

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA

**Papel do 17 β -estradiol no modelo de hipertrofia cardíaca
induzida pelo isoproterenol em ratas**

Camilla Pedreira da Silva

2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**Papel do 17 β -estradiol no modelo de hipertrofia cardíaca induzida pelo
isoproterenol em ratas**

CAMILLA PEDREIRA DA SILVA

Sob orientação do professor
Emerson Lopes Olivares

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Ciências Clínicas.

Outubro de 2009

RESUMO

PEDREIRA-SILVA, Camilla. **Papel do 17 β -estradiol no modelo de hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol em ratas.** 2009.62f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

Um estudo pouco frequente no modelo de hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol, é aquele referente ao papel dos estrógenos no desenvolvimento da hipertrofia miocárdica. Portanto, neste trabalho, buscou-se a padronização do modelo de hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol, bem como, a avaliação do papel do 17 β - estradiol neste modelo. Na primeira etapa foram utilizadas ratas Wistar (200 – 250g) que foram tratadas com diferentes doses de D-L cloridrato de isoproterenol (Iso): 0,5 (Iso 0,5), 5 (Iso 5), 10 (Iso 10) mg/kg/dia, s.c., durante 8 ou 16 dias (n=10/grupo). O Eletrocardiograma (ECG), ecocardiograma (ECO) e análise histológica foram realizados ao final do experimento (8 ou 16 dias). Na segunda etapa ratas Wistar foram ovariectomizadas bilateralmente (Ovx) ou falso- operadas (sham) e 48 horas após foram tratadas com Iso (5mg/kg/dia) s.c ou veículo (salina 0,9%) s.c, durante 16 dias, formando os seguintes grupos: sham+salina, Ovx+salina, sham+Iso e Ovx+Iso. Quatro grupos adicionais foram tratados com benzoato de estradiol nas doses de 7 μ g/kg/dia (Ovx+E₂.7+Iso e Ovx+E₂.7) ou 140 μ g/kg/dia (Ovx+E₂.140+Iso e Ovx+E₂.140) durante 16 dias (n=10/grupo). A dose de Iso foi dividida duas vezes ao dia e a administração hormonal foi feita uma vez ao dia. Duas semanas antes do início do experimento foi realizado o acompanhamento do ciclo estral das ratas sendo descartadas do experimento aquelas que não apresentavam três ciclos regulares consecutivos. Ao final do experimento foram realizados o ECG e os estudos *post mortem*. Os grupos Iso 0,5 , Iso 5 e Iso 10 apresentaram um aumento significativo do índice cardíaco (IC) quando comparado com o controle (p < 0,001). O grupo tratado com Iso durante 16 dias (Iso 5) apresentou um aumento no índice cardíaco quando comparado com o mesmo grupo durante 8 dias. No ECG houve aumento no índice QRS somente nos grupos Iso 5 e Iso 10. Os grupos tratados com Iso mostraram uma fibrose subendocárdica ventricular. Na segunda etapa todos os grupos tratados com Iso apresentaram um aumento no IC quando comparado com os seus respectivos controles. O Ovx+E₂.140+Iso apresentou aumento significativo do IC quando comparado ao Ovx+Iso. Ao contrário do índice cardíaco, não houve diferença estatística entre a amplitude do complexo QRS do Ovx+E₂.140+Iso e Ovx+Iso. A hipertrofia cardíaca induzida pelo Iso parece ser tempo e não dose dependente, pelo menos no tempo e dose utilizada. A fibrose parece ser dose dependente a partir da utilização de doses maiores de Iso. O estrógeno na dose de 140 μ g/kg/dia potencializou a hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol, porém o ECG não foi sensível em detectar essa diferença e o estrógeno, no protocolo utilizado, não reduziu a porcentagem de fibrose no modelo de hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol.

Palavras chaves: hipertrofia, isoproterenol, estradiol

RESUMO

PEDREIRA-SILVA, Camilla. **Role of 17 - β estradiol in model of cardiac hypertrophy induced by isoproterenol in rats.** Dissertation (Master Science in Medicine Veterinary) Instituto de Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

The role of estrogen in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy model is not often studied so far. Therefore, the main purpose of this study was to investigate the best protocol of isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and assess the role the 17 β - estradiol in this model. In the first part female Wistar rats were treated with different doses of D-L isoproterenol chloride: 0,5 (Iso 0,5), 5 (Iso 5), 10 (Iso 10) mg/kg/day, or vehicle (saline 0.9%) s.c., during 8 or 16 days (n = 10/group). The electrocardiography (ECG), echocardiogram (ECO) and histology were performed in the end of the experiments (8 or 16 days). In second part, female Wistar rats were ovariectomized (Ovx) or false operated (sham) and 48 hours after were treated with isoproterenol (5mg/kg/day), s.c. or vehicle (saline 0.9%) during 16 days (n=10/ group) comprising the groups as follow: sham+saline, Ovx+saline, sham+iso e Ovx+iso. Four additional groups were treated with estradiol benzoate: 7 μ g/kg/day (Ovx+E₂.7+iso e Ovx+E₂.7) or 140 μ g/kg/day (Ovx+E₂.140+iso) during 16 days (n = 10/group). The dose of isoproterenol was divided into twice a day while estrogen administration once a day. Two weeks before the beginning of the experiments, the rats underwent estrous cycle assessment and those which did not present three consecutive regular cycles were excluded from the study. ECG, and *post- mortem* studies were performed in the end of the experiments. The groups ISO-0.5, ISO-5 and ISO-10 showed a significant increase in cardiac index when compared to control groups (p < 0,01). The groups treated with isoproterenol during 16 days showed cardiac indexes higher than those treated with the same doses but during 8 days (p < 0,05). ECG showed increase QRS index only in the ISO-5 and Iso -10 groups. The groups treated with isoproterenol showed subendocardic fibrosis, especially in the left ventricle. In second part of this study, the groups treated with isoproterenol showed a significant increase in cardiac index (IC) when compared to control groups. O Ovx+E₂.140+iso showed significant increase in IC when compared to Ovx+iso (p < 0,05). The cardiac hypertrophy induced by isoproterenol was time but not dose-dependent, at least in the dose used herein. The fibrosis seems be dose-dependent from the use of bigger doses. High dose of 18-beta estradiol enhanced isoproterenol-induced cardiac hypertrophy which was not detected by conventional ECG assessment.

Key Words: cardiac hypertrophy, isoproterenol, 17 β -estradiol

LISTA DE ABREVIACOES E SMBOLOS

Ang II - angiotensina II

ÂQRS – vetor (ângulo) médio da despolarização

AT1- receptor para angiotensina II

β -AR - receptores β -adrenérgicos

α 1-AR- receptores α 1-adrenérgicos

aVR, aVL, aVF – derivações unipolares

CYP450 - aromatases do complexo enzimático citocromo P450

D1, D2,D3 –derivações bipolares clássicas

DAG - Diacilglicerol

DDF – diâmetro diastólico final

DLL - domínio de ligação ao ligante

DSF – diâmetro sistólico final

E/A – relação onda E / onda A

ECA – enzima conversora de angiotensina

ECG – eletrocardiograma

ECM - matriz extracelular

ECO - ecocardiograma

ERE - elementos de resposta a estrógenos

ERK - quinase regulada por sinal extracelular

ET1 - endotelina 1

FAK - quinase de adesão focal

FE – fração de encurtamento

FGF - fator de crescimento de fibroblatos

GPC - receptor acoplado a proteína G

Gs - proteína G estimulatória

IC- índice cardíaco

ICC – insuficiência cardíaca congestiva

IGF – fator de crescimento semelhante à insulina

IH – índice hepático

IP – índice pulmonar

IP3 – trifosfato de inositol

iQRS - índice do complexo QRS

Iso - DL-cloridrato de isoproterenol

JUNK - a quinase c-jun NH2-terminal

LTCC – canal para cálcio tipo L

MAPK - proteína quinase ativadora mitogênica

MKP1 - fosfatase quinase1

m TOR - alvo para rapamicina em mamíferos

NFAT - fator nuclear ativador de célula T

PKA – proteína quinase A

PKC - proteína quinase C

PLC - fosfolipase C

QTc – intervalo QT corrigido

RE-E – complexo receptor e estrógeno

S.C – subcutâneo

SRC - tirosinas quinases coativadoras de receptores esteroidais

TGF – β – fator de crescimento transformador β

VE - ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

4.7 Análise Estatística.....	28
------------------------------	----

1 INTRODUÇÃO

A hipertrofia cardíaca é um dos mais importantes fatores de risco nas doenças cardiovasculares. Paralelamente aos fatores de risco tradicionais, como tabagismo, dislipidemia e hipertensão arterial sistêmica, cada vez mais se enfatizam a prevenção e o tratamento da hipertrofia cardíaca. A hipertrofia cardíaca é caracterizada pelo aumento de massa do miocárdio por aumento do volume dos cardiomiócitos e do número de fibroblastos. Uma condição importante para o estabelecimento da hipertrofia é a sobrecarga patológica de pressão e/ou volume, que ativam processos de regulação neurohumorais. Apesar de em curto prazo parecerem sistemas benéficos para a manutenção da função cardíaca, em longo prazo tornam-se parte de um ciclo vicioso, que culmina na diminuição da função miocárdica.

A doença cardíaca inclui inúmeras anormalidades anatômicas e fisiológicas de etiologias diversas. Na Medicina Veterinária uma das patologias cardíacas mais prevalente em pequenos animais é a hipertrofia cardíaca. Além disso, a insuficiência cardíaca congestiva é uma condição patológica grave que em muitos casos tem como principal complicador a hipertrofia miocárdica.

Portanto, a utilização de modelos animais de hipertrofia cardíaca torna-se extremamente relevante para o melhor entendimento dos processos fisiopatológicos envolvidos e, posteriormente, para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes. Assim, diversos modelos experimentais foram descritos para estudar a fisiopatologia da hipertrofia cardíaca, inclusive, o modelo que utiliza o isoproterenol, um agonista β -adrenérgico. No entanto, os protocolos disponíveis na literatura são variados quanto à padronização de doses, via de administração, período de tempo de injeção e até mesmo, quando se é especificado, aos isômeros ópticos utilizados (levógero, dextrógero ou mistura racêmica). Em relação a avaliação funcional cardíaca neste modelo, a maioria dos trabalhos se restringem a estudos hemodinâmicos ou de biologia molecular, sendo as avaliações eletro e ecodopplercardiográficas ainda muito restritas.

Outro estudo ainda pouco freqüente no modelo de hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol é aquele referente ao papel dos estrógenos (E_2) no desenvolvimento da hipertrofia miocárdica. Portanto, neste trabalho, buscou-se a padronização do modelo de hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol, bem como, a avaliação do papel do E_2 nesse modelo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos Epidemiológicos das Doenças Cardiovasculares

Segundo a Organização Mundial de Saúde, as doenças cardiovasculares lideram as causas de morte no mundo. Dentre essas doenças, a hipertrofia ventricular constitui um indicador de grande relevância no risco de morbidade e mortalidade cardiovascular. Segundo o “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, 1983). No Brasil, o panorama não é diferente, as doenças cardiovasculares lideram o ranking de morte em nosso país. 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 (OMS - <http://www.who.int/en>). 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 da ICC em animais de laboratório e utilizá-los em teste objetivando a descoberta de novas condutas terapêuticas.

Estudos epidemiológicos mostraram que dentre os pacientes sobreviventes à 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 ICC causada por doenças não-isquêmicas (SIMON et al., 2001). 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 acelerada no desenvolvimento fisiopatológico da ICC (TAMURA et al., 1999; WALLEN et al., 2000).

2.2 Hipertrofia Miocárdica

A hipertrofia miocárdica constitui um conjunto de alterações estruturais decorrentes do aumento das dimensões dos cardiomiócitos, da proliferação do tecido conjuntivo intersticial e da rarefação da microcirculação coronariana (WOLLERT et al., 2002).

O miocárdio dos mamíferos passa por um crescimento hipertrófico durante a maturação pós-nascimento, que é caracterizado por aumento no tamanho individual dos cardiomiócitos sem divisão celular (LORELL et al., 2000). Esse padrão de desenvolvimento hipertrófico pode ser reiniciado no coração adulto em resposta a alterações hemodinâmicas e/ou neuro-hormonais (HUNTER et al., 1999).

A hipertrofia refere-se ao aumento do tamanho das células e, com essa alteração, ao aumento do tamanho do órgão. Assim, o órgão hipertrofiado não possui células novas, apenas células maiores. Estudos demonstraram que o tamanho aumentado das células não decorre de tumefação celular, mas da síntese de mais componentes estruturais (ROMHILT & ESTES, 1968; MOORE et al., 1980; REICHEK & DEVEREUX, 1981).

A hipertrofia cardíaca constitui um mecanismo adaptativo do coração em resposta ao aumento de sua atividade ou de sobrecarga funcional. Essa adaptação pode ser em resposta ao aumento da necessidade metabólica que impõe o aumento do débito cardíaco, condição essa observada em resposta ao exercício; indução hormonal por tiroxina ; aumento de carga pressórica ou de volume, condição observada em patologias como hipertensão; ou resultante de mecanismos intrínsecos de natureza genética, como as hipertrofias que podem ocorrer na ausência de sobrecargas. O resultado do aumento do trabalho do coração traduz-se em aumento da massa cardíaca devido ao crescimento dos miócitos e/ou do estroma conjuntivo. Quando associada à hipertensão arterial, a hipertrofia cardíaca assume grande importância aumentando o risco de ocorrência de morte súbita, arritmias ventriculares, isquemia do miocárdio e disfunção ventricular sistólica e diastólica (MILL, 2001; DIEZ & GONZALEZ, 2005).

O processo hipertrófico em geral vem acompanhado de alterações morfológicas no tecido cardíaco, alterações essas observadas nas células que compõem o tecido e também na matriz intersticial. Tomam parte nesse processo a expressão de protooncogenes e outros genes que regulam o crescimento, a diferenciação celular, os estímulos à produção de colágenos e alterações em função do crescimento dos fibroblastos (OIGMAN, 2000). Nesse novo padrão de expressão gênica estão incluídos também os genes que modificam a composição dos sarcômeros, destacando-se o aumento da proporção da isoforma V3 da miosina em relação a isoforma V1, os genes que aumentam a eficiência do metabolismo energético e os genes que alteram a expressão dos componentes do sistema renina angiotensina próprio do coração, incluindo a ECA, o angiotensinogênio e o receptor AT1. Em fases mais avançadas da hipertrofia cardíaca, observam-se também alterações na expressão de genes codificadores de fatores natriuréticos, do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$, diminuição da expressão dos genes codificadores da ATPase do retículo sarcoplasmático e dos receptores β -1 adrenérgicos. (SWYNGHEDAUW, 1999; MILL, 2001).

O estímulo inicial que desencadeia o processo de re-expressão gênica pode ser químico ou mecânico. Muitos agentes químicos, como agonistas β - adrenérgicos, o hormônio tireoideano, TGF - β (fator de crescimento transformador β), IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina) e endotelina-1 são fortes estimulantes da síntese protéica no miocárdio sendo assim indutores de hipertrofia (KOMURO, 2001;FRANCHINI, 2001,WILLIAMS, 2001).

2.2.1. Tipos de hipertrofia

O crescimento dos cardiomiócitos na hipertrofia ventricular pode ocorrer pela adição de sarcômeros em série ou em paralelo, permitindo que a célula aumente em comprimento ou em diâmetro, levando à hipertrofia excêntrica ou concêntrica, respectivamente (Figura 1). Nas hipertrofias concêntricas ocorre aumento de massa ventricular decorrente de aumento da espessura da parede e redução dos diâmetros cavitários. Tal condição surge em decorrência de aumento de resistência à ejeção ou à sobrecarga de pressão. Nas hipertrofias excêntricas ocorre aumento de massa ventricular e da espessura da parede ventricular, mas com aumento dos diâmetros cavitários. Esta condição surge em decorrência de sobrecarga de volume. Na hipertrofia concêntrica a redução dos diâmetros cavitários permite ao ventrículo desenvolver maior pressão (KEMPF & WOLLERT, 2004; WEBER et al., 1991).

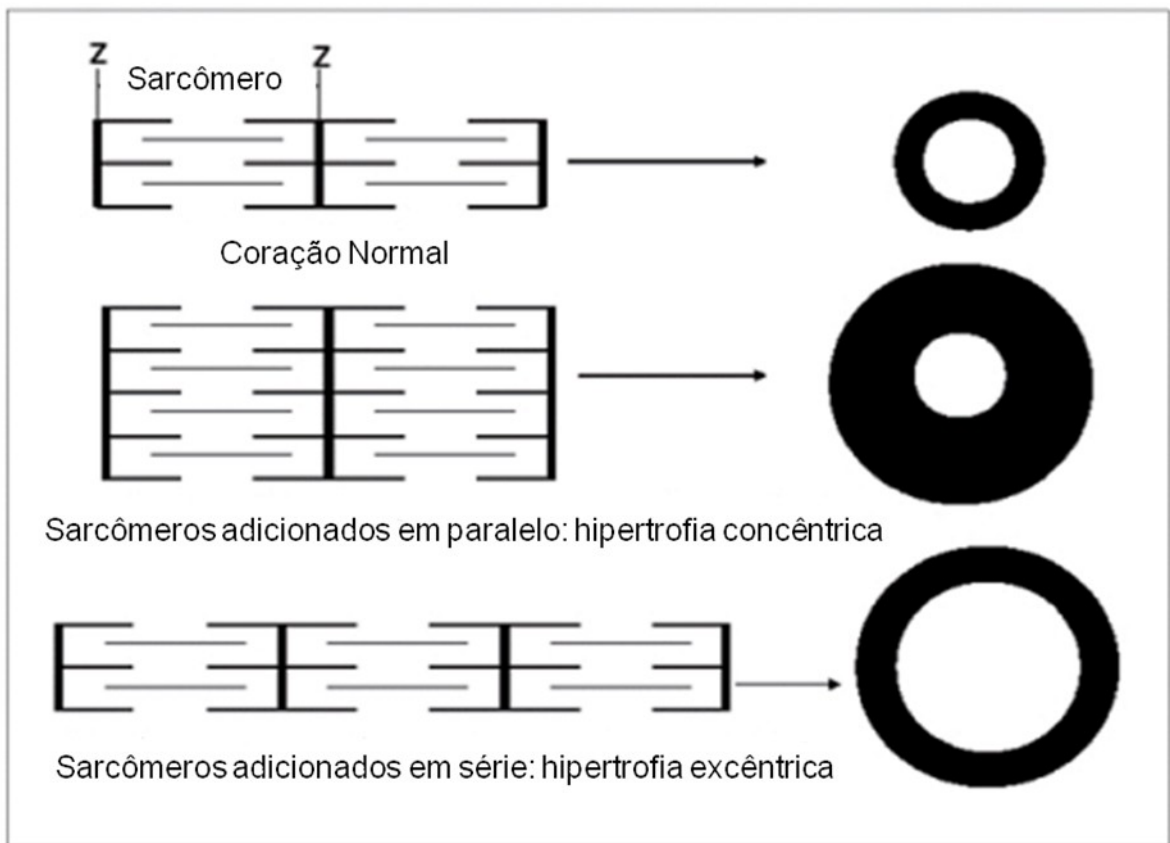


Figura 1: Diferenciação da hipertrofia excêntrica (sobrecarga de volume) e concêntrica (sobrecarga de pressão). Sarcômero: espaço compreendido entre dois discos Z. (modificada de GARCIA & INCERPI, 2008).

