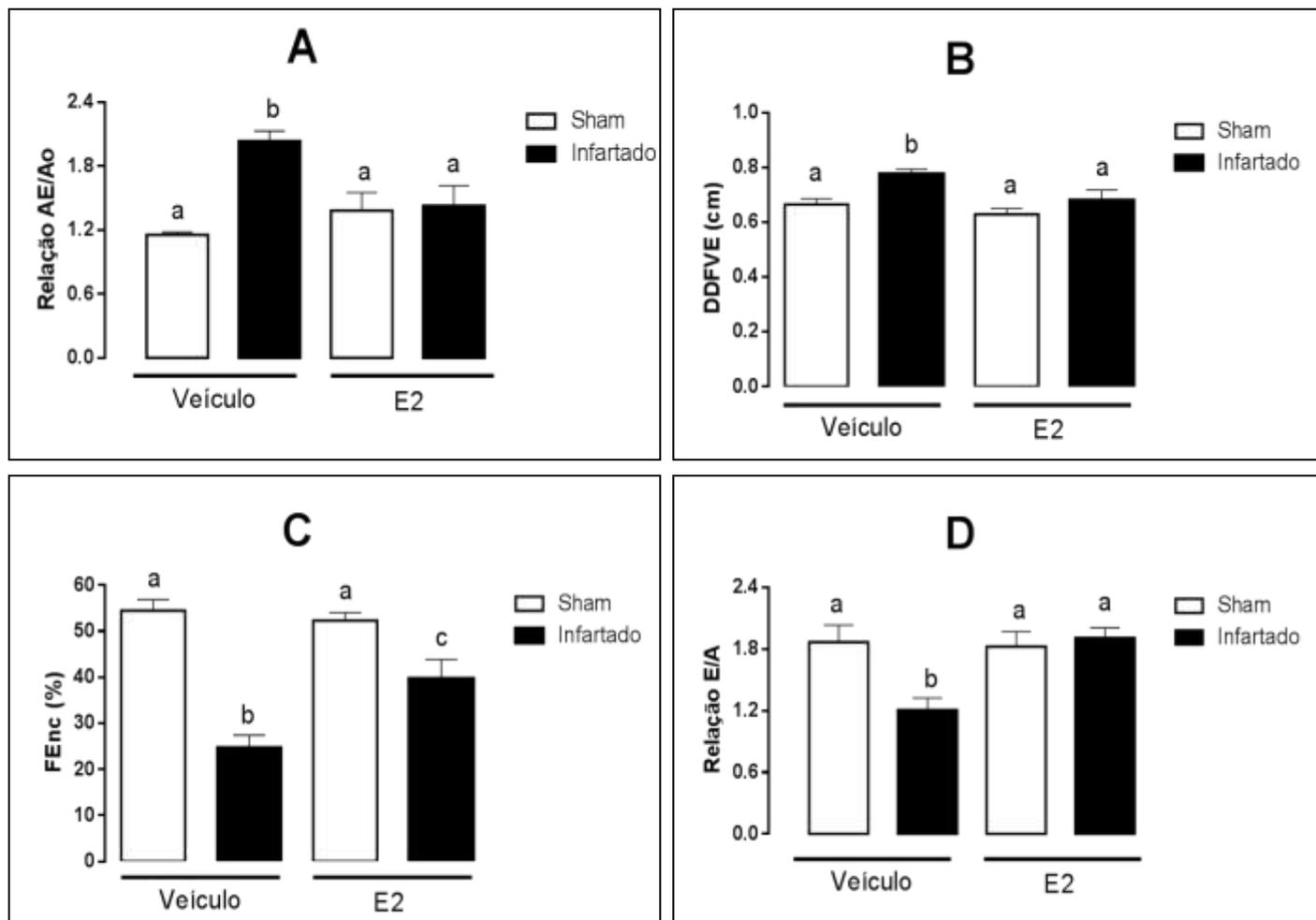


Figura 23. Estudo da geometria e das funções sistólica e diastólica do coração por meio de exame ecodopplercardiográfico realizado em todos os grupos. **A:** Relação entre os diâmetros internos do átrio esquerdo e da aorta (relação AE/Ao em cm) obtidas por exame ecodopplercardiográfico, uma e quatro semanas após o infarto experimental. **B:** Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DDFVE em cm). **C:** Fração de encurtamento ($F_{Enc\%}$) obtida pelo Modo-M. **D:** relação das velocidades de fluxo diastólico transvalvar mitral obtido pela técnica de Doppler pulsátil. Sendo a relação E/A, a relação entre a velocidade máxima da onda E e a velocidade máxima da onda A. Todos os parâmetros foram avaliados nos grupos $Sham_{OVX+Vei}$, $INF_{OVX+Vei}$, $Sham_{OVX+E2}$ e INF_{OVX+E2} . Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas.

Os dados do ecocardiograma desta fase confirmaram a importância do estrógeno na preservação da hemodinâmica cardiovascular, evitando o estabelecimento do processo congestivo e preservando a geometria e o relaxamento cardíacos normais. Em

conjunto estes fatores devem ter contribuído sobremaneira para a atenuação da disfunção contráctil induzida pelo infarto do miocárdio.

5.3.2 Biometria

Os pesos relativos do coração e do pulmão aumentaram significativamente apenas no grupo $INF_{OVX+Veic}$ em relação ao seu respectivo controle ($Sham_{OVX+Veic}$) como mostrado nas Figuras 24A e 24B ($P < 0,05$). Embora tenha havido tendência de aumento, não houve diferença significativa neste parâmetros no grupo INF_{OVX+E2} comparado ao seu controle $Sham_{OVX+E2}$ ($P > 0,05$).

Não houve diferença no peso relativo do fígado entre os grupos (Figura 24C).

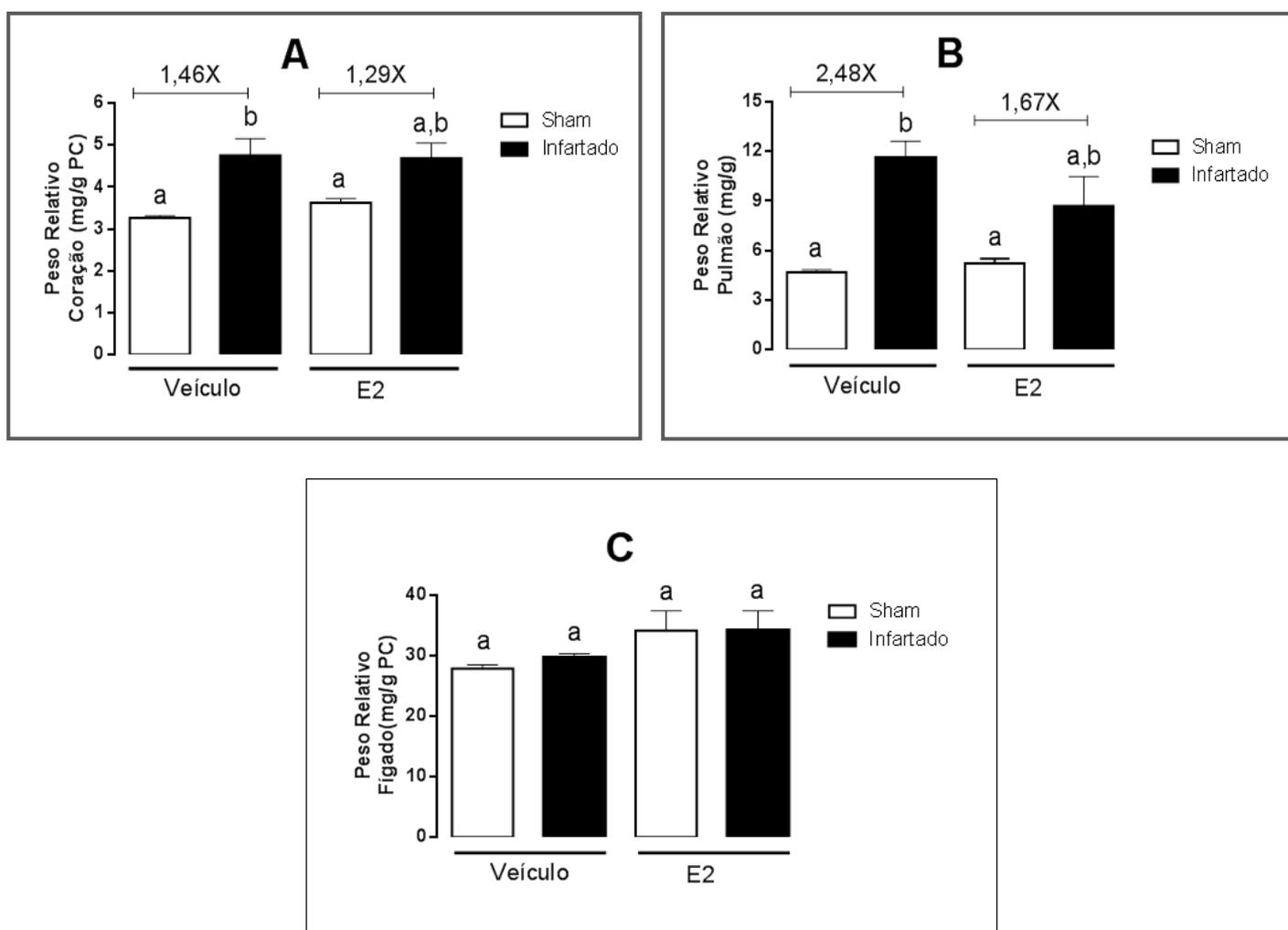


Figura 24. Peso relativo do coração (A), pulmão (B) e fígado (C) – mg/g de peso corporal; 4 semanas após as cirurgias nos grupos $Sham_{OVX+Veic}$, $INF_{OVX+Veic}$, $Sham_{OVX+E2}$ e INF_{OVX+E2} . Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

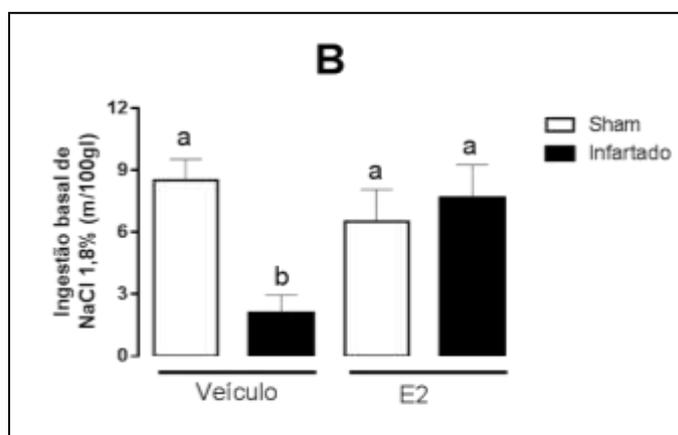
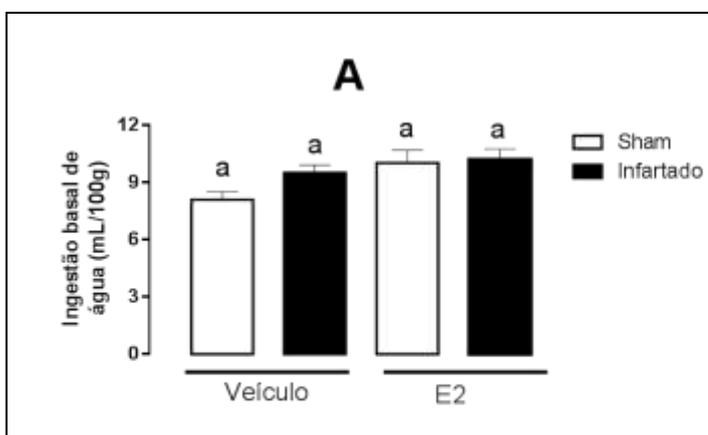
Os dados da biometria fortalecem e vão de encontro aos do ecocardiograma que confirmam a importância do estrogênio na preservação da hemodinâmica cardiovascular e na atenuação da disfunção do coração infartado.

5.3.3 Regulação hidrolétrica

5.3.3.1 Avaliação da ingestão de fluidos

Assim como em todas as etapas anteriores, os grupos estudados não variaram a ingestão de água ao longo do tempo de avaliação (4 semanas pós-cirurgia), como evidenciado na Figura 25A).

Já na ingestão de salina hipertônica, tanto a ingestão absoluta de salina (Figura 25B) como relativa, i.e., preferência por sódio (Figura 25C), diminuíram somente no grupo $INF_{OVX+Veic}$ comparadas aos controles ($P < 0,05$). Também não houve alteração nesses parâmetros no grupo INF_{OVX+E2} em comparação ao seu controle $Sham_{OVX+E2}$ ($P > 0,05$).



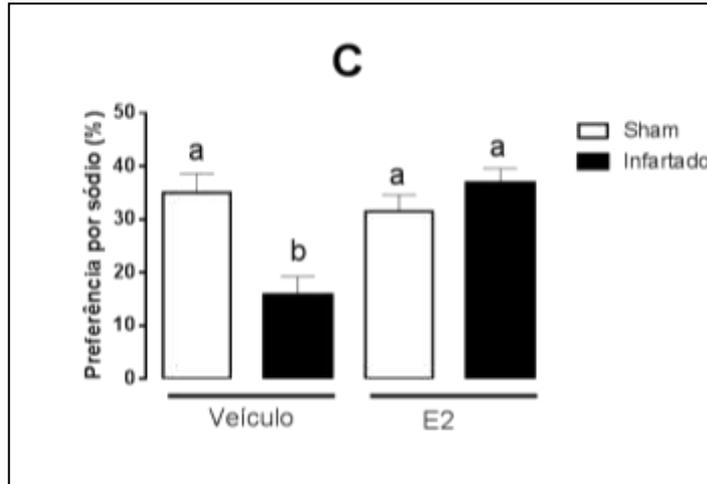


Figura 25. A: Avaliação da ingestão de água. B: Avaliação da ingestão de salina hipertônica (NaCl 1,8%). C: Avaliação da preferência por sódio; 4 após as cirurgias nos grupos Sham_{OVX+Veic}, INF_{OVX+Veic}, Sham_{OVX+E2} e INF_{OVX+E2}. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, P < 0,05.

5.3.3.2 Volume Urinário

A Figura 26 mostra que o infarto, mais uma vez, não pareceu influenciar o volume urinário, mas sim a presença ou ausência do estrógeno, uma vez que foi evidenciada diferença significativa dos grupos Sham_{OVX+Veic} e INF_{OVX+Veic} em comparação a Sham_{OVX+E2} e INF_{OVX+E2} (P < 0,05).

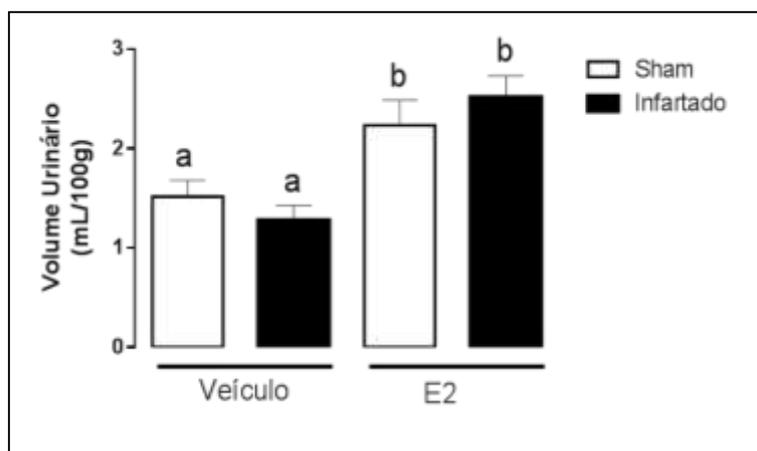


Figura 26. Avaliação do volume urinário, 4 semanas após as cirurgias nos grupos Sham_{OVX+Veic}, INF_{OVX+Veic}, Sham_{OVX+E2} e INF_{OVX+E2}. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, P < 0,05.

5.3.4 Avaliação Endócrina

5.3.4.1 Dosagem sérica dos hormônios tireoidianos

O estudo da economia dos hormônios tireoidianos nesta etapa, assim como na anterior, mostrou que não houve alteração nos níveis séricos de T4 em nenhum dos grupos estudados, como visto na Figura 27A.

No entanto, em relação aos níveis séricos de T3, foi evidenciado diminuição significativa ($P < 0,05$) apenas no grupo INF.Veículo em relação ao seu respectivo controle (Figura 27 B). Embora no grupo infartado repostado também tenha havido diminuição neste parâmetro, esta não alcançou significância estatística e se mostrou menos intensa (14% de redução) do que aquela observada no grupo infartado sem reposição (35% de redução).

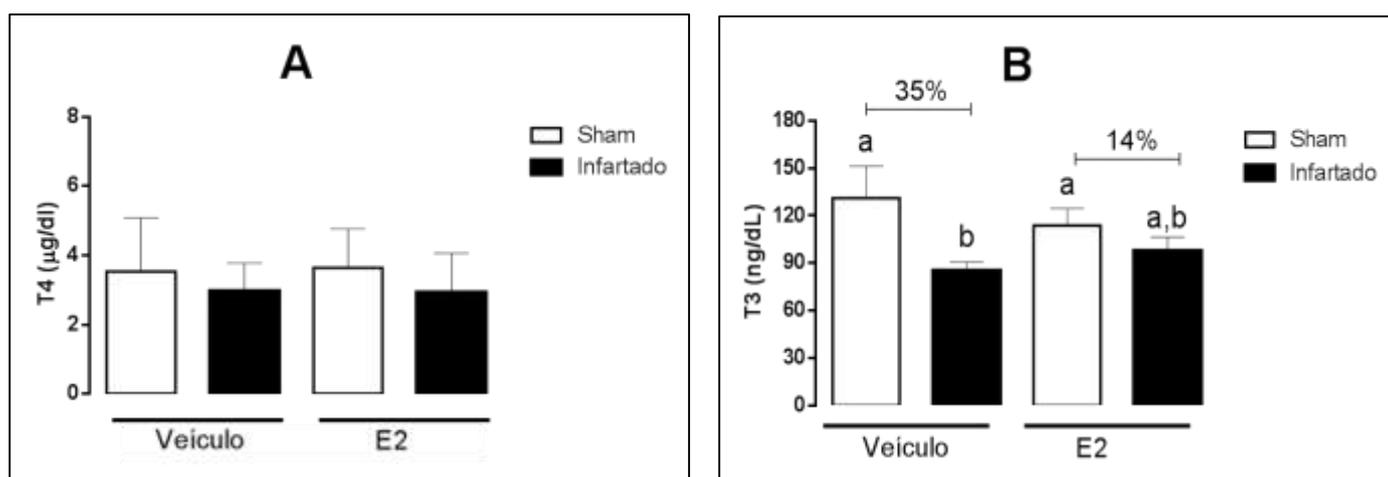


Figura 27. Avaliação dos níveis séricos de T4 (A) e T3 (B), 4 semanas após as cirurgias nos grupos Sham_{OVX+Veic}, INF_{OVX+Veic}, Sham_{OVX+E2} e INF_{OVX+E2}. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, $P < 0,05$.

5.3.4.2 Atividade da iodotironina desiodase tipo 1 (D1)

Assim como na Etapa anterior, a D1 hepática foi estudada para se testar a hipótese de que a diminuição da atividade da mesma pudesse estar envolvida nas alterações nos níveis de T3 circulantes. Como observado na Figura 28, a atividade da D1, não variou em função do infarto, pois não apresentou diferença significativa nos grupos infartados

em relação aos seus respectivos controles ($P > 0,05$). No entanto, o tratamento de reposição com estrógeno, independentemente do infarto, aumentou significativamente a atividade de D1 nos grupos Sham_{OVX+E2} e INF_{OVX+E2}, comparados aos grupos Sham_{OVX+Veic} e INF_{OVX+Veic} ($P < 0,05$).

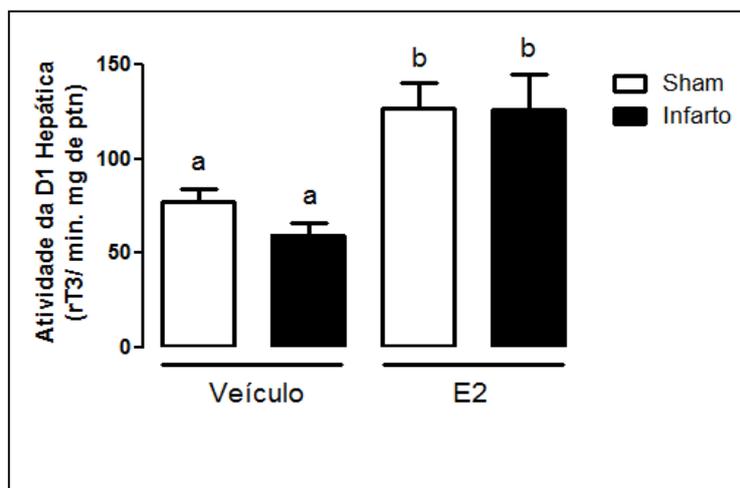


Figura 28. Determinação da atividade da iodotironina desiodase tipo 1 4 semanas após as cirurgias nos grupos Sham_{OVX+Veic}, INF_{OVX+Veic}, Sham_{OVX+E2} e INF_{OVX+E2}. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, $P < 0,05$.

Esses dados em conjunto sugerem que o tratamento com estrógeno na dose de reposição, aumentou a atividade da D1 hepática (e possivelmente em outros tecidos não avaliados neste estudo) e contribuiu para a normalização dos níveis de T3 nas fêmeas infartadas previamente ovariectomizadas.

6. DISCUSSÃO

6.1 1ª ETAPA: ESTUDO SERIADO NO MODELO DE INFARTO DO MIOCÁRDIO EM RATOS MACHOS E FÊMEAS – AVALIAÇÃO DO DIMORFISMO SEXUAL

Os resultados mais importantes desta etapa foram aqueles que mostraram um claro dimorfismo sexual nas alterações funcionais cardíacas, medidas aqui por meio de ecodopplercardiografia, induzidas pela cirurgia de infarto do miocárdio, i.e., ligadura da artéria coronária esquerda de ratos

Sabe-se que mulheres desenvolvem menos doenças cardiovasculares que homens e, esta diferença desaparece após a menopausa (EAKER *et al.* 1993; LERNER & KANNEL, 1986). Diversos estudos experimentais já foram realizados para elucidar o motivo da ocorrência deste dimorfismo sexual, no entanto, os resultados são bastante controversos. Neste estudo, buscamos através da utilização de um modelo clássico de indução a ICC traçar as diferenças nas alterações morfofuncionais do coração entre machos e fêmeas pós-IM e, avaliar os possíveis mecanismos neuroendócrinos que contribuem para essas diferenças entre os gêneros.

O estudo morfofuncional do coração realizado por meio da ecodopplercardiografia demonstrou alteração cardíaca, com o aumento do DDFVE, que iniciou na primeira semana pós-IM nos machos e, pareceu continuar progressivamente até a quarta semana. Esta dilatação progressiva do VE já foi descrita anteriormente no mesmo modelo utilizado neste trabalho (FRANCIS *et al* 2001). Ainda no nosso estudo, observamos que as fêmeas apresentaram dilatação da câmara apenas na quarta semana pós-IM e esta pareceu ser menos acentuada que nos machos, visto a diferença significativa deste parâmetro entre machos e fêmeas neste período. O mesmo foi encontrado na relação AE/Ao, que reflete indiretamente o grau de congestão esquerda, em que houve aumento da relação nos machos já na primeira semana, parecendo também evoluir até a quarta semana, sugerindo a ocorrência de processo congestivo progressivo. Mais uma vez, o aumento da relação AE/Ao nas fêmeas foi visto apenas na quarta semana e aparentemente mais brando.

A função sistólica dos machos, avaliada através da FEnc%, reduziu na primeira semana pós-infarto e permaneceu reduzida até a quarta semana, enquanto nas fêmeas a diminuição da função sistólica foi observada apenas na quarta semana pós-IM e menos intensa que nos machos. Francis *et al* (2001) utilizando o mesmo modelo de ICC, também observaram queda aguda da função sistólica e sua posterior estabilização em baixos níveis (~50% de queda) até a 6ª semana pós-infarto em ratos machos.

A função diastólica, medidas aqui em termos de relação entre as ondas Ee A, apresentou um padrão de enchimento ventricular “restritivo”, somente nos machos na quarta semana pós-IM.

Em conjunto, os dados da ecodopplercardiografia sugerem respostas adaptavidas (ou maladaptativas) diferentes entre machos e fêmeas. Enquanto em machos a possível manutenção do débito cardíaco, sugerida em um dos poucos trabalhos seriados neste modelo (Francis *et al* 2001), é garantida graças ao aumento progressivo da câmara do

VE a despeito da baixa FEnc%, nas fêmeas a alostase é mantida com um remodelamento e disfunção cardíaca menos intensos. Neste sentido, a manutenção das propriedades diastólicas (sugerida aqui pela relação entre as ondas E e A normal no doppler) nas fêmeas deve ter assegurado um nível de contractilidade (FEnc%) maior e um processo congestivo de instalação mais lenta e branda comparados aos machos.

Devido a escassez de trabalhos utilizando o modelo do infarto em ratos fêmeas, em função, dentre outras razões, da grande variação em dados biológicos deste gênero a comparação dos nossos dados com a de outros grupos fica limitada. Em um dos raros trabalhos que objetivaram avaliar aspectos concernentes ao dimorfismo sexual no modelo de infarto, Cavasin et al. (2004), demonstram diferenças na função/remodelamento cardíaco entre camundongos machos e fêmeas após infarto agudo do miocárdio, com machos apresentando a função ventricular esquerda reduzida, dilatação do VE mais proeminente e hipertrofia do cardiomiócito mais acentuada, em comparação as fêmeas. Embora obtidos em camundongos, esses dados corroboram os nossos resultados.

A biometria realizada em nosso estudo mostrou que os machos apresentam hipertrofia cardíaca já na primeira semana pós-IM, enquanto as fêmeas apenas na quarta semana e, mesmo assim, atenuada em relação aos machos neste período. Tanto machos quanto fêmeas apresentam congestão pulmonar na quarta semana após cirurgia sendo, no entanto, mais intensa nos machos. Estes resultados vão de acordo aos encontrados na ecodopplercardiografia e sugerem que os machos desenvolvam alterações morfofuncionais mais prematuras e graves, em relação às fêmeas. As alterações pós-IM se mostraram, portanto, tempo e gênero dependentes, motivando a busca por diferenças entre os sexos, que justifiquem a ocorrência desta progressão acelerada da IC nos machos e a atenuação e atraso no remodelamento e na disfunção cardíaca nas fêmeas. De qualquer forma, os sistemas homeostáticos recrutados em resposta ao infarto, entram em exaustão (perda de ganho) e o resultado é a descompensação cardíaca sugerida aqui pela instalação do processo congestivo, mesmo que em tempos diferentes, mas em ambos os sexos. Compreender quais são esses possíveis mecanismos e, é claro, buscar o dimorfismo sexual na operação dos mesmos, motivou a continuação deste estudo no sentido da investigação dos possíveis candidatos para explicar esta discrepância entre gêneros.

Sabe-se que o coração infartado apresenta disfunção sistólica, com consequente aumento adaptativo da resposta neurohumoral, na tentativa de manter o débito cardíaco

e perfusão sanguínea dos tecidos, porém a cronicidade desta resposta acaba por aumentar o risco de desenvolvimento de IC. Estudos em ratos machos, demonstram que logo após o IM há hiperativação do sistema nervoso autônomo simpático, frequentemente associado à disfunção contrátil, morte celular, produção de citocinas e arritmogênese (COHN *et al.*, 1984; FERGUSON *et al.*, 1990; PACKER *et al.*, 1992; FRANCIS *et al.*, 1989; MEREDITH *et al.*, 1993; LIU *et al.*, 1999; PATEL *et al.*, 2000; FELDER *et al.*, 2002; KISHI *et al.*, 2012; MILL *et al.*, 1991). Sendo assim, a primeira hipótese para justificar a progressão acelerada da IC nos machos e a atenuação e atraso no remodelamento e na função cardíaca nas fêmeas, foi a busca por diferenças gênero-dependentes no balanço simpato-vagal cardíaco.