2.2.2. Fatores que induzem a hipertrofia ventricular

2.2.2.1 Fatores Hemodinâmicos

- Aumento da necessidade metabólica

Segundo Kempf e Wollert (2004), a hipertrofia causada por sobrecargas hemodinâmicas pode conduzir à hipertrofia adaptada (fisiológica) ou mal-adaptada (patológica). Hipertrofia fisiológica é aquela desenvolvida em decorrência da sobrecarga hemodinâmica transitória, como as observadas no crescimento cardíaco durante a adolescência e a gestação, e em resposta a exercícios regulares em que o coração necessita bombear mais sangue para a periferia. Nesse caso, há uma adaptação adequada às novas exigências. Enquanto a hipertrofia patológica é aquela decorrente de sobrecarga hemodinâmica persistente (RUSSELL et al., 2000).

- Sobrecarga de pressão e/ou volume

Uma condição importante para o estabelecimento da hipertrofia, é a sobrecarga patológica de pressão e/ou volume, que ativa processos de regulação neurohumorais. Apesar de em curto prazo parecerem sistemas benéficos para a manutenção da função cardíaca, em longo prazo tornam-se parte de um ciclo vicioso, que culmina na diminuição da função miocárdica (VASSALO & LIMA, 1993).

Condições patológicas em caso de sobrecarga de pressão, como na coarctação aórtica e hipertensão arterial ou em caso de sobrecarga de volume, como na insuficiência aórtica ou na comunicação interatrial, promovem aumento no volume dos cardiomiócitos, acompanhado de aumento dos componentes da matriz colágena (OZAKI et al., 2002; KEMPF et al., 2004).

O estiramento é capaz de ativar canais para Ca^{+2} tipo L (LTCC), para Na^{+} e os trocadores de Na^{+}/H^{+} ; inativar canais de K^{+} ; ativar adenilato-ciclase e fosfolipase C (MORGAN et al., 1987), além de estar associado ao acúmulo de inosítois de fosfato, os quais atuam como segundos mensageiros (VON HARSDORFH, et al., 1989). As alterações no funcionamento dos canais iônicos do sarcolema levam a variações da concentração iônica intracelular, o que pode representar um estímulo inicial para ativação de proteínas quinases ativadoras mitogênicas (MAPK). Dentre a superfamília das MAPK, a quinase regulada por sinal extracelular (ERK), a quinase c-jun NH2-terminal (JUNK) e a quinase p38 são mediadores da sinalização hipertrófica das células miocárdicas, pois induzem a transcrição de genes associados à hipertrofia (SUSSMAN et al., 2002). O estímulo mecânico também pode ativar os receptores integrinas, localizados na membrana celular entre a matriz extracelular (ECM) e o complexo de proteínas que formam a linha Z do sarcômero (SUSSMAN et al., 2002). Nessa malha, posicionam-se proteínas sinalizadoras, como as tirosina-quinases coativadoras de receptores esteroidais (Src) e quinase de adesão focal (Fak), além de outras responsáveis pelo início do processo de sinalização ativado pelas integrinas (BURRIDGE & CHRZANOWSKA - WODNICKA, 1996).

O estímulo mecânico também induz a liberação local de fatores autócrinos e parácrinos pelas células miocárdicas, como endotelina 1 (ET1), fatores de crescimento e citocinas, fator de crescimento de fibroblatos (FGF), fator de crescimento transformador β (TGF β), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e cardiotrofina-1, (SUSSMAN et al., 2002). Esses fatores podem ligar-se aos receptores específicos de membrana e ativar cascatas intracelulares acopladas à calcineurina, fosfoquinase-C e à via da MAPK e dar início à cascata de eventos responsáveis pelo crescimento hipertrófico cardíaco.

2.2.2.2.Fatores neuro-humorais

- Angiotensina II

A angiotensina II (Ang II) interage com o receptor AT1, associado à proteína G, que estimula a fosfolipase C. Esta, por sua vez, induz a formação de trifosfato de inositol, assim como de diacilglicerol, o que provoca aumento da concentração citoplasmática de Ca^{+2} , levando à ativação da proteína quinase C (PKC) e da adenilatociclase (SHIRAI et al., 1995). A Ang II, via receptor AT1, também é capaz de induzir uma cascata de ativação via tirosinas-quinases (BERNSTEIN et al., 1998).

Os receptores AT2 apresentam estrutura transmembrana clássica de um receptor associado à proteína G20. Estudos de Senbonmatsu et al., (2000) demonstraram que camundongos com deleção do receptor AT2 apresentaram atenuação da hipertrofia induzida por sobrecarga pressórica. Entretanto, animais com deleção de receptores AT1 não apresentaram atenuação da hipertrofia induzida por sobrecarga pressórica (HARADA et al.,

1998), sugerindo que a deficiência de receptores AT1 pode ser compensada pelos receptores AT2, ou, ainda, que este subtipo AT2 pode ter papel predominante nos efeitos tróficos da Angiotensina II em cardiomiócitos.

Há também a hipertrofia miocárdica resultante de mecanismos intrínsecos de natureza genética tais como as hipertrofias idiopáticas que podem ocorrer mesmo na ausência de sobrecarga (WIDGREN et al., 1993)

A deposição de tecido conjuntivo, a hipertrofia e o remodelamento cardíaco são respostas compensatórias do miocárdio ao trabalho aumentado, pois a hiperfunção miocárdica induz à injúria miocárdica e ao aumento do tamanho dos cardiomiócitos, o que provoca aumento na massa e no tamanho generalizado do coração. (COTRAN, 1996; ROSSI, 1998)

O resultado do aumento de trabalho do coração traduz-se num aumento de massa cardíaca devido ao crescimento dos miócitos e/ou do estroma conjuntivo (PEREIRA, 1993; JALIL et al., 1989; WEBER et al., 1990). Quando relacionada a condições fisiopatológicas, a hipertrofia cardíaca assume importância devido ao fato de que, sua presença associa-se ao aumento de risco de morbidade e mortalidade, tendo como conseqüência a ocorrência de morte súbita, arritmias ventriculares, isquemia miocárdica e disfunção ventricular sistólica e diastólica. Portanto, a presença de hipertrofia constitui um importante fator de risco (MILANEZ, 1995; SARAIVA, 1997; FRIMM, 1998).

A hipertrofia cardíaca é caracterizada pelo aumento da massa cardíaca em resposta a estímulos aplicados (AKAZAWA & KUMURO, 2003) e o prolongamento deste processo leva a insuficiência cardíaca congestiva definida como uma síndrome progressiva que aparece no final de fases de muitas doenças cardíacas (ARMOUNDAS et al., 2001).

2.3. Matriz Intersticial

Os miócitos, embora representem 75% do volume celular do miocárdio, o seu número é pequeno se comparado ao número de fibroblastos, já que estes contribuem com mais de 70% do número de células no coração (PELOUCH et al., 1994). Além disso, a complacência da parede ventricular depende da quantidade, da distribuição e da composição do colágeno que forma o estroma conjuntivo (MILANEZ et al., 1995; SARAIVA et al., 1997; FRIMM et al., 1998). Os principais componentes da matriz intersticial do coração são os tipos de fibras colágenas, proteoglicanos, fibronectina e elastina, além de outras glicoproteínas (MILL, 2001).

São encontrados no coração os colágenos do tipo I, III, IV, V e VI. Acredita-se que o colágeno I constitui cerca de 80% do colágeno cardíaco, o tipo III constitui cerca de 12 %, os tipos IV, V e VI compõem os 8 % restantes. O colágeno tipo I é o mais rígido de todos sendo o principal responsável pela rigidez e resistência à deformação das câmaras cardíacas. O colágeno tipo III tem papel importante na manutenção do alinhamento dos feixes de miócitos e conferem elasticidade ao tecido. Esses dois colágenos associados formam uma rede fibrilar no tecido cardíaco importante para a sustentação dos cardiomiócitos e vasos coronários, conferindo ao tecido, características físicas únicas (BURLEW & WEBER, 2000). As fibras colágenas de maior rigidez podem aumentar em determinados tipos de hipertrofia, podendo provocar deficiência no processo de relaxamento do miocárdio, levando ao aparecimento da insuficiência diastólica (DIEZ et al., 2005). Em outras hipertrofias, como a provocada pelo exercício, as características do estroma não se alteram e, conseqüentemente, não ocorre prejuízo funcional (WEBER et al., 1991).

A deposição de tecido fibroso no miocárdio pode gerar fibrose perivascular e fibrose intersticial. A fibrose perivascular caracteriza-se por acúmulo de colágeno na camada adventícia das artérias e arteríolas intramiocárdicas, em resposta a agressões tóxicas /

infeciosas ao miocárdio e diabetes. A fibrose intersticial aparece como uma progressão da fibrose perivascular ou secundariamente à deposição de fibras colágenas à distância da rede vascular (MILL, 2001).

São ainda pouco conhecidos os mecanismos que controlam a quantidade de colágeno na matriz extracelular cardíaca, qual o tipo de colágeno e sua distribuição. Sabe-se que a quantidade de colágeno na matriz depende de um balanço entre os processos de síntese e degradação. Dentre outros, o sistema renina-angiotensina-aldosterona estimula a formação da matriz cardíaca, tanto a Ang II como a aldosterona estimulam a síntese de colágenos fibrilares. Em contrapartida, os peptídeos natriuréticos, bradicina e óxido nítrico são fatores que facilitam a degradação dos colágenos fibrilares (BURLEW & WEBER, 2000).

Atualmente, existem muitas evidências que sugerem a participação do sistema simpático ao lado das alterações hemodinâmicas, no desenvolvimento de hipertrofia miocárdica e insuficiência cardíaca congestiva em humanos (SIMKO, 2007). Catecolaminas mediando injúrias miocárdicas tem sido documentado em pacientes com feocromocitoma (SZAKACS et al., 1959), hipertireoidismo (GOLDSTEIN & KILLIP, 1965), infarto do miocárdio (RAAB et al., 1962) e em insuficiência cardíaca congestiva (COHN et al., 1984). Estudos iniciais de Rona et al. (1959) demonstraram que a administração subcutânea de isoproterenol em ratos produz uma necrose miocárdica com distribuição irregular subendocárdica bem como é visto em modelo de infarto miocárdico pela oclusão da artéria coronariana, entretanto, naquele ocorre preservação da vasculatura coronariana.

Beznak & Hacker (1964) demonstraram que o modelo de hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol (Iso) resulta em necrose miocárdica relacionada com a dose e em redução da capacidade funcional cardíaca. Assim como, Teerlink et al. (1994) demonstraram que a administração de Iso induz a necrose miocárdica difusa e, no final, a uma progressiva dilatação do ventrículo esquerdo.

2.4 Modelos de Hipertrofia Cardíaca

Considerando ser a hipertrofia cardíaca um importante mecanismo de adaptação do coração à sobrecarga de trabalho e ser um fator de risco de morbi-mortalidade, justifica-se o empenho na criação e estudo de modelos experimentais indutores de hipertrofia que visam explicar os mecanismos envolvidos na sua gênese e manutenção.

Diversos modelos de hipertrofia cardíaca são utilizados atualmente, como: a coarctação da aorta, onde promove-se uma estenose desta artéria, ocorrendo o desenvolvimento da hipertrofia em resposta ao aumento agudo da pós-carga (SALGADO et al., 1994; VENTURA - CLAPIER, 1988) e o modelo de infarto do miocárdio induzido pela ligadura da artéria coronária esquerda (OLIVARES et al., 2004). A hipertrofia miocárdica pode ainda ser induzida por estímulos hormonais. Dois modelos são comumente utilizados, resultantes de tratamento com os hormônios tireoideanos ou com agentes simpatomiméticos, como o isoproterenol (VASSALLO et al., 1988; BROWN et al., 1992; PEREIRA et al., 1993; OLIVEIRA et al., 1999). O isoproterenol induz a hipertrofia cardíaca sem causar hipertensão (BOLUYT et al., 1995).

A hipertrofia também pode ser desencadeada por estímulos fisiológicos. São exemplos desse tipo de hipertrofia os modelos induzidos por exercício físico como natação, exercício com esteira ou exercício isométrico (PENPARGKUL et al., 1980; RUSSEL et al., 2000; MACHIDA et al., 2000)

Dos vários modelos de insuficiência cardíaca já descritos na literatura, a hipertrofia cardíaca induzida por neurohormônios, incluindo a noradrenalina, e o aumento do estresse de parede, está associada à ativação da enzima conversora de angiotensina in vivo e à síntese

protéica e crescimento celular in vitro (GEISTERFER et al., 1988; FABRIS et al., 1990; SADOSHIMA et al., 1993). Neste contexto, a hipertrofia cardíaca induzida pela estimulação β -adrenérgica deve envolver a ativação do sistema renina-angiotensina local e/ou periférico levando a ativação de peptídeos que atuam diretamente, no cardiomiócito, ou indiretamente, devido a alterações hemodinâmicas, contribuindo assim para o desenvolvimento de importantes alterações no fenótipo cardíaco.

2.5 Hipertrofia Miocárdica Induzida por Isoproterenol.

O isoproterenol ou isoprenalina (Figura 2) é um derivado da noradrenalina, sendo um dos mais potentes agonistas β -adrenérgicos, porém com afinidade muito baixa para receptores α (GOODMAN E GILMAN'S, 2006). Além disso, já está bem descrita que a hiperatividade β -adrenérgica, seja mediada pela injeção de isoproterenol ou mesmo aquela mediada pela infusão crônica em baixas doses de noradrenalina, levam a alterações hemodinâmicas clássicas (hipotensão e taquicardia) e hipertrofia cardíaca (ZIERHUT & ZIMMER, 1989).

Estudo realizado por Murad et al. (2001), revelou que a hipertrofia miocárdica induzida pelo isoproterenol na dose 0,3mg/kg/dia, s.c., durante 8 dias, não foi homogênea. Alguns corações apresentaram alterações pouco expressivas, enquanto outros, comprometimento significativo das funções sistólica e diastólica. A hipertrofia reduziu a capacidade de gerar força e aumentou a capacidade de variar a pressão devido ao aumento da relação massa/volume. Além disso, houve comprometimento também da complacência ventricular provavelmente devido à rigidez da câmara cardíaca em resposta a existência de acentuada deposição de colágeno. Ainda neste estudo, animais submetidos ao mesmo esquema de tratamento, apresentaram padrões diferentes de hipertrofia miocárdica. Não houve relação entre a dose e o padrão de hipertrofia.

Entretanto, Teerlink et al.(1994), demonstraram que a hipertrofia miocárdica induzida pelo isoproterenol nas doses de 85, 170 e 340 mg/kg, s.c., administrado duas vezes com intervalo de 24 horas, durante 2, 6 e 16 semanas foi dose dependente. Houve, concomitantemente, aumento da pressão de enchimento do ventrículo esquerdo bem como dilatação deste, já observado na segunda semana após o tratamento. O remodelamento ventricular foi tempo dependente.

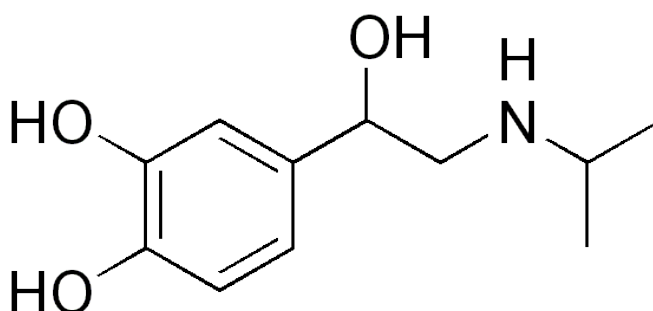


Figura 2: Estrutura molecular do Isoproterenol

2.6. Mecanismo de Ação do Isoproterenol

Quando o cardiomiócito recebe um estímulo hipertrófico, esse é traduzido no interior da célula, como alterações bioquímicas que levam à ativação de mensageiros citosólicos e nucleares que irão agir no núcleo da célula, regulando a transcrição, e finalmente determinarão a expressão gênica que induz a hipertrofia miocárdica (GARCIA et al., 2008).

Os cardiomiócitos expressam receptores β -adrenérgicos (β -AR) e α 1-adrenérgicos (α 1-AR). A estimulação dos receptores β -adrenérgicos (β -AR) ativa a adenilato-ciclase pela interação com a proteína G estimulatória (Gs), a qual desencadeia cascatas intracelulares que ativam proteínas quinases A (PKA), estimulando também a p38-MAPK14 (DASH et al., 2003). A estimulação crônica dos β -AR pela administração de isoproterenol (CAMPOS et al., 2006) induz o aumento da massa cardíaca, dos cardiomiócitos, da fibrose miocárdica e da disfunção progressiva, o que culmina com insuficiência cardíaca. Agudamente, a ativação dos α 1-AR aumenta a contratilidade mediada pela ativação da proteína Gq. Esta provoca a ativação da fosfolipase C, que estimula hidrólise de fosfatidil inositóis da membrana, gerando dois segundos mensageiros, o diacilglicerol (DAG) e o inositol trifosfato (IP3). O IP3 estimula a liberação de Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático, enquanto o DAG ativa a proteína quinase C (PKC) e, esta, por sua vez, induz a hipertrofia em cultura de miócitos neonatais (SHUBEITA et al., 1992).

A hipertrofia cardíaca induzida por catecolaminas, está associada a ativação da p38-MAPK, a qual por sua vez é regulada pelo estrógeno endógeno através da regulação da fosfatase quinase1 (MKP1) (DASH et al., 2003).

2.7 Estrógenos

2.7.1 Síntese de estrógenos

Os estrógenos endógenos, 17 β -estradiol, estrona e estriol, são esteróides com 18 átomos de carbono, derivados do colesterol (Figura 3) 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 captado por células esteroidogênicas e levado aos sítios de síntese de esteróides. Os diferentes hormônios esteróides 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. Este processo ocorre nas mitocôndrias de tecidos formadores de hormônios esteróides. O passo limitante na produção de esteróides é a transferência do colesterol do citosol para a membrana interna mitocondrial. Todas as reações de hidroxilação e oxigenação que ocorrem durante a biossíntese de esteróides, são catalisadas por oxidases de função-mista (citocromo P450 mitocondrial), que utilizam NADPH e O_2 (NELSON et al., 2000).

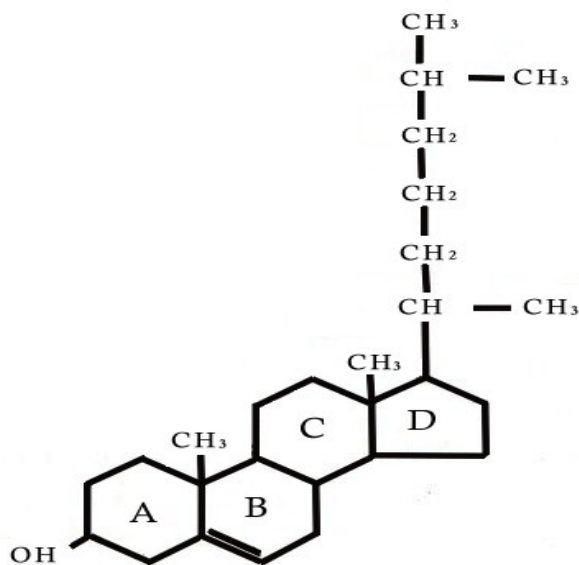


Figura 3: Fórmula estrutural do colesterol (Nelson et al., 2000).

A aromatização, último passo no processo de formação de estrógenos, é catalisada pelas aromatases do complexo enzimático citocromo P450 (CYP450), que funcionam como desmetilases, e estão presentes no retículo endoplasmático liso (GRUBER et al, 2002). Como mostrado na Figura 4, essa etapa converte testosterona em estradiol, androstenodiona em estrona e 16 α -hidroxiestrona 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 aromatases, 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).

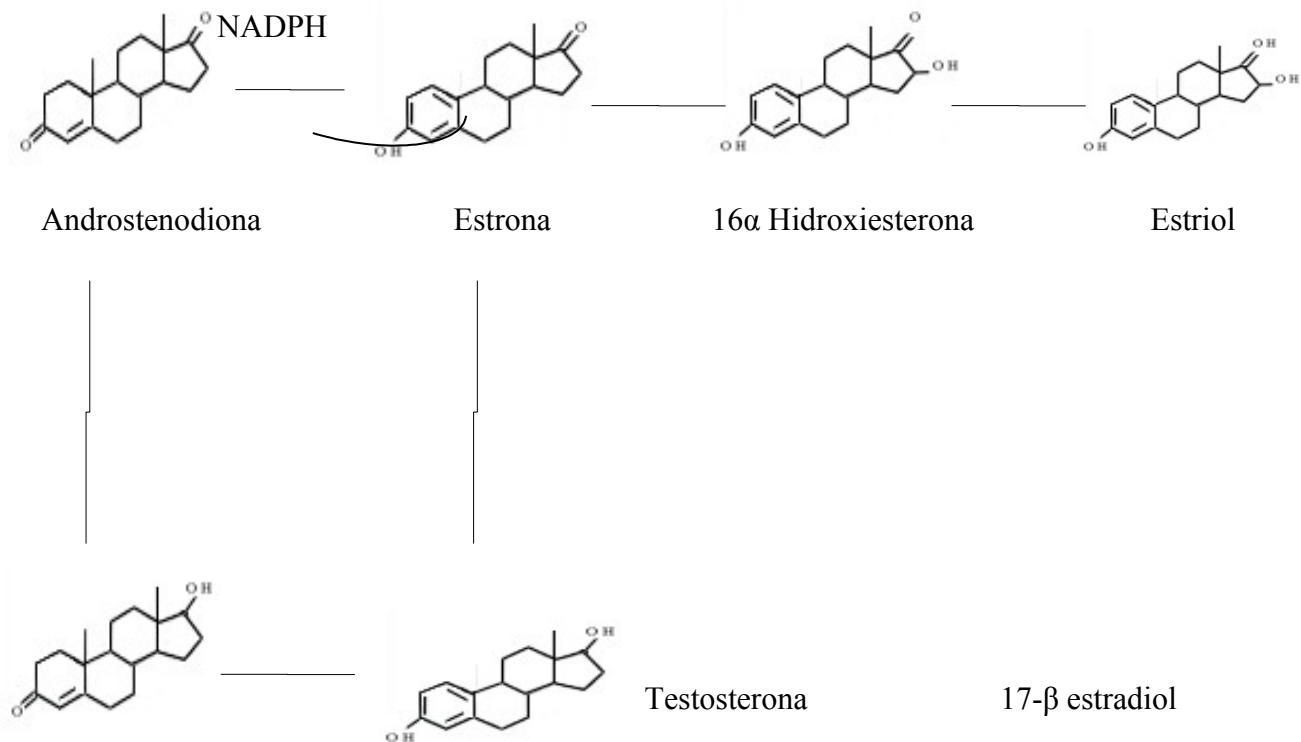


Figura 4: Biossíntese de estrógenos (modificado de Katsung, 1998 e Gruber et al, 2002)

2.7.2. Transporte e metabolismo de estrógenos

Por serem altamente hidrofóbicos, os hormônios esteróides 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 esteróides) 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-glucuronosil transferase (glucuronidação) e os conjugados são excretados na bile e na urina. A hidrólise desses conjugados pela microbiota 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-hidroxiestrona 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 (GRUBE et al., 2002). 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 oxirredução 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).

2.7.3 Mecanismo de ação do estrógeno

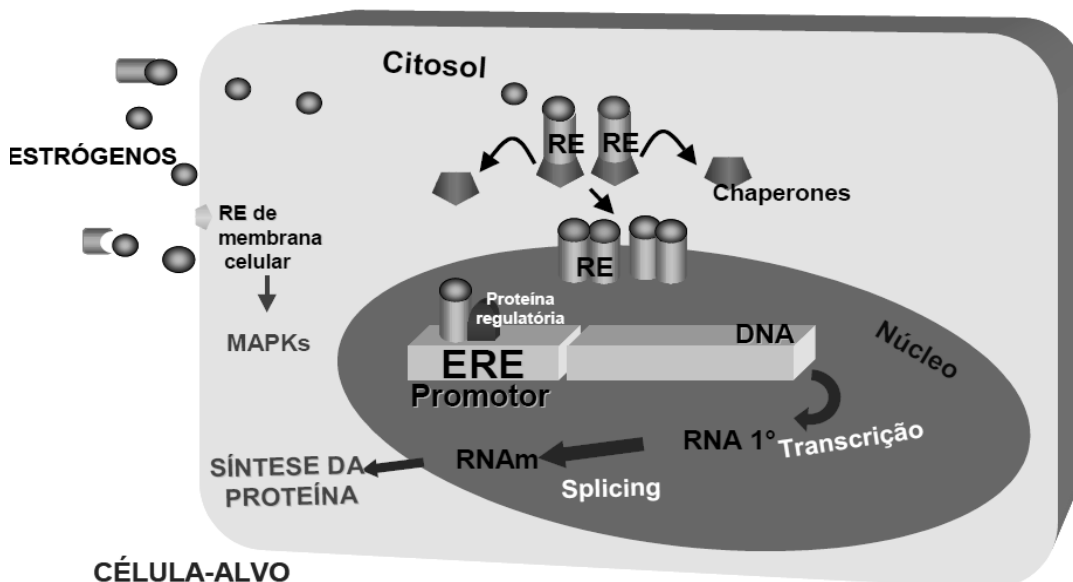
Os estrógenos desencadeiam suas ações biológicas (agonistas e antagonistas) em diferentes tipos celulares, por meio de ligação a receptores nucleares específicos, os receptores de estrogênio (RE), membros da superfamília dos receptores nucleares (que incluem também os receptores do ácido retinóico e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

Como ilustrado na Figura 5, o RE livre no citoplasma ou localizado na membrana nuclear se encontra ligado a proteínas receptores-associadas. Estas proteínas servem como chaperonas 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 RE, (assim como de outros receptores de esteróides) 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 (DLL) do receptor que, por sua vez, se dissocia das suas chaperonas. Esse complexo formado pelo receptor e pelo estrógeno (RE-E) se difunde para o interior do núcleo da célula e se liga a seqüências específicas nas regiões promotoras do DNA, chamadas elementos de resposta a estrógenos (ERE). 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). O mecanismo de translocação do complexo RE-E não é inteiramente conhecido. Sabe-se, porém que esse movimento é estimulado pela proteína caveolina-1, que interage diretamente com o receptor (SCHLEGEL et al, 1999). Os estrógenos também podem regular a transcrição de genes que não possuem os EREs, 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 demonstraram a presença de receptores de estrógeno alfa e beta nos cardiomiócitos e fibroblastos. Estes receptores de estrógeno são funcionais e tem mostrado regular a expressão de genes específicos do coração como a dos receptores de progesterona e o gene das proteínas de junção gap, a conexina 43 (SAUNDERS et al., 1997, GROHE et al., 1997). Níveis do RNAm dos receptores alfa são os mesmos no coração de homens e mulheres. Por outro lado, os níveis dos receptores beta são maiores nos corações de fêmeas (MAHMOODZADEH et al., 2006).

Figura 5: Mecanismo de ação do estrógeno (FRIEDRICH, 2003)



2.8 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 boas evidências do efeito cardioprotetor direto do estrógeno em diferentes espécies (VAN EICKELS et al., 2001). Sabe-se que a mulher tem uma menor incidência de doenças isquêmicas cardíacas antes da menopausa mas perde esta vantagem quando entra na menopausa, indicando que o hormônio feminino, particularmente o estradiol representa um importante papel na redução do risco de doenças isquêmicas cardíacas. (SULLIVAN et al. 1998; GRODSTEIN & STAMPFER, 1995). Estudo realizado por Hale et al.(1997) demonstraram que o estradiol reduziu o tamanho do infarto e arritmias ventriculares induzida por isquemia sem alterar os parâmetros hemodinâmicos, sugerindo que o estradiol deve agir diretamente no coração.

As mulheres apresentam uma menor incidência de hipertrofia ventricular esquerda, porém esta na pós-menopausa apresenta incidência aumentada quando comparado aos homens (AGABITI, 2002). Estudos experimentais vêm colaborando para o melhor entendimento dos processos envolvidos no aumento do risco cardiovascular após a menopausa (ADAMS et al.,1981; SHWAERY, 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 conseqüente diminuição dos riscos cardiovasculares (LIMA et al., 2005).

O estrógeno protege o coração contra a morte por apoptose e necrose, bem como reduz o grau de fibrose no tecido cardíaco (CAMPER-KIRBY et al., 2001). Além disso, possui efeitos na parede dos vasos envolvendo numerosos mecanismos moleculares. Pode modular a função vascular pelo aumento da produção do óxido nítrico a partir da estimulação da óxido nítrico sintase (WEINER et al., 1994) e pela diminuição dos níveis de endotelina - 1 (YLIKORKALA et al., 1995). Além disso, vários estudos demonstram uma atenuação no remodelamento cardíaco devido às ações do estrógeno (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). Por outro lado, resultado do estudo “Women's Health Initiative” sugeriu que o estrógeno não estabelece proteção contra o desenvolvimento de doenças coronarianas e infarto do miocárdio (ROSSOUW, 2002).

Um estudo demonstrou que a administração aguda de 10^{-9} M 17 β -estradiol inibiu o influxo de Ca^{++} através dos canais para Ca^{++} tipo L pela estimulação do receptor β – adrenérgico (MEYER et al., 1998 ; LI et al., 2000). Acredita-se que esta modulação inibitória do estrógeno contra os efeitos da ativação dos receptores β - adrenérgicos no influxo de cálcio deva diminuir a frequência cardíaca e a força de contração. Deste modo, reduz o consumo de oxigênio e confere cardioproteção (LI et al., 2000). Por outro lado, Kam et al.,(2003), demonstraram que a administração aguda de 10^{-9} M de 17 β -estradiol no coração isolado de ratas ovariectomizadas não conferiu cardioproteção.

Os cardiomiócitos expressam os receptores ER-alpha e ER- beta (GROHE et al., 1998) e o estrógeno (0,18 mg durante 60 dias) tem mostrado atenuar o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca em resposta a um aumento da pressão (VAN EICKLES et al., 2001). Estudos do efeito do estrógeno em isquemia cardíaca e infarto do miocárdio tem revelado controvérsia resultados (HALE et al., 1996; SMITH et al., 2000).

Curiosamente, estudos clínicos não conseguiram demonstrar redução dos episódios de doença cardíaca em mulheres pós-menopausa submetidas à terapia de reposição com estrógeno (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).

3 OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

- Padronizar em nosso laboratório o modelo de hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol em ratas;
- Investigar as possíveis alterações eletro e ecocardiográficas no modelo de hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol;
- Estudar as alterações anatomohistopatológicas de corações de ratas submetidas à hipertrofia miocárdica induzida pelo isoproterenol;
- Estudar o potencial do ECG como meio de diagnóstico da hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol;
- Estudar o papel do 17β - estradiol na hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizadas ratas Wistar pesando entre 200 e 250g procedentes do biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFRRJ. Os animais permaneceram em sala climatizada com controle de claro-escuro (12 horas por período) em caixas contendo no máximo 4 ratas com água e ração *ad libitum*.

Todos os experimentos foram desenvolvidos seguindo normas internacionais de utilização de animais de laboratório (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) publicado pelo US National Institutes of Health (NIH Publication nº 85-23, revised 1996; <http://www.nap.edu/openbook.php?isbn=0309053773>) e aprovado pelo comitê de ética institucional.

4.2 Modelo de Hipertrofia Cardíaca Induzido pelo Isoproterenol (Iso)

Foi feito o acompanhamento e a certificação do ciclo estral normal das ratas por meio de esfregaço vaginal, duas semanas anteriores à realização do experimento. Foram descartadas do experimento as ratas que não apresentavam três ciclos regulares consecutivos. Após o acompanhamento do ciclo estral, os animais foram divididos randomicamente em grupos para a injeção subcutânea (s.c), duas vezes ao dia, de diferentes doses de isoproterenol (DL-cloridrato de isoproterenol, Sigma, EUA): 0,5; 5 e 10 mg/Kg, ou salina a 0,9 % (grupo controle), no mesmo volume do grupo experimental, durante 8 ou 16 dias. As administrações foram realizadas sempre nos mesmos horários: às 08h00min e às 20h00min. A solução de isoproterenol foi preparada diariamente, imediatamente antes de cada administração para evitar a oxidação e a perda da atividade da droga.

Após a determinação da dose de isoproterenol, que produziu a hipertrofia cardíaca com claras alterações eletrocardiográficas associada à baixa taxa de mortalidade, uma nova etapa do estudo foi realizada para estudar o papel do estrógeno na hipertrofia cardíaca induzida pela hiperativação β -adrenérgica. Nesta etapa, após o acompanhamento do ciclo estral, os animais foram divididos em grupos para a injeção (s.c), duas vezes ao dia, de Iso, na dose de 5 mg/kg ou salina a 0,9 % (grupo controle), no mesmo volume do grupo experimental, durante 16 dias. As administrações foram realizadas às 8h00min e às 20h00 min, da mesma forma para a primeira etapa.

4.3 Protocolo Experimental

Para contemplar os objetivos propostos, este estudo foi dividido em duas etapas:

1ª Etapa: Estudo de diferentes doses de isoproterenol em diferentes tempos de avaliação na indução de hipertrofia cardíaca em ratas;

2ª Etapa: Estudo do papel do 17β -estradiol na hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol em ratas;

Os grupos experimentais foram formados a partir dos objetivos de cada etapa:

1ª Etapa: Os animais foram submetidos à injeção subcutânea de três diferentes doses de isoproterenol: 0,5, 5 e 10 mg/Kg durante 8 ou 16 dias (n = 10 animais para cada dose e tempo). Um grupo de 20 animais serviu de controle para o experimento e recebeu salina 0,9% no mesmo volume e durante os mesmos períodos, 8 (n = 10) e 16 (n = 10) dias. No final do experimento (8 ou 16 dias) foram realizados o eletrocardiograma, ecocardiograma e a avaliação *post mortem*. A figura 6 ilustra o protocolo experimental. Os animais foram divididos em 8 grupos:

Grupo Salina A: Fêmeas tratadas com salina durante 8 dias.

Grupo Iso.0,5.A: Fêmeas tratadas com isoproterenol 0,5mg/kg durante 8 dias.

Grupo Iso 5.A: Fêmeas tratadas com isoproterenol 5mg/kg durante 8 dias.

Grupo Iso 10.A: Fêmeas tratadas com isoproterenol 10 mg/kg durante 8 dias.

Grupo Salina B: Fêmeas tratadas com salina durante 16 dias.

Grupo Iso.0,5.B: Fêmeas tratadas com isoproterenol 0,5 mg/kg durante 16 dias.

Grupo Iso 5.B: Fêmeas tratadas com isoproterenol 5 mg/kg durante 16 dias.

Grupo Iso 10.B: Fêmeas tratadas com isoproterenol 10 mg/kg durante 16 dias.

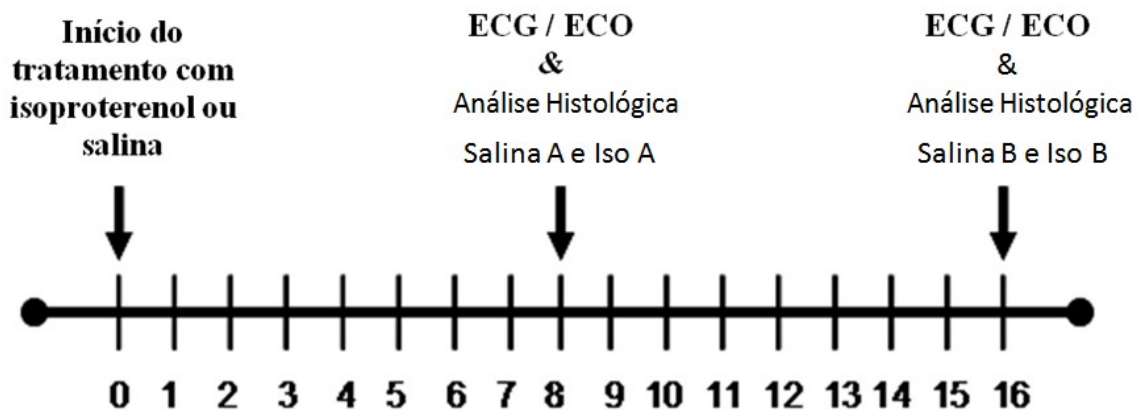


Figura 6: Protocolo experimental. A escala temporal está em dias. No tempo zero foi realizada a primeira administração de isoproterenol. Após 8 ou 16 dias de tratamento foram realizadas as avaliações funcionais cardíacas.

2ª Etapa: Em um segundo momento, uma vez definida a dose de 5 mg/kg como a mais adequada em relação a dose- tempo, ou seja, a dose e o tempo de tratamento com isoproterenol que induziu a hipertrofia cardíaca com um percentual mínimo de mortalidade e presença de alterações eletrocardiográficas evidentes, os animais foram divididos em 8 grupos (n = 10/grupo):

Grupo Sham+Salina: Fêmeas falso-operadas tratadas com salina.

Grupo Sham+Iso: Fêmeas falso-operadas tratadas com isoproterenol.

Grupo Ovx+Salina: Fêmeas ovariectomizadas tratadas com salina.

Grupo Ovx+Iso: Fêmeas ovariectomizadas tratadas com isoproterenol.

Grupo Ovx+E₂.7: Fêmeas ovariectomizadas repostas (baixa dose) com benzoato de estradiol (7µg/Kg de peso s.c. diariamente) e tratadas com salina.

Grupo Ovx+E₂.7+Iso: Fêmeas ovariectomizadas repostas (baixa dose) com benzoato de estradiol (7µg/Kg de peso,s.c diariamente) e tratadas com isoproterenol.

Grupo Ovx+E₂.140: Fêmeas ovariectomizadas tratadas com alta dose de benzoato de estradiol (140µg/Kg de peso) e salina.

Grupo Ovx+E₂.140+Iso: Fêmeas ovariectomizadas tratadas com alta dose de benzoato de estradiol (140µg/Kg de peso) e isoproterenol.

Foi verificada a presença do ciclo estral, avaliada pela técnica de esfregaço vaginal, antes do início do experimento, i.e., dois meses após o nascimento (~200g). Após o acompanhamento do ciclo estral durante duas semanas, foi realizado a ovariectomia ou a falsa cirurgia (Sham). Quarenta e oito horas após esta, iniciou-se o tratamento com a injeção subcutânea (s.c.), duas vezes ao dia, de isoproterenol (DL - cloridrato de isoproterenol, Sigma, EUA) na dose de 5mg/kg ou salina 0,9 % (grupo controle), durante 16 dias, no mesmo volume do grupo experimental. Quatro grupos adicionais foram tratados com benzoato de estradiol 7µg/Kg (Ovx+E₂.7+Iso e Ovx+E₂.7) ou 140 µg/Kg (Ovx+E₂.140+Iso e Ovx+E₂.140), por via subcutânea (s.c), uma vez ao dia, durante 16 dias. Os controles receberam óleo de milho, no mesmo volume e tempo do grupo experimental. A administração foi realizada sempre no mesmo horário às 08h00 min. Figura 7.

O Eletrocardiograma (ECG) e o estudo post mortem foram realizados no final do experimento.