No entanto, ao realizar o estudo da variabilidade da frequência cardíaca, encontramos aumento da relação LF/HF nos machos, apenas na primeira semana após infarto, retornando aos níveis normais na quarta semana. Estes resultados, portanto, não se relacionam com as alterações encontradas no estudo morfofuncional, já que nos machos, na primeira semana pós-IM, quando foi encontrado predomínio da modulação simpática (aumento da relação LF/HF) não há congestão. Já na quarta semana, em que foi observada normalização do balanço simpato-vagal, a descompensação acontece (congestão pulmonar). Nas fêmeas também não parece haver relação entre as alterações no balanço simpato-vagal e a descompensação cardíaca, pois, nelas a descompensação também ocorre na quarta semana pós-IM (mesmo que mais branda do que nos machos) e não há em nenhum momento (primeira e quarta semana pós-IM) alteração no balanço simpato-vagal cardíaco. No estudo de Pinkham e colaboradores (2012), a indução ao infarto do miocárdio levou ao aumento da atividade do nervo simpático renal apenas nos machos comparados a fêmeas intactas, e somente nas primeiras duas horas após indução ao infarto. Estes dados corroboram os nossos em relação ao aumento da modulação simpática pós-IM, que não foi observada nas fêmeas tanto no estudo de Pinkham *et al.* (2012) quanto no nosso. No entanto, apesar de não apresentarem alteração no balanço simpato-vagal, as fêmeas desenvolvem ICC mesmo que mais tardia e mais branda que os machos, além disso, o aumento da modulação simpática nos machos não parece se sustentar, já que não foi observada alteração na quarta semana pós-IM.

A próxima hipótese testada, foi a de que alterações na regulação hidroeletrólítica, avaliada pela análise da ingestão de fluidos e volume urinário, pudessem justificar, pelo menos em parte, o dimorfismo encontrado em nosso modelo

de infarto. Concomitante as alterações cardíacas/hemodinâmicas, neste estudo observamos que nos machos, as alterações se manifestam já na primeira semana pós-infarto com aumento do consumo de salina hipertônica e redução no volume urinário. Estes efeitos parecem ter relação com a progressão da IC, pois, na quarta semana pós-IM, com agravamento do quadro de insuficiência cardíaca, observam-se aumento da preferência por sódio e redução do volume urinário adicionais, sugerindo mal adaptação do sistema de regulação hidroeletrólítica.

Já nas fêmeas, também parece haver relação entre os achados de regulação hidroeletrólítica e a função/remodelamento cardíaco. Quando as alterações do remodelamento/ função do coração infartado não são claras (uma semana pós-infarto), é observado apenas uma diminuição do volume urinário (mais tênue comparada aos machos). Por outro lado, quando a insuficiência cardíaca se manifesta claramente (processo congestivo na quarta semana pós-infarto por exemplo), a preferência por sódio se torna evidente, mesmo que ainda menor que a dos machos. Este achado pode ter relação com a normalização do volume urinário nas fêmeas que começa baixo (primeira semana) e normaliza na quarta semana. Esta normalização do volume urinário na quarta semana nas fêmeas deve atenuar o processo congestivo e conseqüentemente normalizar a pré-carga (observada em termos de relação E/A no ECO) e por fim, atenuar a queda da função sistólica (FEnc%). Dados semelhantes aos nossos obtidos em machos, foram encontrados nos estudos de FRANCIS et al. 2001 e FRANCIS et al. 2001, em que foi mostrado o aumento do apetite por sódio, assim como a redução do volume urinário em ratos machos da primeira até a sexta semana após o infarto do miocárdio, período que durou o protocolo experimental nestes dois estudos referidos.

Antunes & Covian(1963) demonstraram redução da ingestão espontânea de sal em ratas fêmeas durante o estro (aumento do estrógeno circulante) e, o aumento deste parâmetro durante o diestro (redução do estrógeno circulante). Outros estudos, com ratas ovariectomizadas e tratadas com E2 demonstram influência deste hormônio na regulação hidroeletrólítica, particularmente na ingestão de sal, tendo as ratas tratadas com E2 redução do apetite por sódio (FREGLY *et al.*, 1973; CARLBERG *et al.*, 1984; KRAUSE *et al.*, 2003). Sendo assim, a alteração hidroeletrólítica mais tardia e menos intensa encontrada nas fêmeas pós-IM, no nosso estudo, pode ser devido à influência do E2.

Sabendo-se da importância dos hormônios tireoidianos na regulação cardiovascular (DANZI & KLEIN *et al.*, 2012) e da alteração no status tireoidiano em

resposta ao infarto do miocárdio (FRANKLYN *et al.*, 1984; OLIVARES *et al.*, 2007), a terceira hipótese a ser avaliada foi a possível alteração nos níveis séricos de hormônios tireoidianos em ratos machos e fêmeas pós-IM. Nos machos foi encontrado neste estudo, hipotireoidismo, como já descrito anteriormente pelo nosso grupo e caracterizado como um hipotireoidismo consuptivo devido ao aumento concomitante da atividade ectópica da desidase tipo 3, responsável pela inativação dos hormônios tireoidianos (OLIVARES *et al.*, 2007). Já nas fêmeas não foi observada alteração dos níveis séricos tanto de T3 quanto de T4 em nenhum dos tempos avaliados. Estes resultados sugerem, portanto, que os hormônios tireoidianos seriam importantes para a adaptação morfofuncional do coração pós-IM, uma vez que nas fêmeas não há hipotireoidismo e elas apresentam desenvolvimento mais brando da IC. Curiosamente, estudos mostram que ratos hipotireoideos aumentam a ingestão de salina hipertônica (Taylor & Fregly, 1964; Fregly & Rowland, 1985; Belló & Covian, 1988, 199; Badauê-Passos *et al.* 2001), o que poderia justificar, em parte, a diferença na regulação hidroeletrólítica entre machos e fêmeas e o desenvolvimento mais intenso da disfunção e remodelamento cardíaco pós-IM nos machos, como observado nesta etapa do nosso estudo.

Pol *et al.* 2011, utilizaram o modelo de indução ao infarto do miocárdio em camundongos e, na avaliação do metabolismo dos hormônios tireoidianos, encontraram assim como o nosso grupo (Olivares *et al.* 2007), aumento da enzima D3 pós-IM, no entanto não observaram redução dos níveis séricos de T3. Apesar de, no estudo de Pol *et al.* ser utilizado camundongo e no trabalho de Olivares *et al.* (2007), assim como no presente estudo ter sido utilizado rato como modelo experimental, possivelmente, o fator mais relevante para a diferença no resultado encontrado com relação aos níveis séricos de T3 por Pol e colaboradores, seja o fato de ter sido utilizado animais de ambos os sexos. Como vimos no presente estudo, os machos apresentam redução dos níveis séricos de T3 pós-IM, no entanto, fêmeas submetidas ao mesmo protocolo experimental não apresentam tal alteração.

Resumindo, nesta primeira etapa as informações mais relevantes foram a de que os machos apresentam o processo de desenvolvimento do remodelamento cardíaco e processo congestivo mais precoce e mais intenso que as fêmeas. Quanto a regulação hidroeletrólítica, esta parece estar alterada e influenciar sobremaneira nesta diferença, favorecendo as fêmeas que desenvolvem a IC mais tardiamente e de forma mais branda. Além disso, os hormônios tireoidianos também podem ter uma participação importante

no processo de adaptação cardíaca pós-IM, já que o hipotireoidismo foi observado apenas nos machos. Se o hipotireoidismo é uma resposta adaptativa (alostática) importante ou se constitui mais um mecanismo maladaptativo, isso ainda está sendo investigado, inclusive pelo nosso grupo. Finalmente, a hipótese da influência do balanço simpato-vagal não pareceu ser o principal fator para justificar o dimorfismo encontrado em vários aspectos do desenvolvimento da IC, foi descartada, uma vez que não foi observada relação temporal entre o remodelamento/processo congestivo e as alterações autonômicas em ambos os sexos.

6.2 2ª ETAPA: ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DAS GÔNADAS FEMININAS NAS ALTERAÇÕES ENCONTRADAS 4 SEMANAS APÓS INFARTO DO MIOCÁRDIO

Diante do dimorfismo sexual observado nos resultados da etapa anterior, consideramos importante avaliar a influência das gônadas femininas nas alterações hidroeletrólíticas e no distúrbio endócrino (hipotireoidismo), encontrados pós-IM e a influência destas alterações no desenvolvimento da IC após o infarto. Como as alterações vistas nas fêmeas ocorreram principalmente quatro semanas pós-IM, nesta etapa as avaliações foram realizadas apenas neste período. Sendo assim, ratos Wistar fêmeas foram ovariectomizadas e após duas semanas submetidas ao infarto do miocárdio ou à falsa-operação, como descrito nos itens 4.5 e 4.4, respectivamente e decorridas quatro semanas, foram realizadas as avaliações morfofuncionais, hidroeletrólíticas e endócrinas.

A ovariectomia não pareceu influenciar no remodelamento cardíaco, já que foi observado aumento do diâmetro diastólico final do VE (DDF) no ECO e, do peso relativo do coração na biometria, tanto no grupo INF_{OVX} quanto INF_{INT} *versus* seus respectivos controles falso-operados (Sham) para a cirurgia do infarto. No entanto, foi observado aumento da relação AE/Ao e do peso relativo do pulmão, mais acentuado no grupo INF_{OVX} comparado ao grupo INF_{INT}, e também redução adicional da FEnc% no grupo INF_{OVX}. Logo, os hormônios ovarianos parecem atenuar o processo congestivo, caracterizado pela relação AE/Ao e peso relativo do pulmão e a função sistólica, relacionado com a FEnc% no ECO. Especula-se, além disso, que a ausência dos hormônios ovarianos prejudicou o relaxamento (função diastólica) do ventrículo esquerdo, uma vez que foi observada redução da relação E/A (padrão de enchimento

ventricular do tipo restritivo) apenas no grupo INF_{OVX}. Esta alteração provavelmente aumentou a susceptibilidade ao processo congestivo, o que pode ter contribuído para a disfunção sistólica adicional observada neste grupo. Em trabalho com camundongos, Cavasin *et. al* (2003) encontraram, assim como no presente estudo, que fêmeas intactas apresentam a função cardíaca mais bem preservada que os machos após o infarto do miocárdio e, a ovariectomia aboliu esta diferença entre os sexos. Além disso, no referido estudo foi observada hipertrofia do cardiomiócito pós-IM nos grupos de fêmeas intactas, ovariectomizadas e machos intactos, havendo aumento adicional apenas nos machos. Sendo assim, a atenuação no remodelamento cardíaco observado nas fêmeas intactas (tanto no nosso como no estudo de Cavasin *et. al.* 2003) não parece ser o fator determinante para o desenvolvimento mais brando da disfunção cardíaca, uma vez que o grupo OVX apresentou hipertrofia semelhante às intactas e em contrapartida uma disfunção cardíaca mais acentuada que as intactas e semelhantes aos machos.

Diante destes resultados, buscou-se avaliar a importância dos hormônios ovarianos na regulação hidroeletrólítica após o infarto do miocárdio e se a disfunção cardíaca adicional encontrada nas fêmeas ovariectomizadas poderia ser explicada por alterações na regulação hidroeletrólítica. Assim, nesta etapa, observamos que o infarto nas fêmeas intactas (grupo INF_{INT}) levou ao aumento do apetite por sódio e, apenas a ausência das gônadas (grupo Sham_{OVX}) induziu o mesmo comportamento, muito embora isto tenha ficado mais claro do ponto de vista estatístico somente no parâmetro “preferência por sódio”. Dados da literatura sugerem que a ausência das gônadas femininas leva ao aumento da ingestão de água e salina hipertônica, induzido pela administração de angiotensina II, e isto provavelmente ocorre devido a maior sensibilidade ao receptor AT1 em ratas ovariectomizadas (Mecawi *et al.* 2007). Os resultados de Dean e colaboradores, 2004 também sustentam a hipótese de que haja aumento da ligação entre angio II e receptores AT1 em ratas OVX. O que possivelmente ocorreu no grupo Sham_{OVX} em nosso estudo, foi o aumento da ingestão de salina hipertônica, devido ao aumento da influência da ação angiotensinérgica já descrita nestes estudos citados. No entanto, curiosamente, o infarto do miocárdio nas fêmeas gonadectomizadas (grupo INF_{OVX}), induziu a redução do apetite por sódio comparado ao controle (Sham_{OVX}) e ao grupo INF_{INT} ($P < 0,05$).

Buscando justificativa para esta discrepância, avaliamos em seguida o volume urinário, que não apresentou alteração no grupo INF_{INT} em relação ao seu controle Sham_{INT}, como já observado na primeira etapa deste estudo. Por outro lado, as ratas

ovariectomizadas, tanto Sham quanto INF apresentaram redução significativa do volume urinário 4 semanas após as cirurgias, independentemente se esta foi de infarto ou falsa-cirurgia. Estes dados sugerem que a redução do volume urinário (possivelmente associada a retenção de sódio e água) foi um efeito induzido pela ovariectomia e não pelo infarto.

Em 1963, Antunes-Rodrigues & Covian demonstraram que a ingestão espontânea de sódio diminui durante o estro e aumenta durante o diestro. Sabendo-se da importante variação nos níveis circulantes de E2 durante essas duas diferentes fases do ciclo estral, muitos estudos posteriores ao de Antunes-Rodrigues & Covian (1963) tem buscado avaliar influência do estrógeno na regulação hidroeletrólítica. Neste contexto, Fregly (1973), demonstrou que o estrógeno exercia uma regulação sobre a ingestão de sal. Em ratas ovariectomizadas, o E2 atenua a ingestão de água, diante de diferentes desafios homeostáticos (VIJANDE et al. 1978; CARLBERG et al. 1984; KRAUSE et al. 2003). Portanto, o aumento da preferência por sódio e a baixo volume urinário nos animais ovariectomizados Sham no presente estudo já é bem conhecido na literatura.