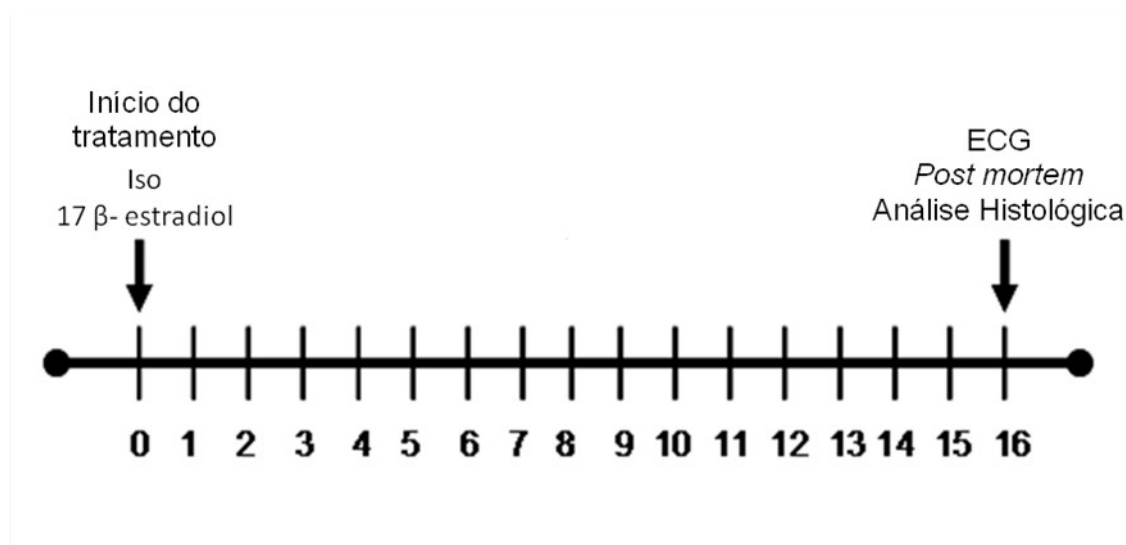


Figura 7: Protocolo experimental. A escala temporal está em dias. No tempo zero foi realizada a primeira administração de isoproterenol e/ou 17 β- estradiol durante 16 dias.

4.4. Ovariectomia

Para realização da cirurgia de ovariectomia, as ratas foram anestesiadas com ketamina (50mg/kg) e xilazina (5mg/kg), na dose de 0,1 mL/100g de peso corporal, via intraperitoneal. Após a tricotomia da região abdominal e assepsia com álcool iodado, a pele e a musculatura foram incisadas longitudinalmente, na região próxima ao nível dos rins e abaixo da última costela. O ovário foi identificado e exposto, sendo realizada a hemostasia, através da ligação

da parte superior da trompa com fio de seda nº 4 (Ethicon/ Johnson & Johnson). O ovário juntamente com a gordura circundante, o oviduto e uma pequena porção do útero foram excisados. As camadas musculares foram suturadas com fio de sutura absorvível Catgut nº 4 (Cirumédica) e a pele com fio de seda nº 4 (Ethicon/ Johnson & Johnson), sendo esse procedimento realizado bilateralmente. Os animais controles foram submetidos à mesma cirurgia, porém seus ovários foram identificados e expostos cirurgicamente, sendo a seguir reposicionados para posterior sutura da musculatura e pele previamente incisadas. Foi administrado uma dose de antibiótico (Benzetacil, 40.000 U/kg, IM). (COLOMBO et al., 2003).

4.5 Avaliações Funcionais

4.5.1 Registro eletrocardiográfico (ECG)

Na primeira etapa do experimento, o exame eletrocardiográfico foi realizado com o eletrocardiógrafo convencional (cardiomax FX-2111 – Fukuda Denshi). Os animais foram anestesiados com ketamina (50 mg/Kg, Dopalen®) e xilazina (5 mg/Kg, Amasedan®), i.p, misturadas na mesma seringa. O registro do ECG de superfície foi realizado com os animais na posição de decúbito dorsal sobre uma mesa de madeira, como descrito anteriormente (OLIVARES et al., 2004; OLIVARES et al., 2007; TRINDADE et al., 2007). Os quatro eletrodos (para as derivações do plano frontal) do eletrocardiógrafo convencional (Cardimax FX-2111 – Fukuda Denshi) foram conectados a fios de cobre e estes às agulhas hipodérmicas 30 X 1 inseridas subcutaneamente nas patas direita e esquerda e na coxa esquerda como de costume, além da conexão da coxa direita que foi ligada ao aparelho e deste à terra. As derivações utilizadas foram: as derivações clássicas do plano frontal D1, D2, D3, aVR, aVL e aVF. O aparelho foi calibrado para a velocidade de 25 mm/s e voltagem de 20 mm = 1 mV. O posicionamento dos eletrodos em relação aos animais foi rigorosamente padronizado para se diminuir a variação dos registros entre os animais e sobretudo para uniformizar os cálculos dos vetores médios de despolarização ventricular.

Os parâmetros avaliados foram: frequência e ritmo cardíacos, amplitude da onda P, amplitude do complexo QRS (iQRS), o vetor (ângulo) médio de despolarização ventricular (ÂQRS) e presença de onda s. Para a análise da amplitude da onda P, foi utilizado o parâmetro: presença de ondas P superiores a 0,1 mV nas derivações bipolares. A amplitude do QRS foi calculada pela soma algébrica das ondas positivas e negativas, de uma mesma derivação (nas derivações bipolares) e foi denominada índice de amplitude (Figura 10). O vetor da despolarização ventricular no plano frontal (ÂQRS) foi obtido pela relação trigonométrica entre D1 e AVF, ou seja, pelo cálculo do arco tangente (AVF/D1) para ângulos entre 0 e 90° e arc tg (D1/AVF) para ângulos entre 90° e 180° (OLIVARES, 2006).

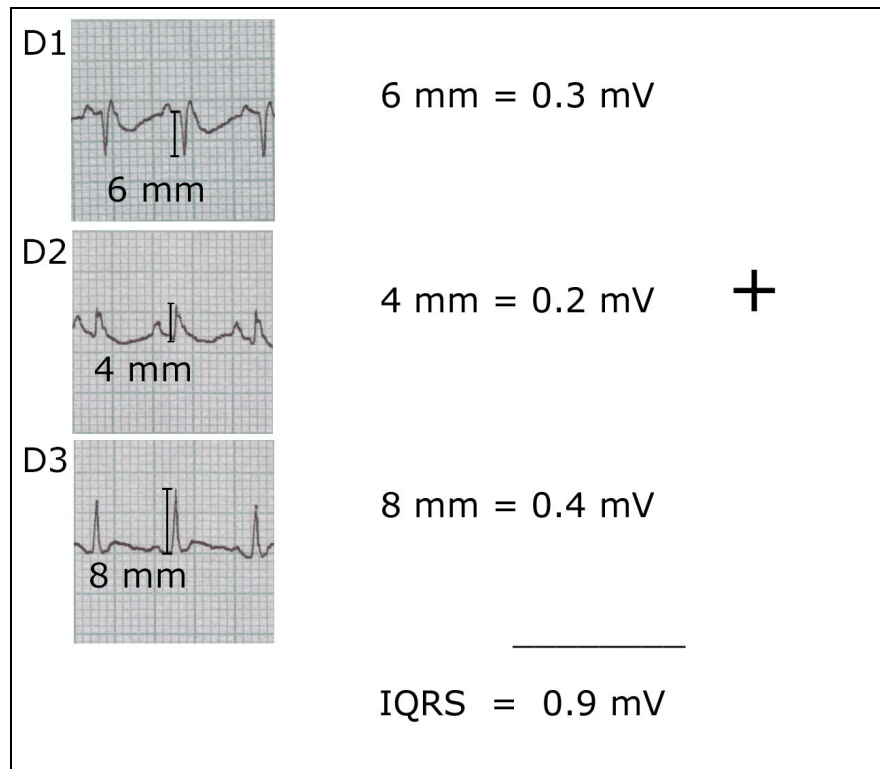


Figura 8: Representação esquemática do procedimento matemático realizado para a obtenção do índice de amplitude do complexo QRS.(OLIVARES et al, 2006).

Na segunda etapa, para o registro eletrocardiográfico utilizou-se o sistema de aquisição amplificador 3A9, Interface TEKTRONIX / T1-2 (Axon instruments). Nesta etapa, o ECG foi realizado em animais acordados e através da implantação de dois eletrodos de monitorização cardíaca 2223 (3M). Vinte quatro horas antes do registro, preparou-se o local, realizando-se a tricotomia na região precordial, o local de aplicação do eletrodo. No dia do registro, foi feita a adesão do eletrodo a região, um a cada lado do animal.

Cada registro durou 5 minutos e os sinais foram adquiridos com a velocidade de 10 k-hertz e amplitude com resolução de 12 bits. Os parâmetros avaliados foram: amplitude da onda P, intervalo PQ e QT, amplitude e duração do complexo QRS, presença de infra ou supradesnívelamento e presença de arritmias cardíacas. Foram obtidos 30 complexos e feito uma média, por animal. O intervalo QT foi normalizado pela fórmula de Bazett (BAZETT, 1920).

$$\text{Fórmula de Bazett: } \text{intervalo} = \frac{\text{intervalo medido}}{\sqrt{R-R}}$$

4.5.2 Ecocardiografia (ECO)

O exame foi realizado como descrito anteriormente (OLIVARES et al., 2004; OLIVARES et al., 2007; TRINDADE et al., 2007). Brevemente, utilizou-se um equipamento comercialmente disponível (Megas - Esaote) 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 eletromecânicos na faixa de 5,0 a 10 MHz.

A análise ecodopplercardiográfica foi realizada por um único observador experiente da técnica, que desconhecia a procedência dos animais quanto aos grupos experimentais. Para tanto, os animais foram anestesiados com ketamina (50 mg/Kg, Dopalen®) e Xilazina (5 mg/Kg, Amasedan®) administrados por via intraperitoneal. Após a anestesia, foi realizada a tricotomia da região anterior do tórax. As medidas realizadas no Modo-M, orientadas pelo bidimensional, incluíram os seguintes parâmetros: geometria cardíaca, as funções sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo (VE) e a relação Ae/Ao. 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.

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

4.6 Estudo *Post Mortem*

4.6.1 Avaliação indireta da hipertrofia cardíaca

O peso do coração foi obtido (em miligramas) e normalizado pelo peso corporal dos animais (em gramas). Desta forma, obteve-se o índice cardíaco (IC) que permitiu avaliar a hipertrofia cardíaca (SJAASTAD et al., 2000, MIRCOLI et al., 2002).

4.6.2 Avaliação indireta da insuficiência cardíaca

Os pesos dos pulmões e fígado foram obtidos (em miligramas) e normalizados pelo peso corporal dos animais (em gramas). Desta forma obteve-se os índices pulmonar e hepático respectivamente (SJAASTAD et al., 2000, MIRCOLI et al., 2002).

4.6.3 Avaliação indireta do sucesso da ovariectomia

Afim de validar a eficiência da ovariectomia e a reposição com estrógeno, ao final do experimento, os animais foram sacrificados e seus úteros foram removidos para determinar o índice uterino, expresso pelo peso uterino (mg) dividido pelo peso corporal (g) (MECAWI, et al., 2007).

4.6.4 Processamento do material

Os animais foram submetidos à decapitação. Inicialmente, foi feita uma incisão mento-pubiana de pele com bisturi e abertura da cavidade tóraco-abdominal com o auxílio de

uma tesoura cirúrgica. Em seguida, procedeu-se a retirada e pesagem dos órgãos (coração, pulmão, fígado e útero) após uma breve secagem dos mesmos em papel de filtro.

Para a análise histológica, fragmentos dos corações foram fixados em formalina a 20 %, desidratados em álcool etílico (Vetec PA) em concentrações crescentes, começando com álcool a 70% e terminando em álcool absoluto. Utilizou-se xilol (Vetec xileno) para a diafanização dos tecidos, e a impregnação foi feita em parafina (parafina para histologia Pro-cito) fundida em estufa a 60°C. As peças foram colocadas num molde retangular e incluídas em parafina fundida para ser cortado no micrótomo a 5 µm (LUNA, 1968). Utilizou-se a coloração de hematoxilina e eosina e histoquímica de Tricromo de Masson (MALLORY, 1938).

4.6.5 Análise histológica

Para a análise histológica conduziu-se à avaliação microscópica do tecido cardíaco, para tanto, cortes histológicos (corte transversal a nível dos músculos papilares) foram obtidos para evidenciar ou não a presença de fibrose, determinar o diâmetro médio dos cardiomiócitos e revelar a organização geral do tecido.

Os corações foram separados e processados para a análise histológica. Utilizou-se a coloração de hematoxilina-eosina e a objetiva de 40 x, a fim de se determinar o diâmetro dos cardiomiócitos. Ao passo que para evidenciação da fibrose, foram utilizados cortes corados com tricromo de Masson, na qual a etapa da hematoxilina foi suprimida e a imagem analisada com a objetiva de 20 x. As imagens foram obtidas pelo microscópio de luz (Olympus, modelo CH 30 acoplado a câmera Nikon digital colpix 4300. Essas foram analisadas no computador com o auxílio do software Image J, na resolução 2272 x 1704 pixels.

A área de fibrose foi calculada pela soma das áreas correspondentes a fibrose, dividida pela soma de toda a área correspondente aos cardiomiócitos mais a área de fibrose (MATSUBARA, et al., 2000). Foi realizada uma média de 25 campos de cada coração de área fibrosada ou não, a fim de se determinar a área de fibrose total.

Foi feita uma média do diâmetro de 80 a 90 cardiomiócitos de cada coração, para se determinar o diâmetro dos cardiomiócitos. Para esta, os cardiomiócitos tinham que atender a duas condições: (1) o corte do cardiomiócito tinha que apresentar o núcleo central e (2) a presença de uma membrana celular íntegra. O diâmetro foi determinado, traçando-se uma linha reta de um ponto da membrana plasmática para o lado oposto, de acordo com Grimm et al., 1998, passando pelo centro do núcleo.

4.7 Análise Estatística

A análise estatística foi utilizada para a comparação dos resultados apresentados pelos grupos experimentais. Para tanto, utilizou-se a análise de variância univariada (ANOVA) seguida de teste de comparação múltipla de Bonferroni quando indicado. Para eventos do tipo sim ou não, por exemplo, presença de onda P maior que 0,1 mV, o teste exato de Fisher foi utilizado. Em todos os testes, o grau mínimo de significância considerado foi de 95% ($P < 0,05$) ou 99% ($P < 0,01$). Todos os cálculos foram realizados no computador pelo programa GraphPad Prism® (versão 4, Graphpad software, Inc., San Diego, USA). Os valores foram representados como média \pm s.e.m (erro padrão da média).

5 RESULTADOS

5.1. Primeira Etapa

A figura 9 mostra o peso corporal antes e após o tratamento com diferentes doses de isoproterenol ou salina. Observa-se que não houve diferença significativa entre o peso corporal dos animais.

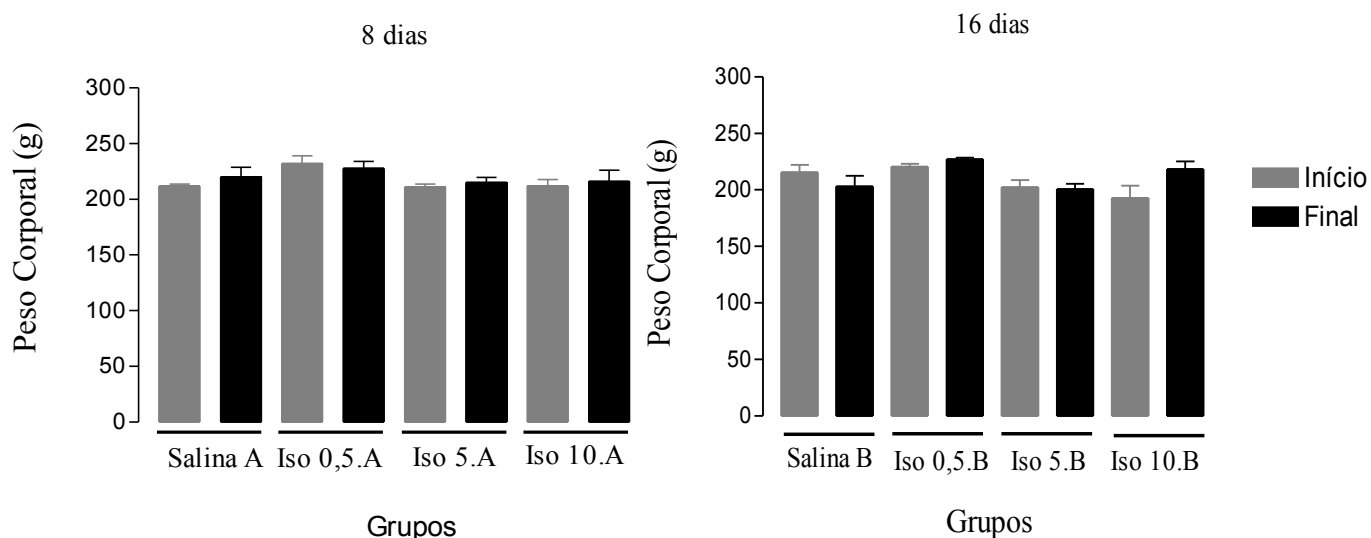


Figura 9: Peso corporal (g) dos diferentes grupos tratados com isoproterenol em seus respectivos tempos 8 ou 16 dias de tratamento.

5.1.1 Avaliação indireta da hipertrofia cardíaca

Oito dias após o tratamento com isoproterenol, os grupos Iso 0,5.A, Iso 5.A e Iso 10.A apresentaram aumento do IC (IC = peso do coração/peso corporal) quando comparado ao controle ($0,483 \pm 0,22$; $0,4668 \pm 0,15$; $0,505 \pm 0,17$ vs. $0,292 \pm 0,04$ mg/kg, $P < 0,01$) bem como no 16º dia de tratamento ($0,524 \pm 0,19$; $0,530 \pm 0,33$; $0,522 \pm 0,02$ vs. $0,320 \pm 0,12$ mg/kg, $P < 0,01$), respectivamente. Em relação aos grupos tratados com Iso em diferentes tempos (8 e 16 dias), há diferença significativa apenas para a dose de 5 mg/kg (Figura 10), enquanto a dose de 10mg/kg apresentou tendência à diferença em relação ao grupo avaliado no tempo de 16 dias. Portanto, a hipertrofia cardíaca não foi dose dependente e parece ter uma relação tempo dependente, pelo menos nas doses e tempos utilizados.

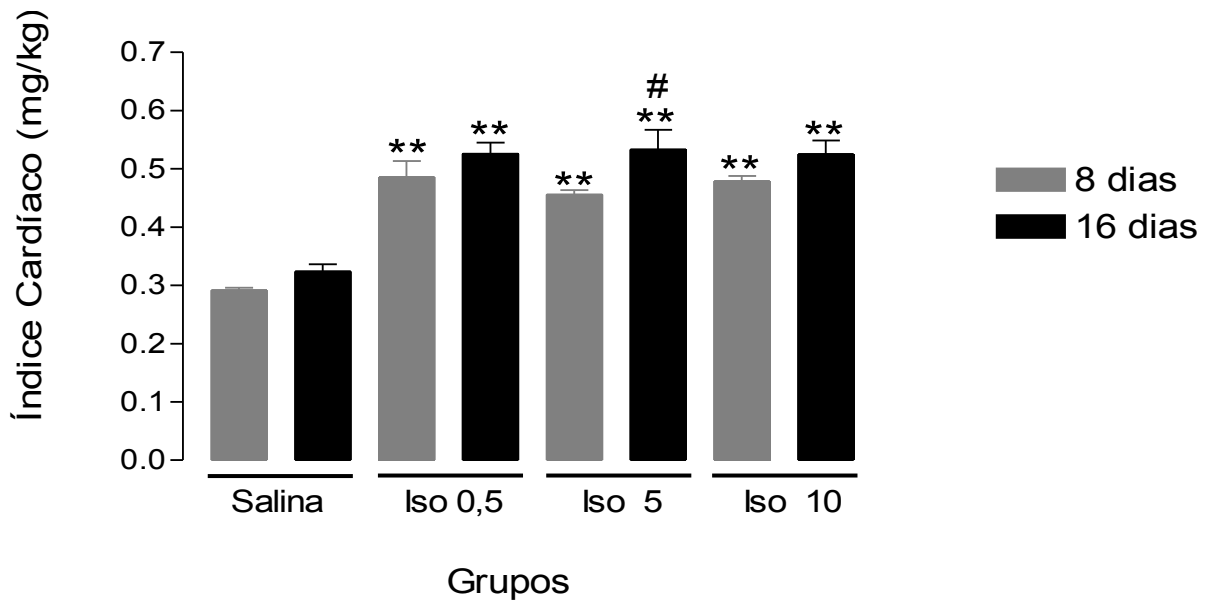


Figura 10: Comparação do índice cardíaco (mg/kg) dos diferentes grupos tratados com isoproterenol durante 8 ou 16 dias. ** $p < 0,01$ vs seu controle; # $p < 0,01$ Iso 5. A vs Iso 5.B.