No entanto quando se acrescenta a segunda variável, i.e, o infarto do miocárdio, os resultados precisam ser avaliados com mais cautela. No grupo de fêmeas intactas, o infarto aumentou a preferência por sódio, a exemplo do que já foi descrito anteriormente em ratos machos neste estudo assim como no estudo de Francis *et al* 2001. Curiosamente, o infarto induziu resposta antinatriorexigênica nas fêmeas ovariectomizadas infartadas. Quanto ao volume urinário, a ovariectomia reduziu este parâmetro tanto no grupo Sham como no Infartado sendo, portanto, este efeito independente do infarto neste estudo. Podemos concluir assim que, a diminuição do volume urinário (retenção de sódio e água) induzida pela ovariectomia deve ter contribuído para a redução do apetite por sódio e para o desenvolvimento de um *status* hemodinâmico menos favorável (aumento da pré-carga, congestão e edema pulmonar) nos animais infartados ovariectomizados comparados aos infartados inteiros.

Em relação à resposta do eixo HHT nesta etapa, considerando que na primeira etapa deste estudo, o hipotireoidismo foi observado apenas nos ratos machos infartados, consideramos importante avaliar se esta diferença foi influenciada pelos hormônios ovarianos. Os resultados obtidos com as fêmeas ovariectomizadas nesta etapa mostram que a ausência das gônadas, provavelmente, não induz a qualquer alteração na economia dos hormônios tireoidianos, já que não foi observada diferença significativa entre os níveis séricos de T3 entre os grupos Sham_{INT} e Sham_{OVX}. Contrário aos nossos dados,

Marassi *et al.*(2007) e Lisbôa *et al.*(2001) observaram redução dos níveis séricos de T3 após a ovariectomia, no entanto, nestes dois trabalhos as dosagens séricas de HT foram realizadas duas semanas após a ovariectomia, enquanto que no nosso estudo as dosagens foram realizadas decorridas seis semanas da ovariectomia. As diferenças encontradas entre o nosso trabalho e os dois referidos trabalhos podem, portanto, se dever aos diferentes tempos de avaliação. No presente estudo, apenas em condição adversa, i.e, um grande desafio homeostático (como após o IM), as fêmeas do grupo INF_{OVX} apresentaram hipotireoidismo (alteração similar à encontrada nos machos), com redução estatisticamente significativa dos níveis séricos de T3 em relação ao seu respectivo controle (Sham_{OVX}), assim como em relação a INF_{INT}. O grupo INF_{INT} não apresentou alteração dos níveis séricos de hormônio tireoidiano após o infarto. Portanto, a presença dos hormônios ovarianos parece prevenir, de alguma forma, o desenvolvimento do hipotireoidismo pós-IM, observado em nosso trabalho. Por sua vez, o hipotireoidismo parece contribuir para a disfunção cardíaca diretamente, independente das alterações hidroeletrólíticas, já que o hipotireoidismo aumenta a ingestão de sódio ao invés de diminuir, como observado nas fêmeas do grupo INF_{OVX}. Provavelmente, nas fêmeas, a manutenção do *status* eutireoideo após o infarto é necessária e dependente dos hormônios ovarianos, pois na ausência destes, ocorre queda do T3 e piora adicional da função cardíaca.

A condição de “hipotireoidismo” encontrada nos machos e fêmeas OVX, após o infarto do miocárdio, é característica da conhecida “síndrome da doença não-tireoidiana”. Esta síndrome é caracterizada pela ocorrência de níveis séricos normais de T4, associado a níveis séricos de T3 reduzidos, em pacientes com doenças graves agudas e crônicas (CHOPRA, 1997; MCIVER, 1997). Estudos apontam uma relação entre a redução do T3, com uma redução da enzima desidrodase tipo 1 no fígado. A D1 seria induzida no hepatócito, a nível transcripcional pelo T3 (TOYODA *et al.*, 1995) e, segundo Yu (2000) e Yu (2006), determinadas citocinas, como a IL-1 e IL-6 que estão elevadas em doenças graves, prejudicariam esta indução de D1 via T3, resultando na redução de T3 e intensificando conseqüentemente a queda na expressão de D1.

Dados já publicados, pelo nosso grupo apresentam redução da atividade da enzima desidrodase tipo 1 no fígado de ratos machos, 4 semanas após o infarto do miocárdio (OLIVARES *et al.* 2007). No presente trabalho realizamos o estudo da atividade da D1 no fígado de ratas fêmeas intactas e ovariectomizadas após IM. As ratas intactas não apresentaram alteração da atividade da enzima D1 4 semanas após o

infarto, em comparação ao seu controle (Sham_{INT}). No entanto, o grupo INF_{OVX} reduziu significativamente a atividade de D1 em relação a INF_{INT}, enquanto o grupo Sham_{OVX} apresentou uma tendência a redução deste parâmetro, mas que não foi estatisticamente menor que o grupo Sham_{INT}. Deste modo, a ausência das gônadas parece influenciar na redução da atividade da enzima D1, que é intensificada na condição de IC, observada após o IM. As alterações da atividade de D1 parecem ter relação com os níveis séricos de T3, uma vez que nas fêmeas intactas não há alteração da atividade de D1 após IM e os níveis de T3 permanecem inalterados. Já nas ratas ovariectomizadas, após o infarto do miocárdio junto à redução da atividade de D1, observamos também a queda dos níveis séricos de T3, podendo a diminuição da conversão periférica de T4 a T3 pela enzima desidase tipo 1 estar sendo relevante para os resultados encontrados com relação aos níveis séricos de T3.

Resumindo, nesta etapa, os dados mais relevantes encontrados por nós, foram os de que a ausência dos hormônios gonadais pode ter prejudicado o comportamento relacionado à regulação hidroeletrólítica e isto pode ter sido determinante para a disfunção cardíaca mais acentuada observada no grupo de ratas ovariectomizadas induzidas ao infarto do miocárdio em comparação às ratas intactas submetidas ao mesmo modelo experimental de indução a IC. Além disso, a economia dos hormônios tireoidianos, que tanto influencia o sistema cardiovascular, também parece estar influenciando diretamente a função cardíaca após IM, já que nas ratas ovariectomizadas em que a disfunção cardíaca pós-IM foi mais acentuada, foi observado hipotireoidismo e não houve concomitantemente, aumento do apetite por sódio. Portanto, a influência do *status* tireoidiano na disfunção cardíaca observada, não parece ser secundária a sua influência sobre a regulação hidroeletrólítica. Por fim, a redução da atividade de D1 nas ratas OVX induzidas ao infarto parece estar relacionado com o hipotireoidismo nelas encontrado.

6.3 3ª ETAPA: ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO ESTRÓGENO NAS ALTERAÇÕES ENCONTRADAS 4 SEMANAS APÓS INFARTO DO MIOCÁRDIO

Na etapa anterior deste estudo observamos que a ausência das gônadas pareceu influenciar na função cardíaca, desenvolvimento da IC e nas alterações da regulação hidroeletrólítica e da economia dos hormônios tireoidianos após o infarto do miocárdio.

Nesta etapa, portanto, buscamos avaliar se as diferenças encontradas entre fêmeas intactas e ovariectomizadas pós IM se devem à influência do estrógeno. Para isso, realizamos a ovariectomia de ratas fêmeas e tratamos com veículo ou cipionato de estradiol (dose de reposição) e, duas semanas depois realizamos a cirurgia de indução ao infarto do miocárdio ou falsa-cirurgia. Decorridas 4 semanas da indução ao infarto do miocárdio foram realizadas as avaliações morfofuncionais, hidroeletrólíticas e endócrinas (hormônios tireoidianos).

Na avaliação morfofuncional, o estrógeno pareceu prevenir o remodelamento cardíaco e conseqüentemente o processo congestivo, uma vez que as fêmeas do grupo INF_{OVX+E2} não apresentaram alteração dos parâmetros ecocardiográficos de DDFVE e relação AE/Ao em relação a Sham_{OVX+E2}. Em conjunto houve melhora no relaxamento ventricular, com normalização da relação E/A e atenuação da disfunção sistólica, já que o grupo INF_{OVX+E2} apresentou a FEnc% significativamente maior em relação ao grupo INF_{OVX+Vec}. Corroborando nossos dados, Zheng *et al.*(2010), observaram que a reposição com estrógeno em ratas ovariectomizadas iniciada antes da indução ao infarto atenuou a disfunção sistólica observada quatro semanas pós-IM. Já Hugel e colaboradores (1999), não observaram diferença na função e remodelamento cardíaco após indução ao infarto agudo do miocárdio entre ratas intactas, ovariectomizadas tratadas com veículo e ovariectomizadas repostas com E2, não sendo evidenciada, portanto, neste estudo, influência do estrógeno na condição de infarto. Não podemos afirmar as razões para as diferenças encontradas, no estudo de Hugel, no entanto, o período em que foram feitas as avaliações morfofuncionais podem ter influenciado nos resultados, uma vez que realizamos as avaliações quatro semanas pós-IM, enquanto que no referido trabalho as avaliações morfofuncionais foram realizadas oito semanas pós-IM.

Para “identificar” se a melhora na função cardíaca e remodelamento que obtivemos nas fêmeas repostas se deveram, pelo menos em parte, à influência do estrógeno na regulação hidroeletrólítica, foi realizada a avaliação da ingestão de fluidos e volume urinário. A reposição de estrógeno pareceu normalizar os parâmetros hidroeletrólíticos, não havendo alteração do apetite por sódio e volume urinário no grupo INF_{OVX+E2} em relação ao seu controle. Enquanto que o grupo INF_{OVX+Veic} apresentou redução do apetite por sódio tanto comparado a Sham_{OVX+Veic} quanto a INF_{OVX+E2} e redução do volume urinário em relação às fêmeas repostas com E2, a reposição com E2 pareceu prevenir as alterações comportamentais da regulação

hidroeletrolítica que ocorrem pós-IM, tanto relacionado ao apetite por sódio, quanto ao volume urinário. Este efeito pode ter sido observado, devido à ação modulatória do E2 sobre o SRAA evidenciado em estudos que mostram aumento de RNAm para receptores AT1, aumento da densidade de ligação destes receptores a angio II em ratas ovariectomizadas e a prevenção destes efeitos com a reposição de E2 (NICKENIG *et al.* 1998; TANAKA *et al.* 1997). Estes dados se fortalecem em nosso estudo pois, observamos aumento (normalização) do volume urinário, e conseqüentemente no apetite por sódio, nas fêmeas tratadas com E2 tanto nas Sham como nas infartadas. Além disso, o E2 também parece ser relevante na modulação da vasopressina e ocitocina em condição de hipotensão. Mecawi *et al.* (2011) por exemplo, demonstraram aumento adicional da ativação de neurônios hipotalâmicos que sintetizam vasopressina e ocitona em resposta ao E2, após indução ao choque hipovolêmico em ratos. Sendo assim, os efeitos benéficos da reposição de estrógeno no remodelamento e função cardíaca pós-IM, parecem ter relação com os seus efeitos sobre a regulação hidroeletrolítica. Salvaguardando as diferenças notórias entre os dois modelos (hipovolemia vs. infarto), sabe-se que em ambas as condições os sistemas neuro-humorais de regulação hidroeletrolítica, como os sistemas vasopressinérgico e ocitocinérgico, são ativados de forma similar.

As dosagens séricas dos hormônios tireoidianos foram feitas para avaliar se o E2 teria alguma influência sobre a economia desses hormônios após o IM. Como observado, as ratas repostas com E2 e induzidas ao infarto (INF_{OVX+E2}) não apresentaram alteração significativa dos níveis séricos de T3 em relação às ratas repostas e falso-operadas para o infarto (Sham_{OVX+E2}). No entanto, apesar do grupo INF_{OVX+E2} não apresentar diferença estatística em relação ao seu controle, a reposição com estrógeno não foi capaz de normalizar os níveis séricos de T3 nas ratas infartadas e repostas com E2, já que seus valores são similares aos animais infartados não repostos (INF_{OVX+Veic}). Portanto, a melhora da função cardíaca não parece ter relação com os efeitos estrogênicos sobre a economia dos hormônios tireoidianos. Estes dados, no entanto, devem ser interpretados com cautela, uma vez que os níveis séricos de hormônios tireoidianos muitas vezes não refletem a condição tecidual da sinalização do T3 (BIANCO & KIM, 2006).

Ao realizarmos a avaliação da atividade de D1 no fígado, observamos que os grupos repostos com E2 (Sham_{OVX+E2} e INF_{OVX+E2}) apresentaram aumento da atividade de D1. Os dados na literatura em relação à influência do estrógeno sobre a atividade

dessa enzima são ainda controversos. Há alguns relatos de que a ovariectomia e reposição com estrógeno não alteram a atividade de D1 no fígado (HARRIS *et al.* 1979, MIYASHITA *et al.* 1995). Marassi e colaboradores (2007), não observaram alteração significativa da atividade de D1 no fígado em ratas OVX, no entanto a reposição com E2 aumentou a atividade da enzima D1, em relação ao grupo de ratas intactas. Já, Lisbôa e colaboradores (1997 e 2001) observaram, assim como em nosso estudo, que a ovariectomia leva a redução da atividade de D1 no fígado e a reposição com estrógeno induz ao aumento dessa atividade. Os nossos resultados sugerem, ainda, que o estrógeno exerça alguma modulação positiva sobre a atividade dessa enzima, independente da condição de infarto, uma vez que tanto as fêmeas intactas quanto as fêmeas repostas com E2 não parecem alterar a atividade de D1 pós-IM, quando comparado aos seus respectivos controles, enquanto que na ausência das gônadas há redução da atividade de D1 que é acentuada após o infarto. Além disso, o aumento da atividade da desidrodase tipo 1, influenciada pela reposição com E2, não parece se refletir nos níveis séricos de T3, uma vez que não foi observado aumento adicional destes níveis nas ratas repostas com E2. Vale lembrar que a D1 é capaz de remover tanto o iodo do anel externo como do anel interno da tiroxina com a mesma potência (Bianko & Kim 2001). Portanto, a elevação da atividade da D1 poderá gerar tanto T3 como T3 reverso de forma equimolar e não necessariamente elevar os níveis de T3 séricos.