Como observa-se na figura 11, apenas a dose 5 mg/kg apresentou aumento significativo do índice hepático (IH = peso do fígado/peso corporal) quando comparado ao controle. Ao passo que no índice pulmonar (IP = peso do pulmão / peso corporal), não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos tratados com isoproterenol, nos seus respectivos tempos (Figura 12).

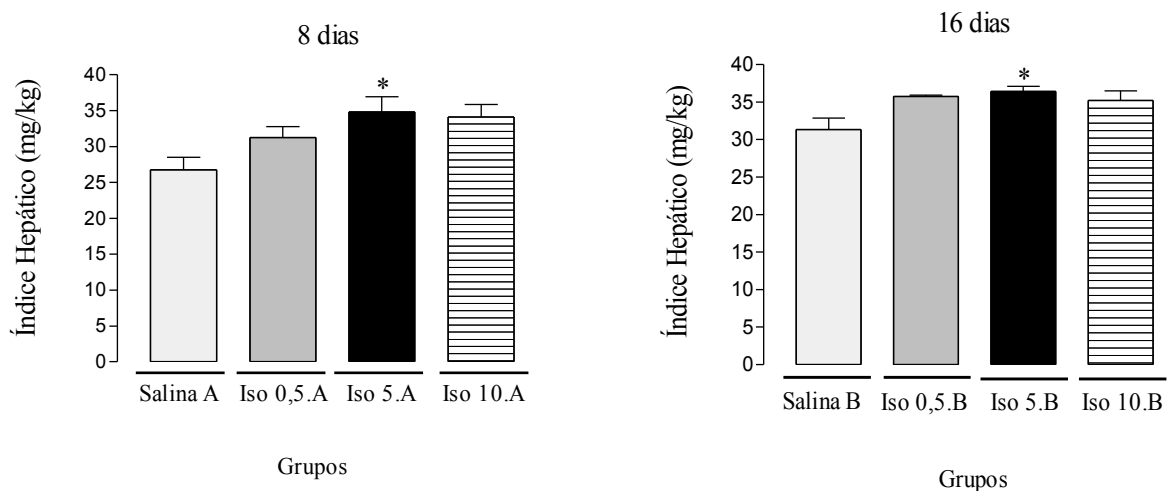


Figura 11: Índice Hepático dos diferentes grupos tratados com isoproterenol durante 8 ou 16 dias. * $p < 0,05$ Iso 5 vs salina.

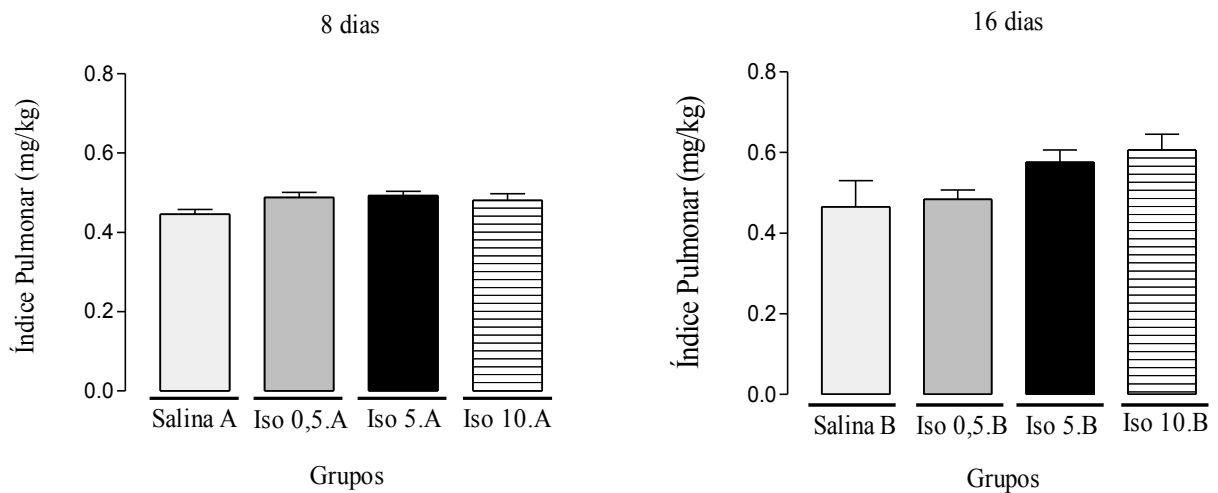


Figura 12: Índice Pulmonar dos diferentes grupos tratados com isoproterenol durante 8 ou 16 dias, $p > 0,05$.

No tempo de 8 dias a mortalidade foi de 0% para os grupos Iso 0,5.A, Iso 5.A e de 10 % para o grupo Iso 10.A. Já no tempo de 16 dias, a mortalidade foi de 0 % para o grupo de Iso 0,5.B, 20% para o Iso 5.B e 40% Iso 10.B. Para este modelo de hipertrofia cardíaca, a mortalidade foi considerada baixa (ROMAIN et al., 2004).

5.1.2 Registro Eletrocardiográfico (ECG)

Curiosamente, os grupos Iso 0,5.A, Iso 5.A, Iso 10.A não apresentaram aumento significativo do índice do complexo QRS quando comparados ao controle ($1,13 \pm 0,11$; $1,08 \pm 0,16$; $1,19 \pm 0,18$ vs $1,09 \pm 0,04$ mV, $p > 0,05$) respectivamente (Figura 13). No entanto, no tempo de 16 dias, o ECG revelou aumento do índice do complexo QRS nos grupos Iso 5-B e Iso 10-B ($1,77 \pm 0,12$ e $1,69 \pm 0,09$ vs $1,12 \pm 0,09$ mV, $p < 0,05$) e diminuição do Δ QRS somente no Iso 10.B ($\sim 2,0 \pm 0,08$ vs $70 \pm 4,0$ graus, $P < 0,05$) em relação ao controle, respectivamente (Figura 14).

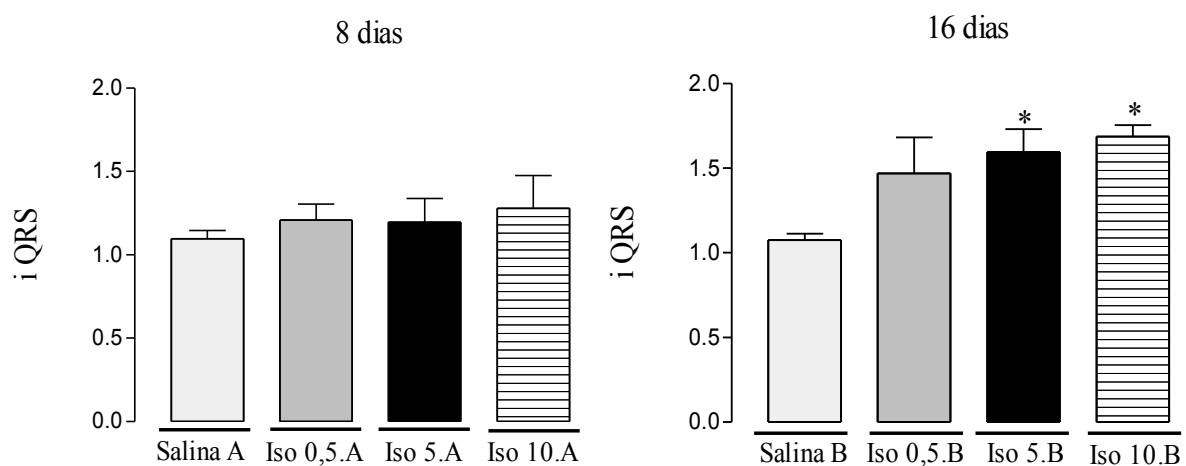


Figura 13: Índice do complexo QRS (iQRS) dos diferentes grupos tratados com isoproterenol no tempo de 8 ou 16 dias. * $p < 0,05$ Iso B vs seu controle.

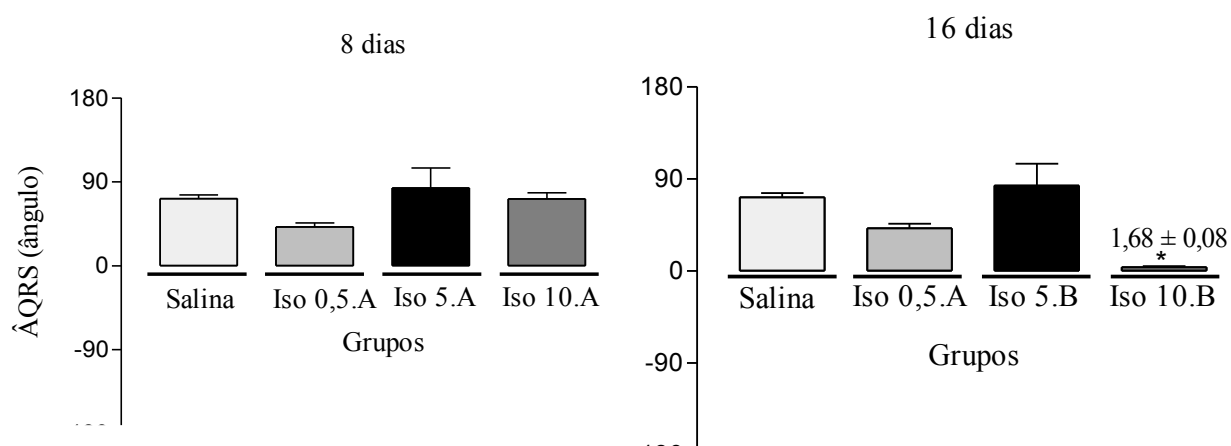


Figura 14: Vetor médio de despolarização ventricular ($\hat{A}QRS$) dos diferentes grupos tratados com isoproterenol durante 8 ou 16 dias de tratamento. * $p < 0,05$ vs seu controle.

Todos os grupos tratados com isoproterenol exibiram elevada frequência de onda S nas derivações bipolares em relação aos controles ($p < 0,05$) em ambos os tempos (Tabela 1). Em relação a onda p $> 0,1$ mv, não houve diferença estatística entre os grupos tratados com Iso e seus respectivos controles. Estatisticamente, todos os grupos apresentaram a mesma amplitude da onda P nas diferentes doses e diferentes tempos.

Grupos	Parâmetros	
	Onda S	Infradesnívelamento ST
Salina A	0/10	0/10
Iso 0,5.A	8/10*	6/10*
Iso 5.A	8/10*	6/10*
Iso 10.A	8/9*	6/9*
Salina B	0/10	0/10
Iso 0,5.B	8/10*	6/10*
Iso 5.B	8/8 *	7/8*
Iso 10.B	6/6 *	4/6*

Tabela 1: Parâmetros avaliados nos diferentes grupos tratados com isoproterenol em seus diferentes tempos de tratamento (8 ou 16 dias). * $p < 0,05$ vs seu controle. Numero de animais com parâmetro positivo/ Numero total de animais avaliados.

Todos os grupos tratados com isoproterenol apresentaram um infradesnvelamento do segmento ST (Tabela 1).

5.1.3. Ecocardiograma (ECO)

A avaliação da função sistólica ventricular foi feita pela análise da fração de encurtamento (Figura 15). O grupo Iso 10.A ($p < 0,01$) e os grupos Iso 5.B e Iso 10.B apresentaram um aumento da fração de encurtamento em relação aos seus respectivos controles ($P < 0,05$). Tabelas 2 e 3.

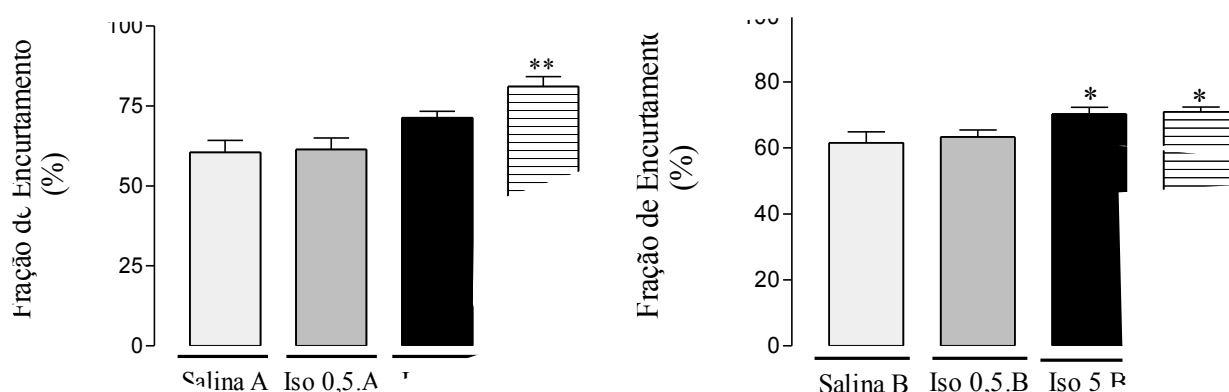


Figura 15: Fração de encurtamento dos diferentes grupos tratados com isoproterenol em seus respectivos tempos. ** $p < 0,01$ – Iso 10.A vs seu controle; * $p < 0,05$ – Iso.B vs seu controle;

Ao avaliarmos o diâmetro diastólico final (DDF) não observamos diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$), Tabela 2. Ao passo que os grupos Iso 5.A, Iso 10.A, Iso 0,5.B, Iso 5.B e Iso 10.B apresentaram diminuição significativa no diâmetro sistólico final quando comparados ao controle.

Na avaliação da função diastólica, a onda E indica o maior valor da velocidade de fluxo inicial do enchimento ventricular e a onda A o maior valor da velocidade de fluxo telediastólico mitral. A relação E/A é a relação entre a velocidade máxima da onda E e a velocidade máxima da onda A. No presente trabalho, não houve diferença significativa na relação E/A ($p > 0,05$).

Em relação à frequência cardíaca, os grupos Iso 5.A e Iso 10. A apresentaram aumento significativo da frequência cardíaca quando comparado ao controle ($299,6 \pm 12,09$; $317,8 \pm 9,184$ vs $209,5 \pm 10,30$). No 16º dia de tratamento, não houve diferença significativa entre os grupos tratados com isoproterenol ($p > 0,05$).

No presente trabalho, o modelo de hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol não apresentou alterações funcionais cardíacas importantes avaliadas pelo ecocardiograma.

Parâmetros	Salina 0,9 %	Iso 0,5.A	Iso 5.A	Iso 10.A
FC (bpm)	209,5 ± 10,30	216,6 ± 13,04	299,6 ± 12,09 ^{**+}	317,8 ± 9,184 ^{**&}
DDF (cm)	0,67 ± 0,011	0,61 ± 0,018	0,66 ± 0,021	0,68 ± 0,023
DSF (cm)	0,26 ± 0,022	0,23 ± 0,021	0,19 ± 0,015*	0,13 ± 0,021 ^{**&}
FE (%)	60,39 ± 2,75	61,42 ± 2,43 [#]	71,4 ± 1,32 ^{**#}	81,1 ± 2,05 ^{**&}
E/A	1,90 ± 0,48	1,76 ± 0,21	1,76 ± 0,29	1,47 ± 0,11

Tabela 2: Parâmetros avaliados nos estudos ecocardiográficos dos diferentes grupos tratados com isoproterenol durante 8 dias de tratamento. ** p < 0.01 vs seu controle ; * p < 0,05 vs seu controle; + P < 0,01 Iso 5.A vs Iso 0,5.A ; & p < 0,01- Iso 10.A vs Iso 0,5. A; # - p < 0,05- Iso 5.A vs Iso 0,5.A ; ## - p < 0,05- Iso 5.A VS Iso 10.A. FC- frequência cardíaca; DDF- diâmetro diastólico final; DSF- diâmetro sistólico final; FE – fração de encurtamento; E/A – relação onda E/onda A.

Parâmetros	Salina 0,9 %	Iso 0,5.B	Iso 5.B	Iso 10.B
FC (bpm)	208,2 ± 9,25	204,5 ± 13,16	201,0 ± 14,05	209,7 ± 8,10
DDF (cm)	0,68 ± 0,04	0,578 ± 0,03	0,66 ± 0,005	0,66 ± 0,027
DSF (cm)	0,24 ± 0,05	0,188 ± 0,01 [#]	0,165 ± 0,005*	0,185 ± 0,023*
FE (%)	61,63 ± 3,28	63,40 ± 2,11 ^{**}	70,33 ± 2,02*	71,00 ± 1,47*
E/A	1,88 ± 0,34	1,74 ± 0,21	1,72 ± 0,29	1,51 ± 0,11

Tabela 3: Parâmetros avaliados nos estudos ecocardiográficos dos diferentes grupos tratados com isoproterenol durante 16 dias. * p < 0,05 vs seu controle ; # p < 0,05 Iso 10.B vs Iso 0,5.B; # - p < 0,01 vs seu controle. FC – frequência cardíaca; DDF- diâmetro diastólico final; DSF- diâmetro sistólico final; FE- fração de encurtamento; E/A – relação onda E/ onda A.

5.1.4 Análise Histológica

Nas áreas próximas ao endocárdio, observou-se proliferação das células do tecido conjuntivo, predominantemente fibroblastos acompanhada de inflamação mononuclear intersticial, necrose individual de cardiomiócitos e/ou grupos de cardiomiócitos e presença de células com núcleo aumentado de volume aspecto vacuolizado com evidenciação do nucléolo (miócitos bizarros). Pela coloração de Masson, observou-se extensas áreas de fibrose em todos os grupos e em todos os tempos tratados com isoproterenol, sendo caracterizada por

uma distribuição irregular subendocárdica, predominantemente no ventrículo esquerdo e septo interventricular e, ocasionalmente, no ventrículo direito. Figura 16.

Corroborando os resultados do índice cardíaco, os grupos Iso 0,5, Iso 5 e Iso 10, apresentaram aumento significativo do diâmetro dos cardiomiócitos em relação ao controle tanto no 8^o ($227,6 \pm 2,57$; $215,5 \pm 3,7$; $228,8 \pm 4,2$, vs $173,2 \pm 3,4$, $P < 0,01$, pixels) como no 16^o dia de tratamento ($228,1 \pm 3,2$; $232,5 \pm 3,1$; $234,9 \pm 3,8$ vs. $170,2 \pm 2,6$), respectivamente (Figura 17). Quando se compara os diferentes tempos, verifica-se diferença significativa somente na dose de 5 mg/kg, assim como foi observado no índice cardíaco.

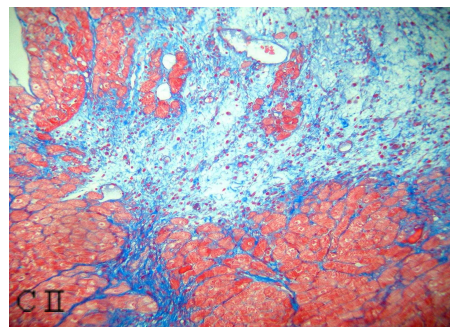
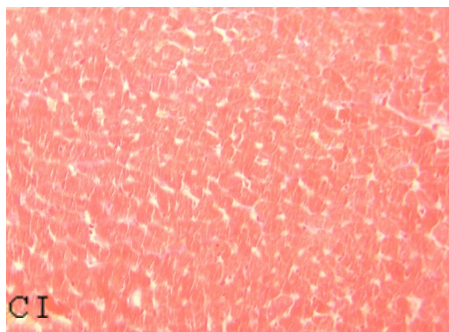
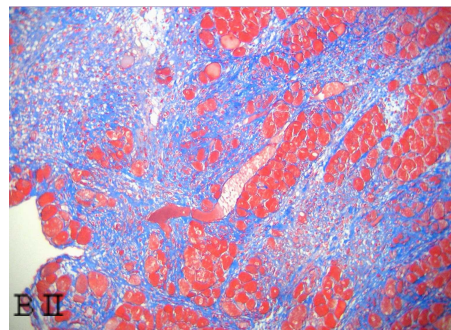
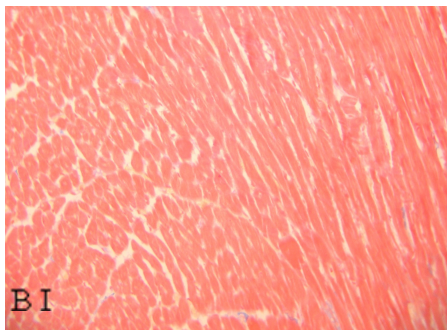
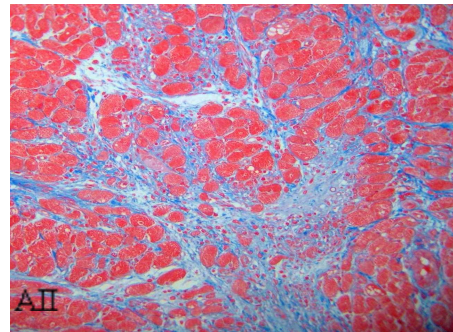
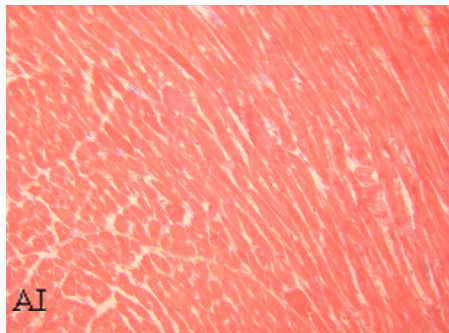


Fig 16: Corte histológico cardíaco demonstrando fibrose subendocárdica do ventrículo esquerdo. AI – Salina 0,9%, A II-Iso 5.A, B I- salina 0,9%, B II- Iso 5.B, C I- Salina 0,9%, C II- Iso 10.A. Objetiva 20, coloração Masson.

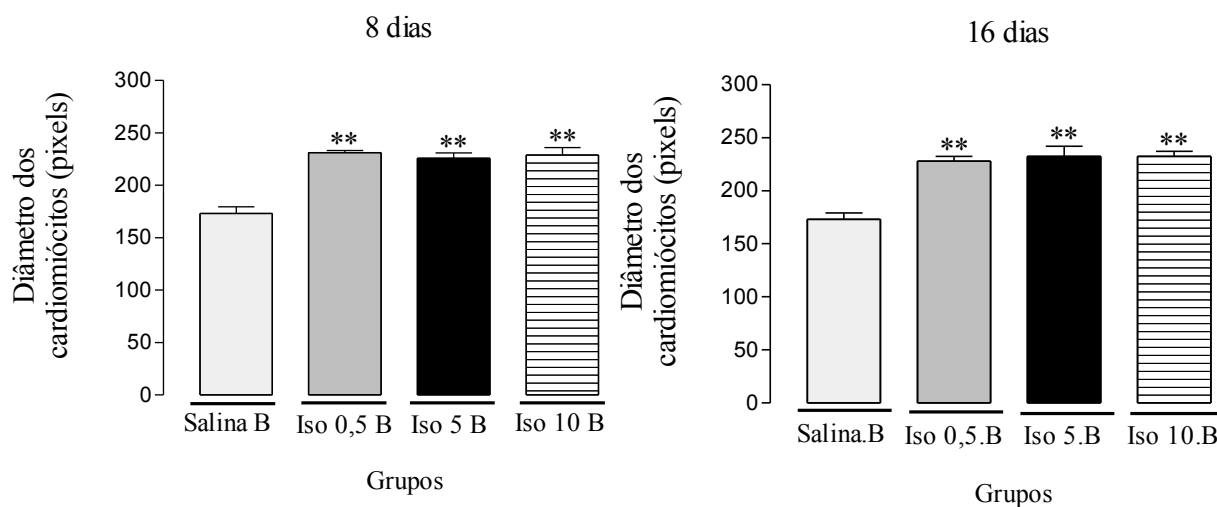


Figura 17: Diâmetro dos cardiomiócitos dos diferentes grupos tratados com isoproterenol nos seus respectivos tempos. ** $p < 0,01$ vs seu controle

Em relação ao percentual de fibrose, todos os grupos tratados com isoproterenol, Iso 0,5, Iso 5 e Iso 10 apresentaram aumento significativo da fibrose quando comparado ao controle salina (Figura 18).

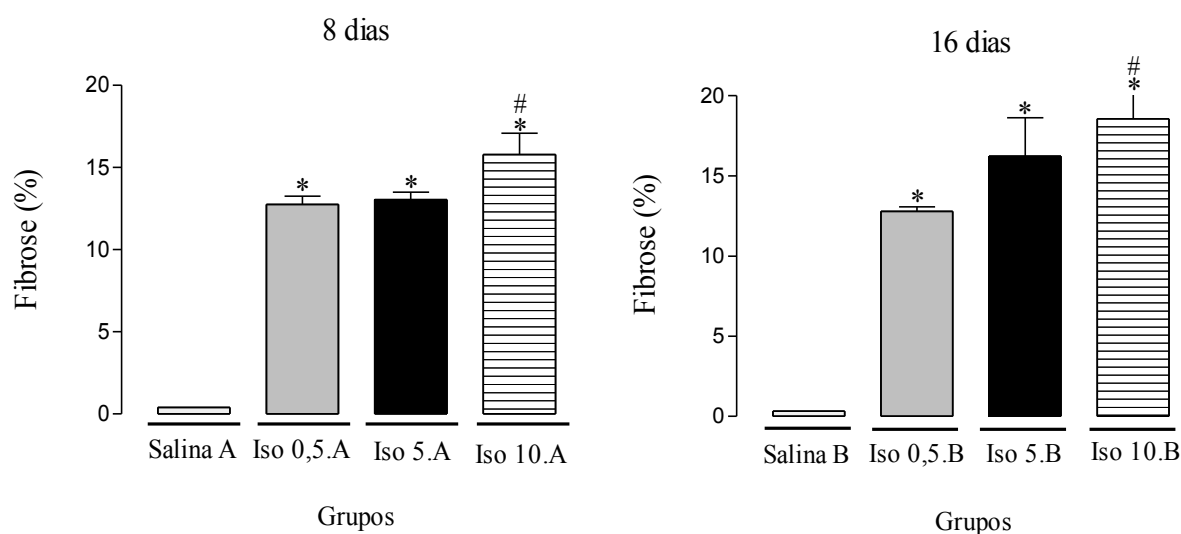


Figura 18: Percentual de Fibrose nos diferentes grupos tratados com isoproterenol no tempo de 8 ou 16 dias.* $p < 0,01$ - Iso vs seu controle; # $p < 0,05$ Iso10 vs Iso 0,5.

5.2 Segunda Etapa

5.2.1 Avaliação indireta do sucesso da ovariectomia

Os grupos repostos com estrógeno apresentaram um maior índice uterino quando comparado aos grupos não repostos. Os grupos tratados com a maior dose de estrógeno apresentaram um maior índice uterino quando comparados aos grupos repostos com a menor dose (Figura 19).

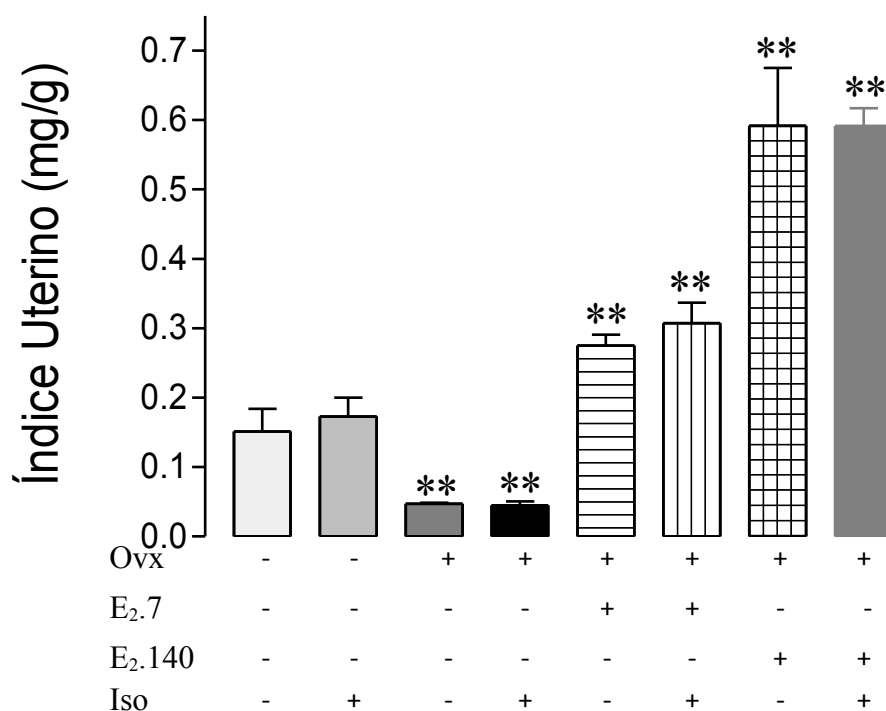


Figura 19: Índice Uterino (mg/g) dos diferentes grupos tratados com isoproterenol e/ou estrógeno.** $p < 0,01$ vs seu respectivo controle.

5.2.2 Avaliação indireta da insuficiência cardíaca

Dezesseis dias após o tratamento, os grupos Sham+Iso, Ovx+Iso, Ovx+E₂.7+Iso, Ovx+E₂.140+Iso apresentaram aumento significativo do índice cardíaco quando comparados aos controles Sham+salina, Ovx+salina, Ovx+E₂.7, Ovx+E₂.140, respectivamente (Figura 20). O grupo Ovx+E₂.140+Iso apresentou aumento significativo do IC quando comparado ao Ovx+Iso.

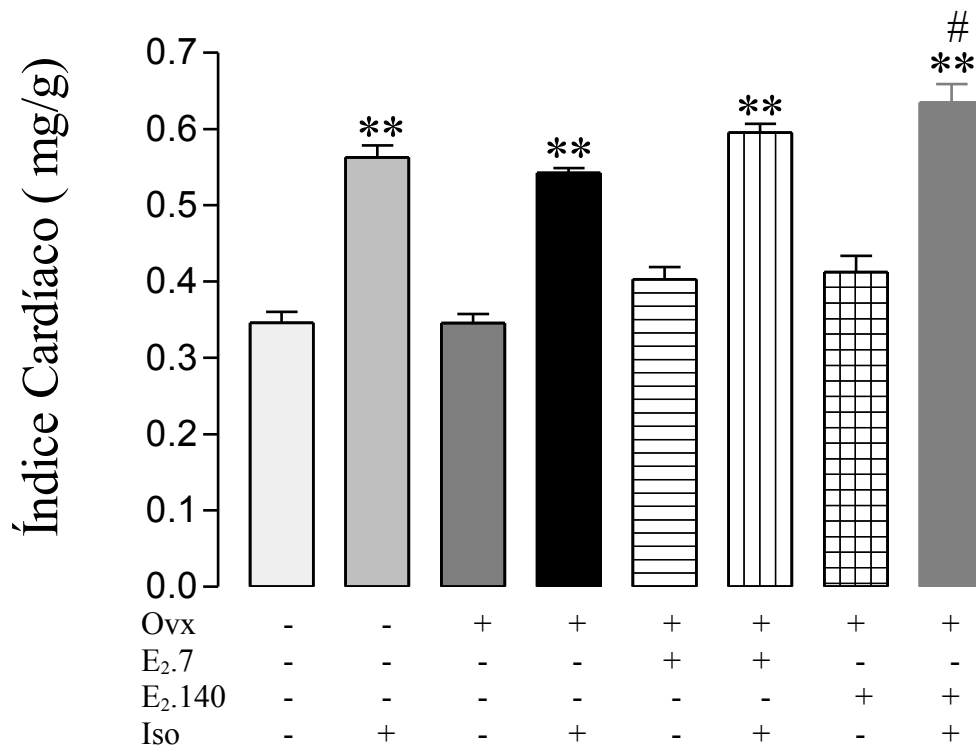


Figura 20: Índice Cardíaco (mg/g) dos diferentes grupos tratados com isoproterenol e/ou estrógeno. ** $p < 0,05$ vs seu respectivo controle; # $p < 0,05$ Ovx + E_{2.140} vs Ovx + Iso.

Em relação ao índice hepático, somente os grupos Sham +Iso e Ovx+Iso apresentaram um aumento significativo em relação aos seus respectivos controles Sham+salina e Ovx+salina ($p < 0,01$). Parece que o próprio estrógeno apresenta efeito hepatotrófico. No índice pulmonar (Figura 22) não houve diferença significativa entre os grupos.

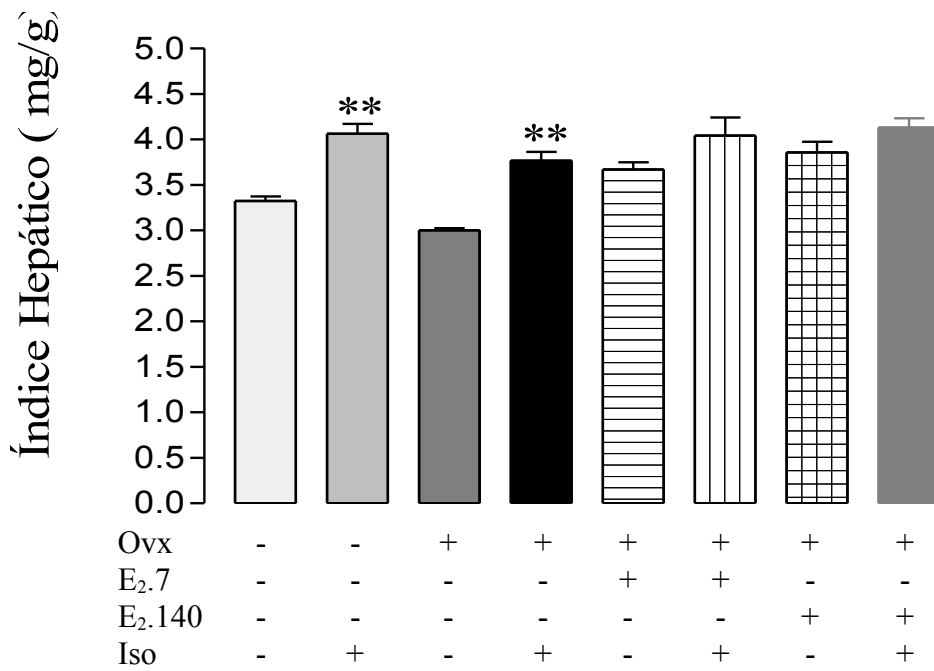


Figura 21: Índice Hepático (mg/g) dos diferentes grupos tratados com isoproterenol e/ou estrógeno. ** $p < 0,01$ vs seu respectivo controle.

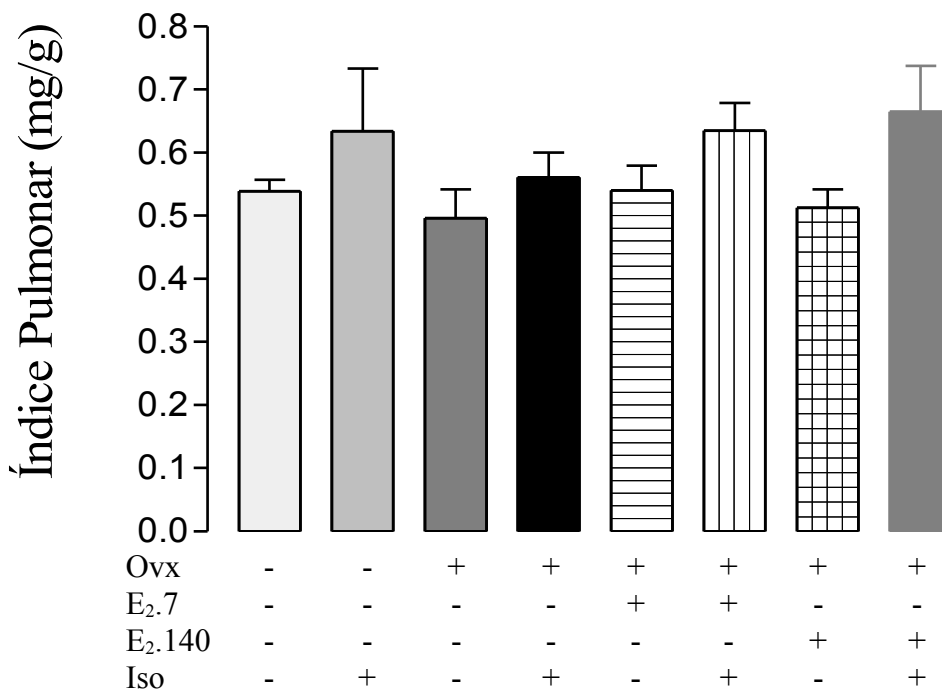


Figura 22: Índice Pulmonar (mg/g) dos diferentes grupos tratados com isoproterenol e/ou estrógeno durante 16 dias, $p > 0,05$.

5.2.3 Registro eletrocardiográfico

No final do tratamento, os animais tratados com isoproterenol (Sham+Iso, Ovx+Iso, Ovx+E₂.7+Iso, Ovx +E₂.140+Iso) apresentaram aumento significativo da amplitude do complexo QRS quando comparado ao seus respectivos controles (Sham+salina, Ovx+ salina, Ovx+E₂.7, Ovx+E₂.140), sugerindo aumento da massa ventricular (Figura 23). Curiosamente, ao contrário do índice cardíaco, não houve diferença estatística entre a amplitude do complexo QRS do Ovx +E₂.140+Iso e Ovx+Iso.

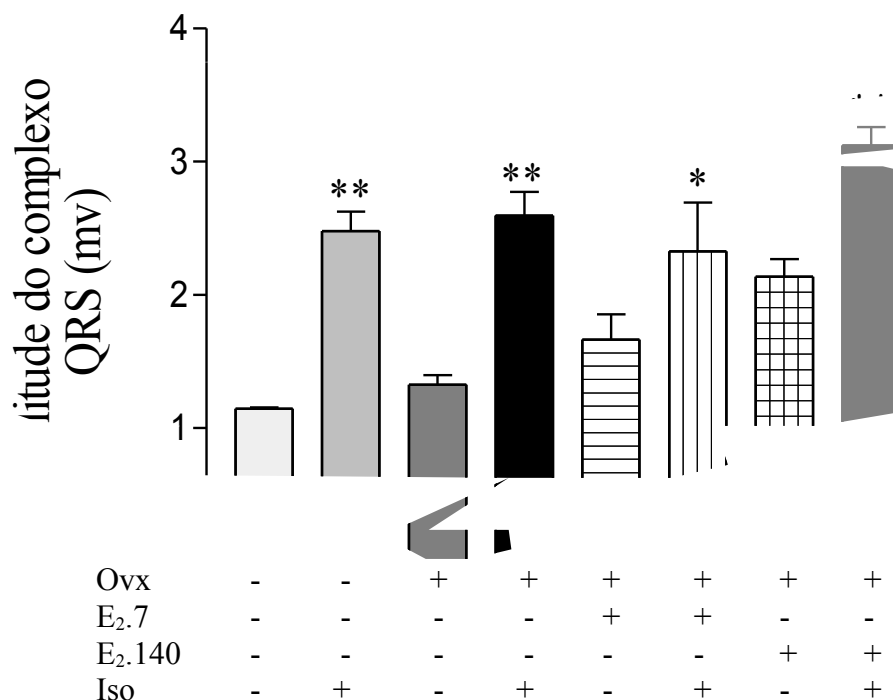


Figura 23: Amplitude do complexo QRS (v) dos diferentes grupos tratados com isoproterenol e/ou estrógeno durante 16 dias. * p < 0,05 vs seu controle ; ** p < 0,01 vs seu controle.