Resumindo, nesta última etapa do estudo, observamos que a reposição com E2, parece atenuar as alterações encontradas nos parâmetros morfofuncionais após o infarto do miocárdio e confirmamos que o estrógeno tem importante influência sobre a regulação hidroeletrólítica pós-IM, uma vez que as ratas ovariectomizadas e repostas com E2 parecem manter os parâmetros de ingestão de fluidos e volume urinário normais após a indução ao infarto do miocárdio. Em conjunto, esses efeitos podem beneficiar o coração, no sentido de propiciar um remodelamento e função cardíaca dentro de limites fisiológicos (ou alostáticos) mais favoráveis para manter um débito cardíaco aceitável na condição de infarto do miocárdio. Nesta fase, a interpretação dos dados relativos à economia dos hormônios tireoidianos requer cautela e uma investigação mais aprofundada pois, embora a queda do T3 tenha sido mais importante nas fêmeas infartadas ovariectomizadas não-repostas (~35%) comparadas às ovariectomizadas-repostas (~14%) em relação aos seus respectivos controles Sham, não houve diferenças significativas nos níveis de T3 entre esses dois grupos, i.e., entre as ovariectomizadas infartadas repostas ou não ($P > 0,05$). A investigação do conteúdo de T3 tecidual

(coração e outros tecidos), bem como das outras desidases (D2 e D3) em vários tecidos, pode auxiliar na melhor interpretação do papel do E2 no metabolismo extratireoidiano das iodotironinas.

7. CONCLUSÕES

- O presente trabalho mostrou haver diferença no desenvolvimento fisiopatológico do infarto do miocárdio entre ratos machos e fêmeas. Assim, tanto o remodelamento como a disfunção cardíaca foi mais branda e de desenvolvimento mais lentonas fêmeas.
- O balanço simpato-vagal não parece ser o principal determinante para as diferenças morfofuncionais cardíacas encontradas entre machos e fêmeas pós-IM, pois as alterações autonômicas pós-IM não se relacionam com as alterações cardíacas tanto temporalmente como com a gravidade das mesmas em ambos os sexos.
- Fêmeas infartadas parecem possuir uma regulação hidroeletrólítica mais compatível com melhor performance hemodinâmica pois nelas, o desenvolvimento das alterações morfofuncionais pós-infarto mais tardiamente e atenuada em relação aos machos parece guardar relações estreitas com uma dinâmica hidroeletrólítica mais favorável.
- A ausência das gônadas femininas pareceu tornar as alterações funcionais do coração após o IAM similares às dos machos e, aliado a isto, o desbalanço na regulação hidroeletrólítica das fêmeas gonadectomizadas reforçam o papel-chave dos mecanismos de controle de sódio e líquido corporais como uma das causas principais do dimorfismo sexual pós-infarto.
- A reposição com estrógeno em fêmeas ovariectomizadas pareceu minimizar a ocorrência de remodelamento e disfunção cardíaca após IAM. Sugerindo que o E2 tenha papel importante na atenuação do desenvolvimento de alterações cardíacas pós-IM. Além disso, a regulação hidroeletrólítica, pelo menos no

protocolo de avaliação utilizado neste estudo, também pareceu ser normalizado com a reposição de E2. A melhora da regulação hidroeletrólítica influenciada pelo E2 poderia estar, portanto, favorecendo a função cardíaca e permitindo a atenuação das alterações de remodelamento e disfunção do coração pós-IM como observado no grupo repostado com E2.

- A avaliação da economia dos hormônios tireoidianos mostrou que diferente dos machos, após o IAM, as fêmeas não apresentam hipotireoidismo (pelo menos no tempo de avaliação: 4 semanas) e, quando na ausência das gônadas femininas, o hipotireoidismo pós-IM acontece.
- Embora a reposição com E2 tenha amenizado a queda do T3 nas fêmeas ovariectomizadas infartadas, é difícil atribuir este achado a uma melhor função cardíaca, pois os níveis dos hormônios tireoidianos foram similares entre os grupos infartados, independentemente da reposição hormonal.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, S.; WILLIAMS, V.; VESSEY, M. P; Cardiovascular disease and hormone replacement treatment: a pilot case-control study. Br Med J (clin Res. Ed.).v.282, p. 1277-1278, 1981.

AGABITI, R. E.; Left ventricular hypertrophy and heart failure in women. J Hypertens Suppl.v.20, S34-8,2002.

ALEXANDERSEN, P.; TANKO, L.B.; BAGGER, Y.Z.; QIN, G.; CHRISTIANSEN, C. The long – term impact of 2-3 years of hormone replacement therapy on cardiovascular mortality and atherosclerosis in healthy women. Climacteric. v.9, p. 108 – 118, 2006.

ANTUNES-RODRIGUES, J.; COVIAN, M. R. Hypothalamic control of sodium chloride and water intake. *Acta Physiol Lat Am*, 13:94-100, 1963.

ANTUNES-RODRIGUES, J.; CASTRO, M.; ELIAS, L. L. K.; VALENÇA, M. M.; McCANN, S. M.. Neuroendocrine Control of Body Fluid Metabolism. *Physiol Rev* 84: 169–208, 2004.

ANVERSA, P.; BEGHI, C.; McDONALD, S.L.; LEVICKY, V.; KIKKAWA, Y.; OLIVETTI, G. Morphometry of right ventricular hypertrophy induced by myocardial infarction in the rat. *American Journal of Pathology* 116(3): 504-513, 1984.

ANVERSA, P.; BEGHI, C.; KIKKAWA, Y.; OLIVETTI, G. Myocardial infarction in rats. Infarct size, myocyte hypertrophy and capillary growth. *Circ Res* 58(1): 26-37, 1986.

AUBERT, A. E., S. Vandeput, et al. Complexity of cardiovascular regulation in small animals. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci*, v.367, n.1892, Apr 13, p.1239-50. 2009.

BABIKER, F. A.; DE WINDT, L. J.; VAN EICKELS, M.; THIJSEN, V.; BRONSAER, R. J.; GROHE, C.; VAN BILSEN, M.; DOEVENDANS, P.A. 17(Beta) estradiol antagonizes cardiomyocyte hypertrophy by autocrine/paracrine stimulation of a guanylylcyclase A receptor-cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase pathway. *Circulation*.v.109, p. 269-276, 2004.

BADAUÊ-PASSOS, D. Jr.; VENTURA, R. R.; SILVA, L. F.; OLIVARES, E. L.; RAMALHO, M. J.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; REIS, L. C. Effect of losartan on sodium appetite of hypothyroid rats subjected to water and sodium depletion and water, sodium and food deprivation. *Exp Physiol*. Sep;86(5):621-8, 2001.

BARRETT-CONNOR, E. Sex differences in coronary heart disease: why are women so superior? *Circulation*.v.95, p.252 – 264, 1997.

BEER J.C, ZELLER M, DENTAN G, LAURENT Y, L'HUILLIER I, RAVISY J, SICARD P, VINCENT-MARTIN M, MAKKI H, RIOUFOL G, FINET G, COTTIN Y. Predictors and prognosis for complex coronary lesions in patients with acute myocardial infarction: data from RICO survey. *Am Heart J* 154:330-5, 2007.

BELLÓ, A. A. & COVIAN, M. R. (1988). Effect of the excess of thyroid hormone administration on water and sodium chloride intake in the rat. *Physiology and Behavior* 43, 155–157.

BESTER, A.J.; BAJUSZ, E.; LOCHNER, A. Effect of ischemia and infarction on the metabolism and function of the isolated, perfused rat heart. *Cardiovascular Research* 6: 284-294, 1972.

BIANCO, A.C.; SALVATORE, D.; GEREBEN, B.; BERRY, M.J.; LARSEN, P.R. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronineselenodeiodinases. *Endocrine Reviews* 23:38-89, 2002.

BIANCO AC & KIM BW. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest*, 116: 2571-9, 2006.

BIGGER JR. J. T., FLEISS J. L., ROLNITZKY L. M., STEINMAN R. C., SCHNEIDER W. J. Time course of recovery of heart period variability after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1991;18:1643 – 9.

BLOM, M. J.; WASSINK, M. G.; KLOOSTERBOER, H. J.; EDERVEEN, A. G. H.; LAMBERT, J. G. D.; GOOS, H. J. T. H. Metabolism of estradiol, ethynilestradiol, and moxestrol in rat uterus, vagina, and aorta: influence of sex steroid treatment. *Drug Metabolism and Disposition*.v. 29,n.1, p.76-81, 2001

BURRELL L. M.; PHILLIPS P. A.; RISVANIS J.; CHAN R. K.; ALDRED K. L.; JOHNSTON C. I. Long-term effects of nonpeptide vasopressin V2 antagonist OPC-31260 in heart failure in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 275: H176–H182, 1998.

BUTTRICK, P. & SCHEUER, J. Sex-associated differences in left ventricular function in aortic stenosis of the elderly. *Circulation* v.86, p.1336-1338,1992.

CAMM A. J., PRATT C. M., SCHWARTZ P. J. Mortality in patients after a recent myocardial infarction: a randomized, placebo-controlled trial of azimilide using heart rate variability for risk stratification. *Circulation*;109:990 – 6, 2004.

CAMPER-KIRBY, D.; WELCH, S.; WALKER, A.; SHIRAISHI, I.; SETCHELL, K. D. R.; SCHAEFER, E.; KAJSTURA, J.; ANVERSA, P.; SUSSMAN, M. A.; Myocardial Akt activation and gender: increased nuclear activity in females versus males. *Circ Res.* v.88, p.1020–1027, 2001.

CARLBERG, K. A.; FREGLY, M. J.; FAHEY, M. Effects of chronic estrogen treatment on water exchange in rats. *Am J Physiol.*; 247: 101-110, 1984.

CARPEGGIANI C., EMDIN M., BONAGUIDI F. Personality traits and heart rate variability predict long-term cardiac mortality after myocardial infarction. *Eur Heart J* 26:1612 – 7, 2005.

CAVASIN, M. A.; SANKEY, S. S.; YU, A. L.; MENON, S.; YANG, X. P. Estrogen and testosterone have opposing effects on chronic cardiac remodeling and function in mice with myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284, H1560–H1569, 2003.

CAVASIN, M. A.; TAO, Z.; MENON, S.; YANG, X. P. Gender differences in cardiac function during early remodeling after acute myocardial infarction in mice. *Life Sci.* 75:2181–92, 2004.

CHEN, H.J.; WALFISH, P.G. Effects of estradiol benzoate on thyroid-pituitary function in female rats. *The Endocrine Society* 103(4): 1023-1030, 1978(a).

CHEN, H.J.; WALFISH, P.G. Effects of age and ovarian function on the pituitary-thyroid system in female rats. *J. Endocrinology* 78: 225-232, 1978(b).

CHEN, H.J. Age and sex difference in serum and pituitary thyrotropin concentrations in the rat: influence by pituitary adenoma. *Experimental Gerontology* 19: 1-6, 1984.

CHOPRA, I. J. Euthyroid sick syndrome: is it a misnomer. *J Clin Endocrinol Metab* 82:329–334, 1997.

CHRISTIANSON, D.; ROTI, E.; VAGENAKIS, A.G.; BRAVERMAN, L.E. The sex-related difference in serum thyrotropin concentration is androgen mediated. *Endocrinology* 108:529-535, 1981.

CLELAND, J. G.; SWEDBERG, K.; FOLLATH, F.; KOMAJDA, M.; COHEN-SOLAL, A.; AGUILAR, J. C.; DIETZ, R.; GAVAZZI, A.; HOBBS, R.; KOREWICKI, J.; MADEIRA, H. C.; MOISEYEV, V. S.; PREDA, I.; VANGILST, W. H.; WIDIMSKY, J.; FREEMANTLE, N.; EASTAUGH, J.; MASON, J.; STUDY GROUP ON DIAGNOSIS OF THE WORKING GROUP ON HEART FAILURE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY. The EuroHeart Failure survey programme- a survey on the quality of care among patients with heart failure in Europe. Part 1: patient characteristics and diagnosis. *Eur Heart J*, Mar; 24(5):442-63.

COHN, J. N.; LEVINE, T. B.; OLIVARI, M. T.; GARBERG, V.; LURA, D. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* 311: 819-823, 1984.

CORRÊA DA COSTA, V.M.; MOREIRA, D.G.; ROSENTHAL, D. Thyroid function and aging: gender-related differences. *Journal of Endocrinology* 171:193-198, 2001.

COURNEYA, C.A. & KORNER PI. Neurohumoral mechanisms and the role of the arterial baroreceptors in the renovascular response to haemorrhage in rabbits. *J Physiol (Lond)* 437:393:407, 1991.

CORRÊA DA COSTA, V.M.; MOREIRA, D.G.; ROSENTHAL, D. Thyroid function and aging: gender-related differences. *Journal of Endocrinology* 171:193-198, 2001.

CRANTZ, F.R.; SILVA, J.E.; LARSEN, P.R. An analysis of the sources and quantity of 3,5, 3'-triiodothyronine specifically bound to nuclear receptors in rat cerebral cortex and cerebellum. *Endocrinology* 110:367-375, 1982.

CURTIS KS. Estrogen and the central control of body fluid balance. *Physiol Behav*;97:180-92, 2009.

DANZI, S.; KLEIN, I. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *Med Clin Am* 96: 257-268, 2012.

DEAN, S. A.; TAN, J.; WHITE, R.; O'BRIEN, E. R.; LEENEN, F. H. H. 17 β -estradiol downregulates tissue angiotensin-converting enzyme and ANG II type I receptor in female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R759-R766, 2004

DEAN, S. A.; TAN, J.; WHITE, R.; O'BRIEN, E. R.; LEENEN, F. H. H. Regulation of components of the brain and cardiac rennin-angiotensin systems by 17 β -estradiol after myocardial infarction in female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291:R162, 2006.

DILLMAN W. H. Biochemical basis of thyroid hormone action in the heart. *Am J Med* 88:626-639, 1990.

DONDA, A.; REYMOND, F.; REY, F.; LEMARCHAND-BÉRAUD, T. Sex steroids modulate the pituitary parameters involved in the regulation of TSH secretion in the rat. *ActaEndocrinologica* 122: 577-584, 1990.

DO-VALE, C. F.; SAADWA; RENZI, A.; CAMARGO, G. M.; QUEIROZ, R. C.; SILVEIRA, J. E.; MENANI, J. V.; CAMARGO, L. A. Progesterone administration to ovariectomized rats reduces water and salt intake induced by central administration of angiotensin II. *Braz J Med Biol Res* 28, 999–1002, 1995.

EAKER, E. D.; CHESEBRO, J. H.; SACKS, F. M.; WENGER, N. K.; WHISNANT, J. P.; WINSTON, M. Cardiovascular disease in women. *Circulation* 88: 1999–2009, 1993.

ELLIS, L.B.; ALLISON, R.B.; RODRIGUEZ, F.L.; ROBBINS, S.L. Relations of the degree of coronary artery disease and of myocardial infarctions to cardiac hypertrophy and chronic congestive heart failure. *New England Journal of Medicine* 266(11): 525-9, 1962.

FACTOR SM. Pathophysiology of myocardial ischemia. In: HURST JW; SCHLANT, RC; RACKLEY CE; SONNENBLICK EH; WENGER NK, *The heart. Arteries and veins*. 7 ed. New York, McGraw-Hill, Cap. 49, p. 940-59, 1990.

FALKENSTEIN, E.; TILLMANN, H. C.; CHRIST, M.; FEURING, M.; WEHLING, M. Multiple actions of steroid hormones—a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev*; 52:513–56, 2000.

FANNON, S. A.; VIDAVER, R. M.; MARTS, S. A. An abridged history of sex steroid hormone receptor action. *J Appl Physiol*; 91:1854–9, 2001.

FARBOTA, L.; HOFMANN, C.; OSLAPAS, R.; PALOYAN, E. Sex hormone modulation of serum TSH levels. *Surgery* 102(6): 1081-1087, 1987.

FELDER, R. B.; FRANCIS, J.; ZHANG, Z.; WEI, S.; WEISS, R. M.; JOHNSON, A. K. Heart failure and the brain: new perspectives. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R259–R276, 2003; 10.1152/ajpregu.00317, 2002.

FELLENIUS, E.; HANSEN, C.A.; MJOS, O.; NEELY, J.R. Chronic infarction decreases maximum cardiac work and sensitivity of heart to extracellular calcium. *Am J Physiol.* 249 (1 Pt 2):H80-7, 1985.

FERGUSON, D. W.; BERG, W. J.; SANDERS, J. S. Clinical and hemodynamic correlates of sympathetic nerve activity in normal humans and patients with heart failure: evidence from direct microneurographic recordings. *J Am Coll Cardiol* 16: 1125–1134, 1990.

FISHBEIN, M.C.; MACLEAN, D; MAROKO, P.R. Experimental Myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am. J. Pathol.*, 90: 57-70, 1978a.

FISHBEIN, M.C.; MACLEAN, D; MAROKO, P.R. The histologic evolution of the myocardial infarction. *Chest* 73: 843-9, 1978b.

FLETCHER, P.J.; PFEFER, J.M.; PFEFFER, M.A., BRAUNWALD, E. Left ventricular diastolic pressure-volume relations in rats with healed myocardial infarction. Effects on systolic function. *Circulation Research* 49(3): 618-26, 1981.

FRANCIS, G. S. The relationship of the sympathetic nervous system and the renin-angiotensin system in congestive heart failure. *Am Heart J* 118: 642–648, 1989.

FRANCIS, G. S. Neurohumoral activation and progression of heart failure: hypothetical and clinical considerations. *J Cardiovasc Pharmacol* 32: S16–S21, 1998.

FRANCIS, J.; WEISS, R.M.; WEI, S.G.; JOHNSON, A.K.; FELDER, R.B. Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 281: R1734-1745, 2001.

FRANCIS, J.; WEISS, R.M.; WEI, S.G.; JOHNSON, A.K.; BELTZ, T. G.; ZIMMERMAN, K.; FELDER, R.B. Central mineralocorticoid receptor blockade improves volume regulation and reduces sympathetic drive in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281: H2241-H2251, 2001.

FRANKLYN JA; GAMMAGE MD; RAYMSDEN DB; SHEPPARD MC. Thyroid Status in Patients After Acute Myocardial Infarction. *ClinSci (Colch)* 67:585-590, 1984.

FREGLY, M. J. & ROWLAND, N. E. Role of renin–angiotensin–aldosterone in NaCl appetite of rats. *American Journal of Physiology* 248, R1–11, 1985.

FUKUDA, H.; GREER, M.; ROBERTS, L.; ALLEN, C.E.; CRITCHLOW, V.; WILSON, M. Nyctohemeral and sex-related variations in plasma thyrotropin, thyroxine, and triiodotironine. *Endocrinology* 97: 1424-1430, 1975.

GARDIN, J.M.; WAGENKNECHT, L.E.; ANTON, C. H.; FLACK, J.; GIDDING, S.; KUROSAKI, T.; WONG, N.D.; MANOLIO, T.A. Relationship of cardiovascular risk factors to echocardiographic left ventricular mass in healthy young black and white adult men and women. The cardia Study. *Coronary Artery Risk Development in Young Adults. Circulation.* v.92, p.380–387, 1995.

GEREBEN, B.; SALVATORE, D.; HARNEY, J.W.; TU, H.M.; LARSEN, P.R. The human, but not rat, *dio2* gene is stimulated by thyroid transcription factor-1 (TTF-1). *Molecular Endocrinology* 15:112-124, 2001.

GEREBEN B, ZAVACKI AM, RIBICH S, KIM BW, HUANG SA, SIMONIDES WS, ZEÖLD A, BIANCO AC. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr Rev*, 29(7):898-938, 2008.

GREELEY, G.H.; LIPTON, M.A.; KIZER, J.S. Serum thyroxine, triiodothyronine, and TSH levels and TSH release after TRH in aging male and female rats. *Endocrine Research Communications* 9:169-177, 1983.

GRADY, D.; RUBIN, S. M.; PETITTI, D. B.; FOX, C. S.; BLACK, D.; ETTINGER, B.; ERNSTER, V. L.; CUMMINGS, S. R. Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Ann Intern Med.* v. 117, p. 1016-1037, 1992.

GRODSTEIN, F.; STAMPFER, M. J.; COLDITZ, G. A.; WILLETT, W. C.; MANSON, J. E.; JOFFE, M.; ROSNER, B.; FUCHS, C.; HANKINSON, S. E.; HUNTER, D. J.; HENNEKENS, C. H.; SPEIZER, F.E. Postmenopausal hormone therapy and mortality. *N Engl J Med.* v.336, p. 1769 – 1775, 1997.

GRODSTEIN, F.; MANSON, J. E.; COLDITZ, G.A.; WILLETT, W. C.; SPEIZER, F.E.; STAMPFER, M. J. A prospective, observational study of postmenopausal hormone therapy and primary prevention of cardiovascular disease. *Ann Intern Med.* v. 133, p. 933 – 941, 2000.

GROHE, C.; KAHLERT, S.; LOBBERT, K.; VAN EICKELS, M.; NEYSES, L.; STIMPEL, M.; VETTER, H. Angiotensin converting enzyme inhibition modulates cardiac fibroblast growth. *J. Hyperten.* v.16, p. 377 - 384, 1998.

GROSSMAN, W; JONES, D.; MACLAURIN, L.P. Wall stress and patters of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin invest* 56: 56-64, 1975.

GRUBER, D. M. & HUBER, J. C. Tissue specificity: the clinical importance of steroid metabolites in hormone replacement therapy. *Maturitas.* v. 37, p.151-157, 2001.

GRUBER, C. J.; TSCHUGGUEL, W.; SCHNEEBERGER, C.; HUBER, J. C. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med.* 31;346(5):340-52, 2002.

HAGSTROM, R.M.; BILLINGS, F.T.; CHAPNICK, E.M.; BALL, C.O.T.; MENEELY, G.R. Sudden death in survivors of myocardial infarction. *Circulation* 30(Suppl. III): III-91-2, 1964.

HALE, S. L.; BIRNBAUM, Y.; KLONER, R. A.; β – estradiol, but not α - estradiol, reduces myocardial necrosis in rabbits after ischemia and reperfusion. *Am. Heart. J.* v.132, p. 258 – 262, 1996.

HAMILTON M. A.; STEVENSON L. W.; LUU M.; WALDEN J. A. Altered thyroid hormone metabolism in advanced heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 16:91-95, 1990.

HAMILTON, M. A. Prevalence and clinical implications of abnormal thyroid hormone metabolism in advanced heart failure. *Ann Thorac Surg.* Jul;56(1 Suppl):S48-52; 1993.

HARRIS, A. R. C.; VAGENAKIS, A. G.; BRAVERMAN, L. E. Sex-related differences in outer ring monodeiodination of thyroxine and 3,3',5'-triiodothyronine by rat liver homogenates. *Endocrinology* 104: 645-652, 1979.

HEARSE, D.J.; RICHARD, V.; YELLON, D.M.; KINGMAN, J.G. Jr. Evolving myocardial infarction in the rat in vivo: inappropriate model for the investigation of drug-induced infarct size limitation during sustained regional ischemia. *J CardiovascPharmacol* 11: 701-710, 1988.

HEIMBURGER, R.F. Injection into pericardial sac and ligation of coronary artery of the rat. *Arch Surg* 52: 677-89, 1946.

HE H.; GIORDANO F. J.; HILAL-DANDAN R.; CHOI D. J.; ROCKMAN H. A.; McDONOUGH P. M.; LUHM W. F.; MEYER M.; SAYEN M. R.; SWANSON E.; DILLMANN, W.H. Overexpression of the rat sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase gene in the heart of transgenic mice accelerates calcium transients and cardiac relaxation. *J Clin Invest* 100: 380-389, 1997.

HOIT, B.D.; KHAN ZU, PAWLOSKI-DAHM, C.M.; WALSH, R.A. In vivo determination of left ventricular wall stress-shortening relationship in normal mice. *Am J Physiol* 272: H-1047-1052, 1997.

HOLT E; SJAASTAD I; LUNDLE PK; CHRISTENSEN G; SJERSTED OM. Thyroid hormone control of contraction and the Ca²⁺ ATPase/phospholamban complex in adult rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 31:645-656, 1999.

HON, E. H.; LEE, S. T. Electronic evaluations of the fetal heart rate pattern preceding fetal death, further observations. *Am J Obstet Gynecol*;87:814–26, 1965.

HÜGEL, S.; REINCKE, M.; STROMER, H.; WINNING, J.; HORN, M.; DIENESCH, C.; MORA, P.; SCHMIDT, H. H.; ALLOLIO, B.; NEUBAUER, S. Evidence against a role of physiological concentrations of estrogen in post-myocardial infarction remodeling. *J Am Coll Cardiol*;34:1427–34, 1999.

JANSE, M.J.; WIT, A.L. Electrophysiological mechanisms of ventricular arrhythmias resulting from myocardial ischemia and infarction. *Physiological Reviews* 69: 1049-169, 1989.

JOHNS, T.N.P. & OLSON, J.B. Experimental myocardial infarction: a method of coronary occlusion in small animals. *Ann. Surg* 140: 675 – 82, 1954.

JOHNSON, A.K.; THUNHORST, R.L. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanism of central integration. *Front Neuroendocrinol* 18: 292-353, 1997.

JULIAN, D.G. Prognosis, risk stratification and rehabilitation after acute myocardial infarction. In: JULIAN, D.G.; CAMM, A.J.; FOX, K.M.; HALL, R.J.C.; POOLE-WILSON, P.A., ed. Diseases of the heart. London, BaillièreTidall Cap. 51, p. 1192-1202, 1989.

KAASIK A; PAJU K; VETTER R; SEPPET EK. Thyroid hormone increases the contractility but suppresses the effects of beta-adrenergic agonist by decreasing phospholamban expression in rat atria. *Cardiovasc Res* 35:106-112, 1997.

KANNEL, W.B.; SORLIE, P.; McNAMARA, P.M. Prognosis after initial myocardial infarction: the Framingham study. *American journal of cardiology* 44: 53-9, 1979.

KAUFMAN, N; GAVA TL; HILL, RW Experimental myocardial infarction in the rat. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 67: 482 – 488, 1959.

Kelly, M.J. *et al.* Differential sensitivity of preoptic-septal neurons to microelectrophoresed estrogen during the estrous cycle. *Brain Res.* 114, 152–157, 1976.

Kelly, M.J. and Lagrange, A.H. Nontranscriptional effects of estradiol in neuropeptide neurons. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes* 5, 66–72, 1998.

Kelly, M.J. and Wagner, E.J. Estrogen modulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* 10, 369–374, 1999.

Kelly, M.J. *et al.* Hyperpolarization of hypothalamic parvocellular neurons by 17 β -estradiol and their identification through intracellular staining with procion yellow. *Exp. Brain Res.* 40, 440–444, 1980.

KEMPF, F.C; JOSEPHSON, M.E. Cardiac arrest recorded on ambulatory electrograms. *American Journal of Cardiology* 53: 1577-1582, 1984.

KISHI, T.; HIROOKA, Y. Central mechanisms of abnormal sympathoexcitation in chronic heart failure. *Cardiol Res Pract* 2012: 847172, 2012.

KISLEY, L. R.; SAKAI, R. R.; FLUHARTY, S. J.; Estrogen decreases hypothalamic angiotensin II AT₁ receptor binding and mRNA in the female rat. *Brain Res* 844: 34-42, 1999.

KISS E; JAKAB G; KRANIAS EG; EDES I. Thyroid hormone induced alterations in phospholamban protein expression. Regulatory effects on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport and myocardium relaxation. *Circ Res* 75:245-251, 1994.