Em relação a frequência cardíaca e a duração do complexo QRS não houve diferença significativa entres os grupos (p > 0,05).

Grupos	Intervalo PQ (ms)	Intervalo QT _c (ms)	Amplitude QRS (mv)
Sham+Salina	0,044 ± 0,005	0,107 ± 0,007	1,178 ± 0,003
Sham +Iso	0,047 ± 0,006	0,140 ± 0,006*	2,48 ± 0,004**
Ovx +Salina	0,047 ± 0,016	0,111 ± 0,017	1,324 ± 0,007
Ovx +Iso	0,047 ± 0,006	0,136 ± 0,006 [#]	2,599 ± 0,017**
Ovx +E ₂ .7	0,036 ± 0,002	0,140 ± 0,002	1,673 ± 0,019
Ovx+Iso+E ₂ .7	0,049 ± 0,004	0,153 ± 0,004	2,328 ± 0,036*
Ovx +E ₂ .140	0,043 ± 0,007	0,134 ± 0,007	2,139 ± 0,012
Ovx+Iso+E ₂ .140	0,061 ± 0,015 [#]	0,161 ± 0,016 [#]	3,124 ± 0,013**

Tabela 4: Parâmetros avaliados nos diferentes grupos tratados com isoproterenol e/ou estrógeno durante 16 dias de tratamento. * $p < 0.05$ vs seu controle. # $p < 0.05$ – Ovx +Iso vs Ovx +E₂.140+Iso e Ovx+ E₂.140 e Ovx+Iso+E₂.140; ** $p < 0.01$ vs seu controle; QT_c–intervalo QT corrigido pela fórmula de Bazzet.

Grupos	FC (BPM)	Duração QRS (ms)
Sham+Salina	345,7 ± 4,15	0,024 ± 0,002
Sham +Iso	339,3 ± 4,71	0,034 ± 0,003
Ovx +Salina	335,5 ± 3,18	0,027 ± 0,003
Ovx +Iso	343,7 ± 7,29	0,026 ± 0,002
Ovx +E ₂ .7	321,0 ± 6,38	0,023 ± 0,003
Ovx+E ₂ .7+Iso	316,8 ± 8,60	0,093 ± 0,063
Ovx +E ₂ .140	344,3 ± 3,17	0,027 ± 0,003
Ovx+E ₂ .140+Iso	341,3 ± 4,16	0,029 ± 0,002

Tabela 5: Parâmetros avaliados nos diferentes grupos tratados com isoproterenol e/ou estrógeno durante 16 dias. $P > 0,05$.

Como se observa na Tabela 4, o grupo Ovx+E₂.140+Iso apresentou um prolongamento do intervalo QT quando comparado com Ovx +E₂.140 e Ovx+Iso.

A Figura 24 mostra aumento significativo da amplitude da onda P em todos os grupos tratados com isoproterenol quando comparados aos seus respectivos controles, exceto o grupo Ovx +E₂.7+Iso.

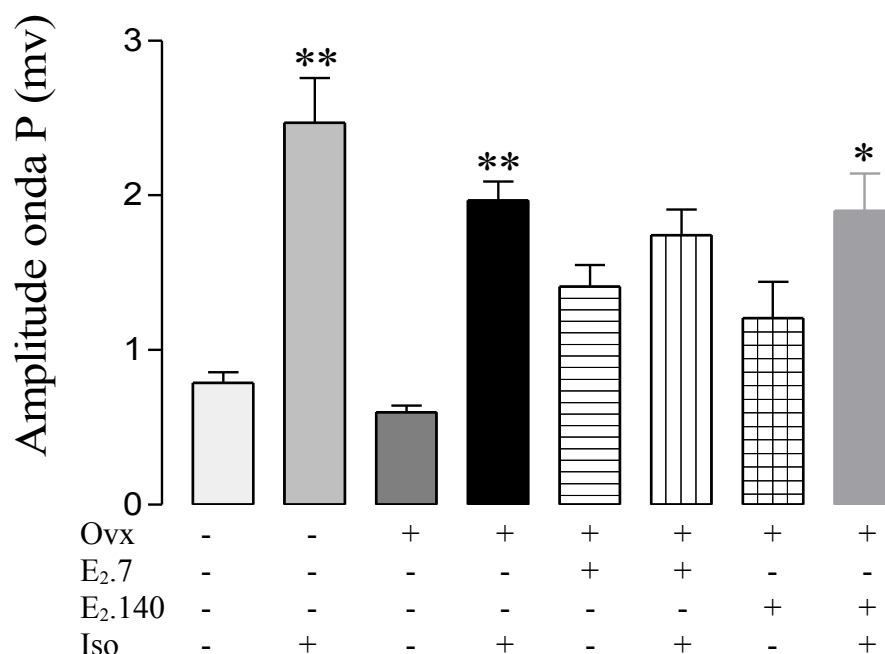


Figura 24: Amplitude da onda P nos diferentes grupos tratados com isoproterenol e/ou estrógeno durante 16 dias. ** $p < 0,001$ vs seu controle ; * $p < 0,05$ vs seu controle.

A mortalidade foi de 30% (3/10) no grupo Sham+Iso, 40% (4/10) no Ovx+Iso, 30% (3/10) no Ovx+Iso+E₂.140 e 10 % no Ovx+Iso+E₂.7 (1/10).

5.2.4 Análise Histológica

Nos grupos tratados com Iso observou-se na região subendocárdica, proliferação das células do tecido conjuntivo, predominantemente fibroblastos acompanhada de inflamação mononuclear intersticial, necrose individual de cardiomiócitos e/ou grupos de cardiomiócitos e presença de células com núcleo aumentado de volume, com aspecto vacuolizado e evidencição do nucléolo (miócitos bizarros). Pela coloração de Masson, observou-se extensas áreas de fibrose nos grupos tratados com isoproterenol, sendo caracterizada por uma distribuição irregular subendocárdica (Figura 26), predominantemente no ventrículo esquerdo e septo interventricular e, ocasionalmente, no ventrículo direito.

Em relação a fibrose, todos os grupos tratados com isoproterenol, Sham+Iso, Ovx+Iso, Ovx+E₂.7+Iso e Ovx+E₂.140+Iso apresentaram aumento na porcentagem de fibrose ($19,61 \pm 0,64$; $20,90 \pm 1,98$; $23,92 \pm 1,48$; $22,76 \pm 3,57$ %, $p < 0,05$) quando comparados com seus respectivos controles Sham+Salina, Ovx+Salina, Ovx+E₂.7 e Ovx+E₂.140 ($0,40 \pm 0,24$; $0,31 \pm 0,20$; $0,32 \pm 0,21$; $0,31 \pm 0,19$ %, $p > 0,05$), respectivamente, (Figura 25). Não houve diferença significativa entre os grupos tratados com estrógeno Ovx+E₂.7+Iso e Ovx+Iso+ E₂.140 ($23,92 \pm 1,48$; $22,76 \pm 3,57$ %, $p > 0,05$) quando comparados ao grupo Ovx+Iso ($20,90 \pm 1,98$ %, $p > 0,05$).

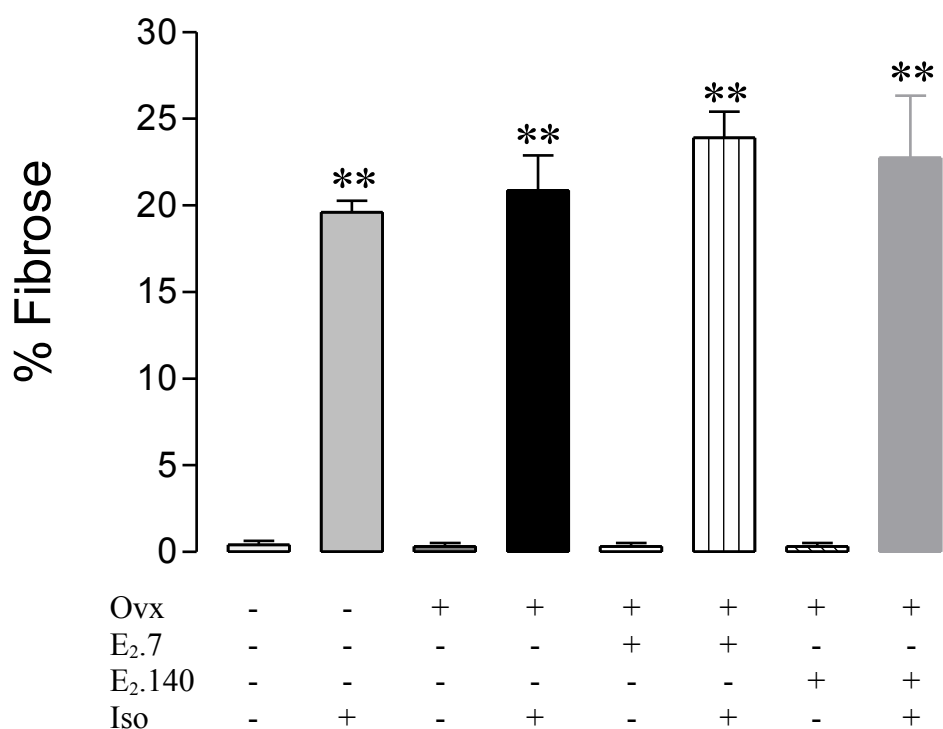


Figura 25: Porcentagem de fibrose dos diferentes grupos tratados com estrógeno e/ou isoproterenol durante 16 dias de tratamento. ** $p < 0,01$ vs seu controle.

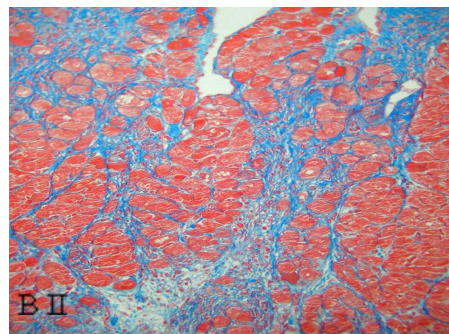
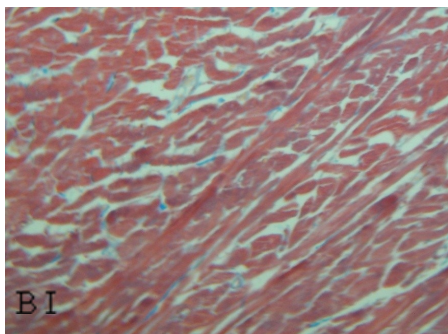
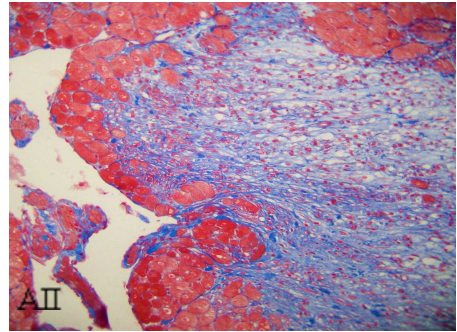
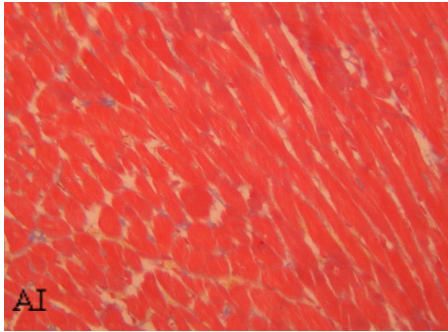


Figura 26: Corte histológico cardíaco demonstrando a fibrose no ventrículo esquerdo. A I- Ovx + E₂.7 A II - Ovx+E₂.7+Iso, B I – Ovx + E₂.140, B II – Ovx + E₂.140 + Iso.

Corroborando os resultados do índice cardíaco, os grupos Sham+Iso, Ovx+Iso, Ovx+E₂.7+Iso e Ovx+E₂.140+Iso apresentaram aumento significativo do diâmetro dos cardiomiócitos em relação aos seus respectivos controles Sham+ salina, Ovx + salina, Ovx+E₂.7 e Ovx+ E₂.140 (199,3 ± 3,97; 178,4 ± 1,36 ; 183,7 ± 3,45; 203,7 ± 3,09 vs 149,8 ± 5,64 ; 151,4 ± 5,79 ; 153,2 ± 5,61; 139,8 ± 4,36), (Figura 27). Assim como ocorreu no índice cardíaco, o grupo Ovx+E₂.140+Iso apresentou aumento adicional do diâmetro dos cardiomiócitos quando comparado ao grupo Ovx + Iso (p < 0,05).

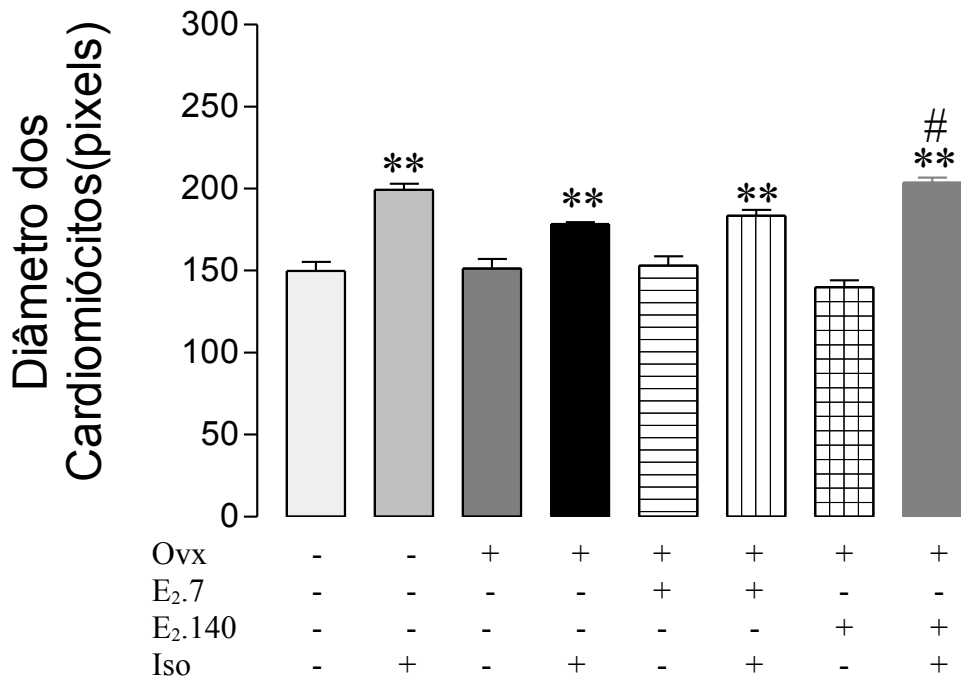


Figura 27: Diâmetro dos cardiomiócitos (pixels) dos diferentes grupos tratados com Isoproterenol e/ou estrógeno durante 16 dias de tratamento. # p < 0,05- Ovx + Iso+ E₂.140 vs Ovx +Iso; ** p < 0,01 vs seu controle.

6. DISCUSSÃO

6.1 Primeira etapa

A administração do agonista β -adrenérgico, isoproterenol, em baixas doses, por um período de 8 e 16 dias, resultou em hipertrofia miocárdica, necrose dos cardiomiócitos e fibrose caracterizada por uma localização subendocárdica predominantemente no ventrículo esquerdo, achados semelhantes ao encontrado por Rona et al. (1963). A hipertrofia miocárdica induzida pelo isoproterenol, é bem descrita na literatura. (ZIERHUT & ZIMMER, 1989; VASSALLO, et al., 1988; BROWN et al., 1992; PEREIRA, et al., 1993; OLIVEIRA, et al., 1999, KRENEK, et al., 2006).

Considerando o índice cardíaco como uma medida indireta da hipertrofia, os grupos tratados com diferentes doses de isoproterenol (0,5; 5 ;10 mg/kg) apresentaram o mesmo grau de hipertrofia cardíaca nos seus respectivos tempos. Quando comparamos os diferentes tempos, houve aumento do índice cardíaco no tempo de 16 dias, nos grupos Iso 5 e Iso 10. A hipertrofia cardíaca induzida pelo Isoproterenol, na dose e no tempo utilizado, não foi dose dependente, entretanto, parece ser dependente do tempo. O estudo realizado por Benjamin et al. (1989), mostrou que diferentes doses de isoproterenol (125; 250; 500; 1; 2,5; 5 / μ g/kg, s.c., durante 10 dias) não resultou em diferentes níveis de hipertrofia cardíaca, esta não foi dose dependente, corroborando os nossos resultados. Do mesmo modo, Teerlink et al. (1994), demonstraram que a hipertrofia miocárdica induzida pelo isoproterenol nas doses de 85, 170 e 340 mg/kg, s.c., com duas injeções com intervalo de 24 horas, após 2, 6 e 16 semanas do tratamento, não foi dose-dependente.

Em nosso estudo, o grupo tratado com a menor dose de Iso durante 8 dias não apresentou alterações funcionais cardíacas significativas corroborando com os resultados de Takeshita et al.(2008) , os quais utilizaram uma dose de 1.2 mg/kg/dia durante 3 e 7 dias e não observaram alterações funcionais cardíacas importantes. Este mesmo trabalho demonstrou que não houve diferença na hipertrofia nos animais tratados com a dose de 1.2 mg/kg/dia durante 3, 7 ou 14 dias, semelhante ao que ocorreu em nosso estudo na dose mais baixa. Em nosso estudo, quando utilizamos uma dose maior (5mg/kg/ dia), houve diferença na relação IC entre os tempos de 8 e 16 dias de tratamento. Provavelmente, ao se utilizar uma dose de isoproterenol maior, o tempo de administração parece ser mais importante que a dose.

Corroborando os resultados do índice cardíaco, os grupos tratados com isoproterenol apresentaram aumento do diâmetro dos cardiomiócitos, confirmando a hipertrofia dessas células. Em nosso estudo, o Iso na dose e tempo utilizados, não causou insuficiência cardíaca congestiva, assim como o estudo realizado por Teerlink et al. (1994). Por outro lado, estudo realizado por Grimm e colaboradores (1998) demonstrou que alta dose de isoproterenol em uma única administração levou a insuficiência cardíaca leve. Estudo realizado por Yeager e colaboradores (1981), revelou que a injeção subcutânea de iso na dose de 2,5 ou 250 mg/kg resultou insuficiência cardíaca, hipotensão e taquicardia dose dependentes.

O isoproterenol causa hipertrofia miocárdica por ação direta nos receptores beta adrenérgicos e pelo estímulo na produção de renina e angiotensina II, desencadeando processo hipertrófico miocárdico, através de estimulação dos receptores para angiotensina II (AT1), modulados pela proteína G que, via fosfolipase C (BRISTOW, et al., 1989; NAGANO, et al., 1992), ativa a proteína quinase C. Outro mecanismo possível de hipertrofia induzida pelo isoproterenol seria secundário à ação inotrópica e cronotrópica positivas sobre o coração. É conhecido que o estiramento das fibras cardíacas desencadeia o processo hipertrófico via adenilciclase e AMPc, estimulando a expressão de protooncogenes (TARAZI, et al., 1982). Ocorre a ativação dos receptores beta- adrenérgicos resultando em aumento do AMPc

intracelular, ocorrendo assim aumento da proteína quinase A (PKA). Esta em resposta a estimulação beta – adrenérgica, influencia diretamente a contração dos cardiomiócitos alterando os canais de cálcio tipo L no sarcolema, o receptor de rianodina e a fosfolambam no retículo sarcoplasmático. A fosforilação da fosfolambam leva aumento da atividade da SERCA do retículo sarcoplasmático e conseqüentemente uma acelerada acumulação de cálcio no retículo sarcoplasmático (TAKESHITA, et al., 2008).