KLAASSEN, C. D. Casarett and Doull's Toxicology: The basic Science of Poisons. Estados Unidos da América: McGraw-Hill Companies, 2001.

KLEIN I; OJAMAA K. Thyroid hormone and blood pressure regulation. In: Hypertension: Pathophysiology , Diagnosis, and Management, 2nd ed., editora: JH Laragh e BM Brenner. New York: Raven, p. 2247-2262, 1995.

KLEIN I. & OJAMAA K. Thyroid Hormone – Targeting The Heart. *Endocrinology* 142: 11-12, 2001.

KNEPPER M. A. Long-term regulation of urinary concentrating capacity. *Am J Physiol Renal Physiol* 275: F332–F333, 1998.

KÖHRLE, J. Thyroid hormone deiodination in target tissues – a regulatory role for the trace element selenium?. *Experimental and Clinical Endocrinology* 102: 63-89, 1994.

KOTLER, M.N.; TABATZNIK, B.; MOWER, M.N.; TOMINAGA, S. Prognostic significance of ventricular ectopic beats with respect to sudden death in the late postinfarction period. *Circulation* 47: 959-966, 1973.

KRAUSE, E. G.; CURTIS, K. S.; DAVIS, L. M.; STOWE, JR.; CONTRERAS, R. J. Estrogen influences stimulated water intake by ovariectomized female rats. *Physiol Behav*, 79: 267-274, 2003.

LEENEN F. H. Cardiovascular consequences of sympathetic hyperactivity. *Can J Cardiol* 15, Suppl A: 2A–7A, 1999.

LERNER, D. J.; KANNEL, W. B. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population. *Am Heart J* 111: 383–390, 1986.

LEONARD, J.L.; KÖHRLE, J. Intracellular pathways of iodothyronine metabolism. In: Braverman, L.E.; Utiger, R.D.; Werner and Ingbar's *The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text*, 7a ed, Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 125-161, 1996.

LI, H. Y.; BIAN, J. S.; KAWAN, Y. W.; WONG, T. M. Enhanced responses to 17beta-estradiol in rat hearts treated with isoproterenol: involvement of a cyclic AMP-dependent pathway. *J PharmacolExpTher.* v.293, p.592-598, 2000.

LIEHR, J. G. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocrine .Reviews.* v. 21, p. 40-54, 2000.

LIMA, H.R.C.; CAVALCANTE-LIMA, H.R., CEDRAZ-MERCEZ, P.L.; COSTA-E-SOUSA, R.H.; OLIVARES, E.L.; BADAUÊ-PASSOS-Jr, D.; MEDEIROS, M.A.; CÔRTEZ, W.S.; REIS, L.C. Brain serotonin depletion enhances the sodium appetite induced by sodium depletion or beta-adrenergic stimulation. *An Acad Bras Cienc* 76(1):85-92, 2004.

LIMA, L.P.; BARROS, I.A.; LISBOA, P.C.; ARAUJO, R.L.; SILVA, A.C.; ROSENTHAL, D.; FERREIRA, A.C.; CARVALHO, D.P. Estrogen effects on thyroid iodide uptake and thyroperoxidase activity in normal and ovariectomized rats. *Steroids* 71(8): 653-659, 2006.

LINZBACH, A J. Heart failure from the point of view of quantitative anatomy. *Am J Cardiol* 5: 370-82, 1960.

LIU, J. L.; ZUCKER, I. H. Regulation of sympathetic nerve activity in heart failure: a role for nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res* 84: 417–423, 1999.

LISBÔA, P.C.; CURTY, F.H.; MOREIRA, R.M.; PAZOS-MOURA, C.C. Effects of estradiol benzoate on 5'-iodothyronine deiodinase activities in female rat anterior pituitary gland, liver and thyroid gland. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30:1479-1484, 1997.

LISBÔA, P.C.; CURTY, F.H.; MOREIRA, R.M.; OLIVEIRA, K.J.; PAZOS-MOURA, C.C. Sex steroids modulate rat anterior pituitary and liver iodothyronine deiodinase activities. *Hormone and Metabolic Research* 33:532-535, 2001.

LITWIN, S. E.; KATZ, S. E.; MORGAN, J. P.; DOUGLAS, P. S. Serial echocardiographic assessment of the left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation* 89: 345-54, 1994.

LITWIN, S. E.; KATZ, S. E.; MORGAN, J. P.; DOUGLAS, P. S. Long-term captopril treatment improves diastolic filling more than systolic performance in rats with large myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 28:773-81, 1996.

LOMBARDI F, SANDRONE G, PERNPRUNER S. Heart rate variability as an index of sympathovagal interaction after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 60:1239 – 45, 1987.

MAHMOODZADEH, S.; EDER, S.; NORDMEYER, J.; EHLER, E.; HUBER, O.; MARTUS, P.; WEISKE, J.; PREGLA, R.; HETZER, R.; REGITZ-ZAGROSEK, V. Estrogen receptor alpha upregulation and redistribution in human heart failure. *FASEB J*. v. 20, p. 926 – 934, 2006.

MALIK M., CAMM A. J., JANSE M. J., JULIAN D. G., FRANGIN G. A., SCHWARTZ P. J. Depressed heart rate variability identifies postinfarction patients who might benefit from prophylactic treatment with amiodarone: a substudy of EMIAT (The European Myocardial Infarct Amiodarone Trial). *J Am Coll Cardiol*;35:1263 – 75, 2000.

MALLORY, G.K.; WHITE, P.D.; SALCEDO-SALGAR, J. The speed of healing of myocardial infarction. A study of the pathologic anatomy in seventy-two cases. *American Heart Journal* 18(6): 647-71, 1939.

MANGIAPANE M. L.; THRASHER T. N.; KEIL L. C.; SIMPSON J. B.; GANONG W. F. Role for the subfornical organ in vasopressin release. *Brain Res Bull* 13: 43–47, 1984.

MARASSI, M. P.; FORTUNATO, R. S.; DA SILVA, A. C.; PEREIRA, V. S.; CARVALHO, D. P.; ROSENTHAL, D.; DA COSTA, V. M. Sexual dimorphism in thyroid function and type 1 iodothyronine deiodinase activity in pre-puberal and adult rats. *J Endocrinol*; 192(1):121-30, 2007.

MARCHLINSKI, F.E.; Ventricular tachycardia: clinical presentation, course and therapy. In: ZIPES, D.P.; JALIFE, J., ed Cardiac electrophysiology. From cell to bedside. Philadelphia, W.B. Saunders, P. 82, 1990.

McIVER, B.; GORMAN, C. A. Euthyroid sick syndrome: an overview. *Thyroid* 7:125–132, 1997.

MECAWI, A. S.; LEPLETIER, A.; ARAUJO, I. G.; OLIVARES, E. L.; REIS, L. C. Assessment of brain AT1-receptor on the nocturnal basal and angiotensin-induced thirst and sodium appetite in ovariectomised rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*; 8:169–75, 2007.

MECAWI AS, VILHENA-FRANCO T, ARAUJO IG, REIS LC, ELIAS LLK, ANTUNES-RODRIGUES J. Estradiol potentiates hypothalamic vasopressin and oxytocin neuron activation and hormonal secretion induced by hypovolemic shock. *Am J Physiol Regul Integr Com Physiol* 301: R905-R915, 2011.

MEINHARDT, U. & MULLIS, P. E., 2002. The aromatase cytochrome P-450 and its clinical impact. *Hormone Research* v. 57, p.145-152, 2002.

MENDELSON, M. E.; KARAS, R. H. The time has come to stop letting the hers tale wag the dogma. *Circulation*. v. 104, p. 2256 - -2259, 2001.

MEREDITH, I. T.; EISENHOFER, G.; LAMBERT, G. W.; DEWAR, E. M.; JENNINGS, G. L. Cardiac sympathetic nervous activity in congestive heart failure. Evidence for increased neuronal norepinephrine release and preserved neuronal uptake. *Circulation* 88: 136–145, 1993.

MEYER, R.; LINZ, K. W.; SURGES, R.; MEINARDUS, S.; VEES, J.; HOFFMANN, A.; WINDHOLZ, O.; GROHE, C. Rapid modulation of L-type calcium current by acutely applied oestrogens in isolated cardiac myocytes from human, guinea-pig and rat. *Exp Physiol*. v. 83, 305-321, 1998.

Migliaccio, A. *et al.* Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol–receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J*. 15, 1292–1300, 1996.

MILL, J. G.; VASSALLO, D. V.; LEITE, C. M. Time course of changes in heart rate and sympathetic tone after coronary artery ligation in rats. *Braz J Med Biol Res*; 24: 855-858, 1991.

MIYASHITA, K.; MURAKAMI, M.; IRIUCHIJIMA, T.; TAKEUCHI, T.; MORI, M. Regulation of rat type I iodothyronine deiodinase mRNA levels by testosterone. *Mol Cell Endocrinol* 115: 161-167, 1995.

MOREIRA, D.G.; MARASSI, M.P.; CORRÊA DA COSTA, V.M.; CARVALHO, D.P.; ROSENTHAL, D. Effects of ageing and pharmacological hypothyroidism on pituitary-thyroid axis of Dutch-Miranda and Wistar rats. *Experimental Gerontology* 40: 330-334, 2005.

MORRIS, D.C.; WALTER, P.F.; HURST, J.W. The recognition and treatment of myocardial infarction and its complications. In: HURST, J.W.; SCHLANT, R.C.; ed. *The heart. Arteries and veins*. 7 ed. New York, McGraw-Hill, Cap. 53C, p. 1054-1078, 1990.

MUSCH, T.I.; MOORE, R.C.; LEATHERS, D.J.; BRUNO, A.; ZELIS, R. Endurance training in rats with chronic heart failure induced by myocardial infarction. *Circulation* 74(2): 431-441, 1986.

NELSON, D. L. & COX, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Nova York: Worth Publishers, 2000.

NICKENIG, G.; BAUMER, A. T.; GROHE, C.; KAHLERT, S.; STREHLOW, K.; ROSEN-KRANZ, S.; STABLEIN, A.; BECKERS, F.; SMITS, J. F.; DAEMEN, M. J.; BOHM, M. Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation* 97: 2197-2201, 1998.

NORMAN, T.D. & COERS, C.R. Cardiac hypertrophy after coronary artery ligation in rats. *Archives of Pathology* 69: 69-72, 1960.

NORRIS, R.M.; CAUGHEY, D.E.; MERCER, C.J.; SCOTT, P.J. Prognosis after myocardial infarction. Six-year followup. *British Heart Journal* 36: 786-90, 1974.

NOVAES, M.A.S. Estudo das alterações morfológicas e funcionais do músculo papilar do ventrículo esquerdo de ratos submetidos ao infarto do miocárdio. Vitória, Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, 1992.92p. (Tese, Mestrado).

OJAMAA, K.; KENESSEY, A.; SHENOY, R.; KLEIN, I. Thyroid hormone metabolism and cardiac gene expression after acute myocardial infarction in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E1319-E1324, 2000.

OLIVARES, E.L.; COSTA-E-SOUSA, R.H.; CAVALCANTE-LIMA, H.R.; LIMA, H.R.C.; CEDRAZ-MERCEZ, P.L.; REIS, L.C. Effect of electrolytic lesion of the dorsal raphe nucleus on water intake and sodium appetite. *Braz J Med Biol Res* 36(12): 1709-1716, 2004.

OLIVARES E. L.; MARASSI M. P.; FORTUNATO R. S.; SILVA A. C. M.; COSTA-E-SOUSA R. H.; ARAUJO I. G.; MATTOS E. C.; MASUDA M. O.; MULCAHEY M. A.; HUANG S. A.; BIANCO A. C.; CARVALHO D. P. Thyroid function disturbance and type 3 iodothyronine deiodinase induction after myocardial infarction in rats – a time course study. *Endocrinology*, v.148(10): 4786-92, 2007.

OLIVETTI, G; RICCI, R; BEGHI, C; GUIDERI, G; ANVERSA, P. Response of the border zone to myocardial infarction in rats. *American Journal of Pathology* 125(3): 476-83, 1986.

OLIVETTI, G; CAPASSO, J.M.; MEGGS, L.G.; SONNENBLICK, E.H.; ANVERSA, P. Cellular basis of chronic left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Circulation Research* 68(3): 856-69, 1991.

OSAWA, Y.; HIGASHIYAMA, T.; SHIMIZU, Y. & YARBOROUGH, C., Multiple functions of aromatase and the active site structure: aromatase is the placental estrogen 2-hydroxylase. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* . v. 44, p. 469-480, 1993.

PACKER, M. The neurohormonal hypothesis: a theory to explain the mechanism of disease progression in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 20: 248–254, 1992.

PANCIERA, D. L.; REFSAL, K. R. Thyroid function in dogs with spontaneous and induced congestive heart failure. *Can J Vet Res.* Jul;58(3):157-62, 1994 .

PANIDIS, I.; MORGANROTH, J. Sudden death in hospitalized patients: cardiac rhythm disturbances detected by ambulatory electrocardiographic monitoring. *Journal of the American College of Cardiology* 2: 798-805, 1983.

PATEL, K. P. Role of paraventricular nucleus in mediating sympathetic outflow in heart failure. *Heart Fail Rev* 5: 73–86, 2000.

PAZOS-MOURA, C.; ABEL, E.D.; BOERS, M.E., MOURA, E.; HAMPTON T.G.; WANG J; MORGAN J.P.; WONDISFORD F.E. Cardiac Dysfunction Caused by

Myocardium-Specific Expression of a Mutant Thyroid Hormone Receptor. *Circ Res.*; 86: 700-6, 2000.

PEREIRA-JUNIOR PP, CHAVES EA, COSTA ESRH, MASUDA MO, DE CARVALHO AC, NASCIMENTO JH Cardiac autonomic dysfunction in rats chronically treated with anabolic steroid. *Eur J Appl Physiol*; 96: 487-494, 2006.

PETTERSSON, K.; GRANDIEN, K.; KUIPER, G. G. & GUSTAFSSON, J. A. Mouse estrogen receptor β forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor α . *Molecular Endocrinology*, v. 11, p. 1486 – 1496, 1997.

PFEFFER, M.A., PFEFER, J.M.; FISHBEIN, M.C.; FLETCHER, P.J., SPADARO, J., KLONER, R.A., BRAUNWALD, E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 44: 503-512, 1979.

PFEFFER, M.A.; PFEFER, J.M.; STEINBERG, C., FINN, P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long term therapy with captopril. *Circulation* 72: 406-12, 1985.

PFEFFER, J.M.; BRAUNWALD, E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 81(4): 1161-1172, 1990.

PFEFFER, J.M.; PFEFER, M.A; FLETCHER, P.J., BRAUNWALD, E. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Am. J. Physiol* 260: H1406-H1414, 1991.

Pietras, R.J. and Szego, C.M. Partial purification and characterization of oestrogen receptors in subfractions of hepatocyte plasma membranes. *Biochem. J.* 191, 743–760, 1980.

PINKHAM, M. I.; GUILD, S.; MALPAS, S. C.; BARRETT, C. J. Effects of sex and ovarian hormones on the initial renal sympathetic nerve activity response to myocardial infarction. *Exp Physiol* 97.9: 1040-1053, 2012.

POHJOLA, S.; SILTANEN, P.; ROMO, M. Five-year survival of 728 patients after myocardial infarction. A community study. *British Heart Journal* 43: 176-183, 1980.

POL, C. J.; MULLER, A.; ZUIDWIJK, M. J.; VAN DEEL, E. D.; KAPTEIN, A. S.; MARCHINI, M., ZUCCHI, R.; VISSER, T. J.; PAULUS, W. J.; DUNCKER, D. J.; SIMONIDES, W. S. Left ventricular remodeling after myocardial infarction is

associated with a cardiomyocyte-specific hypothyroid condition. *Endocrinology*, 152(2):669-679, 2011.

POLIKAR R., BURGER, A.G.; SCHERRER, U.; NICOD, P. The Thyroid and the heart. *Circulation* 87(5): 1435-1441, 1993.

RAPP, J.P.; PYUN, L.L. A sex difference in plasma thyroxine and thyroid stimulating hormone in rats. *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine* 146:1021-1023, 1974.

REIS, S. E.; HOLUBKOV, R.; YOUNG, J. B.; WHITE, B. G. COHN, J. N. FELDMAN, A. M. Estrogen is associated with improved survival in aging women with congestive heart failure: analysis of the vesnarinone studies. *J am CollCardiol.* v. 36, p. 529 – 533,2000.

ROSSOUW, J. E.; ANDERSON, G. L.; PRENTICE, R. L.; LACROIX, A. Z.; KOOPERBERG, C.; STEFANICK, M. L.; JACKSON, R. D.; BERESFORD, S. A.; HOWARD, B.V.; JOHNSON, K. C.; KOTCHEN, J. M.; OCKENE, J. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. Writing group for the Women's Health Initiative investigators. *J Am Med Assoc.* v. 288, p. 321-333, 2002.

QI, M.; OJAMAA, K.; ELEFThERIADES, E.G.; KLEIN, I.; SAMAREL, A.M. Regulation of rat ventricular myosin heavy-chain expression by serum and contractile activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 267: C520-C528, 1994.

ROSAS-ARELLANO M. P.; SOLANO-FLORES L. P.; CIRIELLO J. Co-localization of estrogen and angiotensin receptors within subfornical organ neurons. *Brain Res* 837:254–62, 1999.

RUBERMAN, W; WEINBLATT,E; GOLDBERG, J.D.; FRANK, C.W.; CHAUDHARY, B.S.; SHAPIRO, S. Ventricular premature complexes and sudden death after myocardial infarction. *Circulation* 64(2): 297-305, 1981.

SAHN, D. J.; DeMARIA, A.; KISSLO, J.; WEYMAN, A. Recommendations regarding in M-mode echocardiography: results os a survey of echocardiography measurements. *Circulation*: 58: 1072-1083, 1978.

SANTINI, F.; HURD, R. E.; LEE, B.; CHOPRA, I. J. Sex-related differences in iodothyronine metabolism in the rat: evidence for differential regulation among various tissues. *Metabolism* 43(6): 793-797, 1994.

SAUNDERS, P. T. K.; MAGUIRE, S. M.; GAUGHAN, J.; Expression of oestrogen receptor beta (ERb) in multiple rat tissues visualised by immunohistochemistry. *J Endocrinol.* v.154, p. 13– 16, 1997.

SELYE, H.; BAJUSZ, E.; GRASSO, S.; MENDELL, P. Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology* 1: 398-407, 1960.

SHWAERY, G. T; VITA, J. A.; KEANEY, J. F. J. Antioxidant protection of LDL by physiological concentrations of 17 beta-estradiol. Requirement for estradiol modification. *Circulation.* v.95, p. 1378 – 1385, 1997.

SIM, SISTEMA DE INFORMAÇÕES SOBRE MORTALIDADE. Proporções de óbitos (%) por grupo de causas segundo unidade da Federação – período: 2011. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/c04.def>>. Acesso: 20 maio 2014.

SIMERLY, R. B.; CHANG, C.; MURAMATSU, M.; SWANNSO, L. W. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol*, 294:76-95, 1990.

SIMON, T.; KRAUSE, M . M.; BRENTANO, C. F.; JAILLON, P. Sex Differences in the Prognosis of Congestive Heart Failure. *Circulation.* v.103, p. 375-380, 2001.

SMITH, D. F. & TOFT, D. O. Steroid receptors and their associated proteins. *Molecular Endocrinology.* v. 7,p. 4-11, 1993.

SMITH, P. J.; ORNATSKY, O.; STEWART, D. J; PICARD, P.; DAWOOD, F.; WEN, W. H.; LIU, P. P.; WEBB, D. J.; MONGE, J. C. Effects of Estrogen Replacement on Infarct Size, Cardiac Remodeling, and the Endothelin System After Myocardial Infarction in Ovariectomized Rats . *Circulation.* v.102, p. 2983 – 2989, 2000.

SMITH D. W.; DAY T. A. Catecholamine and oxytocin cells respond to hypovolaemia as well as hypotension. *Neuroreport* 14: 1493–1495, 2003.

SPADARO, J.; KLONER, R.A., BRAUNWALD, E.; PFEFFER, M.A., PFEFFER, J.M.; FISHBEIN, M.C.; FLETCHER, P.J. – Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ. Res* 44: 503-512, 1979.

SPADARO, J.; CICOGLIA, A.C.; TUCCI, P.J.F.; CURY, P.R.; MONTENEGRO, M.R. Morphometric evaluation of the time course of right ventricular hypertrophy after left artery coronary ligation in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 22: 517-522, 1989.

STEIN P. K., DOMITROVICH P. P., KLEIGER R. E., SCHECHTMAN K. B., ROTTMAN J. N. Clinical and demographic determinants of heart rate variability in patients post myocardial infarction: insights from the cardiac arrhythmia suppression trial (CAST). *Clin Cardiol* 2000;23:187 – 94.

STEIN P. K., DOMITROVICH P. P., HUIKURI H. V., KLEIGER R. E. Traditional and nonlinear heart rate variability are each independently associated with mortality after myocardial infarction. *J Cardiovasc Electrophysiol* 16:13 – 20, 2005.

STERN J. E.; ZHANG W. Preautonomic neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus contain estrogen receptor beta. *Brain Res* 975:99–109, 2003.

STRICKER, E. M.; THIELS, E.; VERBALIS, J. G. Sodium appetite in rats after prolonged dietary sodium deprivation: a sexually dimorphic phenomenon. *Am J Physiol* 1991;260: R1082–1088.

SULLIVAN, J. M.; VANDER, Z. R.; LEMP, G. F. (1998) Postmenopausal estrogen use and coronary atherosclerosis. *Ann Intern Med* v.108, p. 358 - 363, 1998.

TAMURA, T.; SAID, S.; GERDES, M. Gender-Related Differences in Myocyte Remodeling in Progression to Heart Failure. *Hypertension*. V.33, p.676-680, 1999.

TANAKA, N.; DALTON, N.; MAO, L.; ROCKMAN, H.A.; PETERSON, K.L.; GOTTSCHALL, K.R. Transthoracic echocardiography in models of cardiac disease in the mouse. *Circulation* 94: 1109-1117, 1996.

TANAKA, M.; NAKAYA, S.; WATANBE, M.; KUMAI, T.; TATEISHI, T.; KOBAYASHI, S. Effects of ovariectomy and estrogen replacement on aorta angiotensin-converting enzyme activity in rats. *Jpn J Pharmacol* 73:361–363, 1997.

TAYLOR, R. E. & FREGLY, M. J. Renal response of propylthiouracil-treated rats to injected mineralocorticoids. *Endocrinology* 75, 33–41, 1964.

TOYODA, N.; ZAVACKI, A. M.; MAIA, A. L.; HARNEY, J. W.; LARSEN, P. R. A novel retinoid X receptor-independent thyroid hormone response element is present in the human type 1 deiodinase gene. *Mol Cell Biol* 15:5100–5112, 1995.

TRINDADE, D.C; TRINDADE, R.C.; MARASSI, M.P.; MARTINS, O.P.P.R; COSTA-E SOUSA, R.H.; MATTOS, E.C.; MARINHO Jr, A.; REIS, L.C.; OLIVARES, E.L. Role of renin-angiotensin system in development of heart failure induced by myocardial infarction in rats: a new view of the old system. *An Acad Bras Cienc* (in press), 2007.

TUREK, Z.; GRANDTNER, M; KUBAT, K.; RIGNALDA, M.; KREUZER, F. Arterial blood gases, muscle fiber diameter and inter capillary in cardiac hypertrophy of rats with an old myocardial infarction. *Pflugers Archives* 376: 209-215, 1978.

URBAN R. J. Neuroendocrinology of aging in the male and female. *Endocrinol Metab Clin North Am*; 21:921–31, 1992.

VAISHNAV S., STEVENSON R., MARCHANT B., LAGI K., RANJADAYALAN K., TIMMIS A. D. Relation between heart rate variability early after acute myocardial infarction and long-term mortality. *Am J Cardiol* 73:653 – 7, 1994.

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

VASAN, R. S.; LARSON, M. G.; BENJAMIN, E. J.; EVANS, J. C.; REISS, C. K.; LEVY, D. Congestive heart failure in subjects with normal versus reduced left ventricular ejection fraction: prevalence and mortality in a population-based cohort. *J Am. Coll. Cardiol.*, Jun; 33(7): 1948-55, 1999.

VIJANDE, M.; COSTALES, M.; MARIN, B. Sex difference in polyethylenglycol-induced thirst. *Experientia*, 34: 742-743, 1978.

VISSER TJ, FRANK S, LEONARD JL. Differential sensitivity of brain iodothyronine 5'-deiodinases to sulfhydryl-blocking reagents. *Mol Cell Endocrinol* 33(2-3):321-7, 1983.

WALLEN, W. J.; CSERTI, C.; BELANGER, M. P.; WITTNICH, C. Gender-Differences in Myocardial Adaptation to Afterload in Normotensive and Hypertensive Rats. *Hypertension*. V. 36, P.774-779, 2000

WEBB, P.; LOPEZ, G. N.; UHT, R. M.; KUSHNER, P. J. Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Molecular Endocrinology*. v. 9, p. 443 - 456, 1995.

WIENER, I.; MINDCH, B.; PITCHON, R. Determinants of ventricular tachycardia in patients with ventricular aneurysms: results of intraoperative epicardial and endocardial mapping. *Circulation* 65 (5): 8566-8561, 1982.

WEINER, C. P.; LIZASOAIN, I.; BAYLIS, S. A.; KNOWLES, R. G.; CHARLES, I. G. Induction of calciumdependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 91, p. 5212 – 5216, 1994.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION WORLD HEALTH STATISTICS 2011.

WOLF, M. M.; VARIGOS, G. A.; HUNT, D.; SLOMAN, J. G. Sinus arrhythmia in acute myocardial infarction. *Med J Aust*;2:52–3, 1978.

YLIKORKKALA, O.; ORPANA, A.; PUOLAKKA, J.; PYORALA, T.; VIINIKK, L. Postmenopausal hormonal replacement decreases plasma levels of endothelin-1. *J ClinEndocrinolMetab*. v.80, p.3384 – 3387,1980.

YU, J.; KOENIG, R. J. Regulation of hepatocyte thyroxine 5 deiodinase by T3 and nuclear receptor coactivators as a model of the sick euthyroid syndrome. *J Biol Chem* 275:38296–38301, 2000.

YU, J.; KOENIG, R. J. Induction of type 1 iodothyronine deiodinase to prevent the nonthyroidal illness syndrome in mice. *Endocrinology* 147:3580–3585, 2006.

ZHENG, X. P.; MA, A. Q.; DONG, A. P.; WANG, S.; JIANG, W. H.; WANG, T. Z.; FAN F. L.; LING, S. Oestradiol supplement minimises coronary occlusion-induced myocardial infarction and ventricular dysfunction in oophorectomised female rats. *Int J Cardiol* 151(3):290-5, 2010.

ZHU, B.T. & LIEHR J.G. Inhibition of the catechol-O-methyltransferase-catalyzed O-methylation of 2- and 4-hydroxyestradiol by catecholamines: Implications for the mechanism of estrogen-induced carcinogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.v. 304 p.248-256,1993.

ZIMMER, H-G; MARTIUS, P.A; MARSCHNER, G. Myocardial infarction in rats: effects of metabolic and pharmacologic interventions. *Basic Res Cardiol* 84: 332-343, 1989.

ZIMMER, H-G; GERDES, A.M.; SYLVIANE, L.; MALL, G. – Changes in heart function and cardiac cell size in rats with chronic myocardial infarction. *J. Mol. Cell Cardiol* 22: 1231-1243, 1990.

ZUCKER, I. H.; WANG, W.; BRANDLE, M.; SCHULTZ, H. D.; PATEL, K. P. Neural regulation of sympathetic nerve activity in heart failure. *Prog Cardiovasc Dis* 37: 397–414, 1995.