A análise eletrocardiográfica revelou um resultado bastante interessante. Os grupos Iso 0,5.A, Iso 5.A e Iso 10.A, apesar de terem apresentado hipertrofia avaliado pelo índice cardíaco e confirmado pelo aumento no diâmetro dos cardiomiócitos na histologia, não apresentaram aumento do índice QRS . Por outro lado, no tempo de 16 dias, este resultado só se repetiu no grupo que recebeu a dose de 0,5mg/kg. Curiosamente, somente os grupos Iso 5. B e Iso 10.B apresentaram aumento significativo do índice QRS. Neste trabalho o eletrocardiograma mostrou-se útil em detectar a hipertrofia cardíaca no tempo de 16 dias, entretanto exibiu resultados falso-negativos em virtude do tempo de avaliação e/ou dose utilizada.

O diagnóstico da hipertrofia ventricular pelo eletrocardiograma é baseado no aumento da amplitude do complexo QRS, da duração do intervalo QT e em mudanças na onda T. (YAN & ANTZELEVITCHY, 1998; GIMA & RUD , 2002; KOHUTOVA, et al., 2006). Entretanto, este método de diagnóstico apresenta falso-negativos e baixa sensibilidade (ROMHILT & ESTES, 1968; REICHEK, et al., 1981). Bacharova et al., (2004), demonstraram que o aumento da massa do ventrículo esquerdo não esta associado com aumento da amplitude do complexo QRS. Estudo demonstrou redução da conexina 43 em ratos espontaneamente hipertensos quando comparados ao controle, sugerindo que os diferentes achados entre a amplitude do complexo QRS e o aumento da massa ventricular esquerda possa ser causado pelo remodelamento elétrico (BACHAROVA, et al., 2008). Portanto, baseado em nossos resultados, recomenda-se cautela no diagnóstico de hipertrofia ventricular baseado no ECG.

Em relação ao vetor médio de despolarização ventricular, o grupo Iso 10.B apresentou diminuição neste parâmetro, embora permanecendo dentro da normalidade para a espécie (0° – 90°) (MIRANDA, 2004; OLIVARES, 2006). Os grupos tratados com isoproterenol exibiram elevada freqüência da onda S nas derivações bipolares e presença de infradesnivelamento do segmento ST, em ambos os tempos. Estes resultados são similares ao estudo realizado por Kralova et al. (2008) os quais utilizaram a dose de 5 mg/kg/dia, s.c , de isoproterenol e observaram aumento do intervalo QT, do complexo QRS, presença de onda S e de infradesnivelamento do segmento ST, este provavelmente relacionado à isquemia subendocárdica e à necrose.

Apenas os animais tratados com isoproterenol durante 8 dias (Iso 5.A e Iso 10.A) apresentaram aumento da freqüência cardíaca em relação ao controle, corroborando os resultados do Bestetti et al. (1987). Entretanto os grupos tratados com isoproterenol durante 16 dias não apresentaram um aumento na freqüência cardíaca. Acredita-se que esta possa não ter aumentado em decorrência da própria hipertrofia, o que em decorrência do aumento da massa miocárdica, aumenta o débito cardíaco e diminui a freqüência cardíaca ou ainda, devido ao fenômeno de dessensibilização dos receptores β - adrenérgicos como já descrito por Kudej et al. (1997). Este último trabalho demonstrou que a administração de isoproterenol na dose de 30 μ g/g/dia, por infusão, durante 13 dias, causou dessensibilização dos receptores β -adrenérgicos, ocorrendo diminuição da densidade dos receptores e decréscimo na atividade da adenilciclase.

A mortalidade no presente estudo foi considerada baixa para o modelo de hipertrofia utilizado. Provavelmente o fracionamento de Iso possa ter sido responsável pela baixa mortalidade nos diferentes grupos tratados com Iso. A estratégia farmacocinética utilizada foi

diminuir o pico da concentração plasmática da droga e portanto os efeitos do fármaco, principalmente o efeito hipotensor, devem ter sido atenuados.

A avaliação ecocardiográfica revelou aumento da fração de encurtamento (FE) do grupo Iso 10.A e em todos os grupos tratados com Iso no tempo de 16 dias. Ocorreu também uma diminuição no diâmetro sistólico final. Estudo realizado por Hori et al., 2008, também demonstrou aumento da FE em fêmeas tratadas com isoproterenol nas doses de 2,5 µg/kg/min, 5.0 µg/kg/min e 10 µg/kg/min, administrado por infusão. Por outro lado, Takeshita e colaboradores (2008) não observaram alteração na FE nos ratos tratados com Iso na dose de 1,2 mg/kg, s.c., durante 3, 7 ou 14 dias. Acreditamos que possa ter ocorrido este resultado em função da dose utilizada ter sido menor que a utilizada no presente trabalho.

A necrose miocárdica causada pelo isoproterenol é bem descrita na literatura (RONA, et al., 1985; TODD, et al., 1985), por outro lado, estudo realizado Kudej et al. (1997) mostrou que a utilização do isoproterenol na dose de 30µg/g/dia por infusão durante 13 dias causa hipertrofia cardíaca sem áreas de necrose. A análise histológica neste estudo confirmou a hipertrofia ventricular e revelou áreas de fibrose com localização subendocárdica no ventrículo esquerdo e região septal e algumas áreas de necrose. Estes resultados são similares ao encontrado por Jalil, et al. (1989), os quais utilizaram a mesma dose de isoproterenol utilizada neste trabalho (0,5 mg/kg/dia, s.c), durante 10 e 30 dias. Por outro lado, alguns estudos com isoproterenol descreveram áreas de necrose celular extensas, sugerindo que essas alterações seriam de natureza isquêmica pelo aumento abrupto e intenso do trabalho cardíaco sem o necessário aporte de oxigênio. A crítica que fazemos é que esses trabalhos utilizaram doses maiores de isoproterenol que a empregada no presente estudo. (GRIMM, et al., 1998; RONA, et al.,1985).

As mudanças patológicas miocárdicas se assemelham ao infarto miocárdico, com fibrose caracterizada por uma distribuição subendocárdica. No presente estudo a fibrose miocárdica parece ter tido uma relação dose-resposta, pelo menos na faixa de dose utilizada. Essa relação dose-resposta parece ser mais clara com a utilização de doses maiores de isoproterenol. Do mesmo modo, estudos anteriores mostraram que este efeito é dose dependente (RONA, 1963; YEAGER, 1981) e resultou em alterações nos parâmetros hemodinâmicos aguda (BEZNAK, et al., 1962) e cronicamente (BEZNAK, et al., 1964). O estudo de Benjamin et al. , 1989, indicou que existem pelo menos três relações entre a necrose miocárdica e a fibrose induzida pela administração de isoproterenol. Ambas se desenvolvem na mesma região (subendocárdica), aparecem no mesmo tempo de tratamento e apresentam relação dose-resposta similares. Na dose de 125 ug/kg/dia s.c. isoproterenol, os animais apresentam aumento significativo da fibrose e necrose cardíacas, e o aumento da dose de Iso, observa-se aumento da necrose e fibrose concomitantemente (BENJAMINN, et al., 1989).

Neste estudo, as alterações no tecido miocárdico causada pelo isoproterenol são mais prevalentes nas áreas cardíacas mais susceptíveis a isquemia (região subendocárdica do ventrículo esquerdo), corroborando os resultados descritos por Rona et al., (1963). Acredita-se que atividade beta adrenérgica no coração exercida pelo isoproterenol, aumente o metabolismo oxidativo a um nível que excede a quantidade de oxigênio disponível para o cardiomiócito através da circulação coronariana. O desequilíbrio energético em conjunto com uma série de alterações bioquímicas (fluxo de cálcio alterado, estimulação do sistema adenil ciclase, agregação de plaquetas e formação de espécies reativas de oxigênio) (VAN VLEET, et al., 2002) bem como alterações estruturais (alteração na permeabilidade de membrana) (BOUTET et al., 1976; TODD, et al., 1980), parece contribuir para a patogênese das lesões nos cardiomiócitos (RONA, 1985). Em adição, a área do coração mais susceptível a hipóxia causada pela taquicardia parece ser a região subendocárdica do ventrículo esquerdo (BALAZS, et al., 1986; VAN VLEET, et al., 2002). O aumento da frequência cardíaca

causada pelo isoproterenol provoca incremento do trabalho com conseqüente aumento da demanda de oxigênio pelo músculo cardíaco (GUN & MADY, 1999).

Além disso, o aumento do trabalho imposto ao miocárdio, também causa depleção das reservas de energia das células musculares cardíacas, o que ocasiona complexas mudanças bioquímicas e estruturais que levam às alterações na permeabilidade da membrana (HANDFORTH, 1962; RONA, 1985). O mecanismo exato da lesão miocárdica provocada pelo isoproterenol ainda não está totalmente esclarecido; mas um desequilíbrio entre a oferta e demanda de oxigênio versus hipotensão nas coronárias e a hiperatividade miocárdica, parecem ser a melhor explicação para as mudanças morfológicas observadas no miocárdio. (GRIMM et al. 1998). Outros mecanismos fisiopatogênico têm sido propostos para explicar as lesões miocárdicas produzidas pelo isoproterenol: (a) efeito cardiotoxíco direto ao induzir alterações na permeabilidade da membrana (MILEI & RAPAPORT, 1976); (b) perda local de potássio com alterações do potencial de membrana (ROSENMANN et.al.,1964); (c) redução da perfusão no subendocárdio e consumo excessivo de oxigênio devido ao efeito inotrópico (KAHN et al., 1969); (d) aumento da mobilização de ácidos graxos, da peroxidação lipídica e da geração de radicais livres que aumentam a permeabilidade da membrana (NORONHA-DUTRA & STEEN, 1982; SINGAL, 1983; MOHAN & BLOOM,1999); (e) perda do acoplamento intracelular de alta energia (MILEI et al., 1978); (f) desequilíbrio eletrolítico (SINGAL et al., 1981 e 1982) e (g) aumento do influxo de cálcio para o meio intracelular (DHALLA et al.,1996). Assim, as mudanças bioquímicas e estruturais comprometem a integridade estrutural do sarcolema dos cardiomiócitos expostos ao isoproterenol (YUNGE et al.,1989).

Assim como no estudo realizado por Silver, et.al. (1990), no presente estudo a fibrose miocárdica parece também não ter relação com o tempo de tratamento, não houve diferença estatística entre a porcentagem de fibrose no tempo de 8 e 16 dias.

Evidenciou-se nos animais com hipertrofia miocárdica a existência de acentuada deposição de tecido colágeno, que é um achado comum neste modelo de hipertrofia (TANG, et al., 1996; LIN, 1973) como processo reparativo à necrose muscular induzida pela droga.

A formação de colágeno determina rigidez do miocárdio, levando inicialmente a insuficiência diastólica. Talvez seja esse o primeiro mecanismo protetor da função miocárdica, evitando neste estágio a dilatação excessiva da câmara cardíaca. Posteriormente, ocorre a insuficiência sistólica, com a atrofia dos cardiomiócitos e acúmulo de fibras colágenas, isolando-as eletricamente e criando condições para o aparecimento de focos arritmogênicos (WEBER, 1991; MCLENACH, et al., 1987).

6.2. Segunda Etapa

Na segunda etapa, foi avaliado o efeito do 17- β estradiol na hipertrofia miocárdica induzida pelo isoproterenol. Estudos anteriores demonstraram que a administração de 10^{-9} M de 17 β - estradiol inibi o influxo de cálcio através dos canais de Ca^{++} tipo L pela estimulação β – adrenérgica cardíaca, conferindo cardioproteção (MEYER et al., 1998 ; LI et al., 2000). Entretanto, nosso estudou demonstrou que no modelo de hipertrofia induzida pelo isoproterenol, no protocolo utilizado, o estrógeno não conferiu efeito cardioprotetor no remodelamento cardíaco.

Todos os grupos tratados com isoproterenol apresentaram aumento do índice cardíaco em relação aos seus controles. Ao contrário de alguns estudos (LI, 2000; VAN EICKELS et al., 2001), o estrógeno não preveniu a hipertrofia cardíaca avaliada pelo IC e pelo diâmetro dos cardiomiócitos. Curiosamente, o grupo que recebeu a maior dose de estrógeno (140 μ g/kg/dia) apresentou um IC maior quando comparado ao grupo ovariectomizado sem

reposição hormonal. No nosso estudo, a dose de 140 µg/kg potencializou a hipertrofia cardíaca. Estudos anteriores já reportaram que a ação do estrógeno nos cardiomiócitos é diferente dependendo do modelo de hipertrofia utilizado, da espécie e via de administração do hormônio. Alguns desses demonstram que o estrógeno atenua o remodelamento cardíaco em modelo de hipertensão, todavia, no modelo de infarto, o E₂ acentuou o remodelamento pós infarto do miocárdio (VAN EICKELS et al., 2001). Isto, suporta a idéia que há diferenças no efeito do E₂ no remodelamento ventricular, que depende pelo menos do tipo de estímulo no cardiomiócito.

Estudo realizado por Patten et al., (2008), demonstrou que o tratamento de camundongos com E₂ aumenta a área de secção transversa dos cardiomiócitos e a expressão do gene β-MHC, a isoforma lenta da cadeia pesada de miosina, além da hipertrofia dos cardiomiócitos. Por outro lado, no mesmo estudo, houve redução do ventrículo esquerdo e da hipertrofia dos cardiomiócitos após a coarctação da aorta, confirmando a hipótese de que o estrógeno pode aumentar ou diminuir o remodelamento ventricular, dependendo do tipo de estímulo recebido pelo cardiomiócito. Em nosso estudo, o estrógeno na dose de 7 µg/kg/dia e 140 µg/kg/dia não diminuiu o remodelamento cardíaco provocado pelo estímulo agonista β-adrenérgico. Curiosamente, neste modelo de hipertrofia cardíaca, 17-β estradiol na dose de 140 µg/kg/dia acentuou o IC nas ratas ovariectomizadas.

Outros estudos demonstram que coelhas ovariectomizadas tratadas com 17-β estradiol aumentou a massa cardíaca (SCHAIBLE, et al., 1984; SCHEUER, et al., 1987, PATTERSON, et al., 1998).

Uma outra questão que deve ser levada em consideração é a dose do estrógeno utilizada. É bem estabelecido que mulheres na pré-menopausa têm menos tendência a doenças cardiovasculares quando comparados aos homens, provavelmente devido a presença de estrógeno endógeno (ISLES, et al., 1992, ADAMS, et al., 1999, TAMURA, et al., 1999). Entretanto, dados de terapia de reposição hormonal com estrógeno são conflitantes (STAMPFER, et al., 1991; GRODSTEIN, et al., 1997, 2000; REIS, et al., 2000, SHLIPAK, et al., 2001; ALEXANDERSEN, et al., 2006). Estudos mostram que as mulheres na pré menopausa tem proteção contra doenças cardiovasculares, entretanto a reposição hormonal na pós menopausa não confere proteção, segundo alguns estudos clínicos. Uma explicação para essa controvérsia pode ser a dose. Grodstein et al., (2000) demonstraram que o estrógeno 0,3 mg/ dia diminuiu o risco de eventos coronarianos enquanto 0,625 mg e a combinação com um progestágeno aumentou o risco. Genant et al., (1997) reportaram que baixa dose de estrógeno (0,3 mg) acarretou em mais benefícios do que em altas doses. Várias doses de estrógeno (3 – 83,3 µg /dia) tem sido usado em estudos com animais. Dependendo do estudo, estrógeno exerceu efeito benéfico, maléfico ou não interferiu no coração (HUGEL, et al., 1999; VAN EICKELS, et al., 2003; PELZER, et al., 2005; HAMADA, et al., 2006; BABIKER, et al., 2006; BEER, et al., 2007). Beer, et al., (2007), demonstraram que alta dose de estrógeno (83,3 µg /dia) preveniu o desenvolvimento de insuficiência cardíaca após infarto do miocárdio em ratos, entretanto Hugel, et al., (1999) reportaram que a reposição com estrógeno (11,1 µg / dia) não teve efeito benéfico sobre o remodelamento cardíaco pós infarto em ratos.

Zhan et al., (2008), demonstraram que o estrógeno pode ser cardioprotetor ou prejudicial ao coração no modelo de infarto, o que irá depender da dose utilizada. Baixa dose tende a ser benéfico, entretanto, altas doses pode ser prejudicial para o coração. Então, a dose é um importante fator a ser considerado quando se estuda os efeitos do estrógeno no coração.

Em relação ao estudo eletrocardiográfico, os animais tratados com isoproterenol apresentaram aumento da amplitude do complexo QRS, revelando assim aumento da massa ventricular cardíaca em resposta a ação β- adrenérgica. A causa do aumento do complexo QRS esta geralmente associado ao aumento da massa muscular cardíaca, que decorre da

hipertrofia do músculo em resposta a uma carga excessiva sobre uma ou outra parte do coração. A hipertrofia possibilita geração de maior eletricidade em torno do coração e como consequência, os potenciais elétricos registrados nas derivações eletrocardiográficas são consideravelmente maiores que o normal (OPIE, 2004). Curiosamente, o grupo Ovx+E₂.140+Iso não apresentou aumento adicional da amplitude do complexo QRS quando comparado com Ovx+Iso, já que naquele grupo a hipertrofia foi significativamente mais intensa. Provavelmente, o E₂ pode ter causado alterações no remodelamento elétrico, ou seja, alterações na expressão de canais e/ou junções comunicantes importantes para a propagação do potencial de ação e, portanto alteração do vetor elétrico e os parâmetros eletrocardiográficos.

Todos os grupos tratados com isoproterenol apresentaram prolongamento do intervalo QT que representa o tempo gasto na despolarização e repolarização ventricular. Indicando efeito sobre a atividade e/ou expressão de canais iônicos no ventrículo.

Os grupos tratados com isoproterenol apresentaram aumento atrial, sugerido pelo aumento da amplitude da onda P. No presente estudo, o próprio estrógeno apresentou efeito hipertrófico sobre os átrios. Além disso, em 1920, Bazzet reportou que o intervalo QT é 15 a 20 ms maior em mulheres do que em homens. Estes achados sugerem uma influência hormonal no mecanismo que envolve principalmente a repolarização cardíaca. Estudos experimentais em animais mostraram que o estradiol pode diminuir a expressão dos canais para potássio (DRICI, et al., 1996; EBERT, et al., 1998), os quais regulam a repolarização, refletindo no aumento do intervalo QT. Já o estudo realizado por Hulot et al., (2003), não observou diferença significativa na duração do intervalo QT durante o ciclo menstrual em mulheres. Em nosso estudo, o estrógeno em alta dose associado ao isoproterenol aumentou o intervalo QT_c.

A análise histológica neste estudo confirmou a hipertrofia ventricular e revelou áreas de fibrose com localização subendocárdica no ventrículo esquerdo e região septal e algumas áreas de necrose em todos os grupos tratados com isoproterenol. Assim como o índice cardíaco, os grupos tratados com Iso apresentaram aumento no diâmetro dos cardiomiócitos quando comparado aos seus respectivos controles. Além disso o grupo Ovx +E₂.140+Iso apresentou aumento adicional quando comparado ao grupo Ovx+Iso.

Na segunda etapa do estudo, assim como na primeira, as alterações no tecido miocárdico causada pelo isoproterenol foram mais prevalentes nas áreas cardíacas mais susceptíveis a isquemia (região subendocárdica do ventrículo esquerdo), corroborando os resultados descritos por Rona et al., (1963).

Em nosso estudo não houve diferença no % de fibrose entre as fêmeas íntegras e as ovariectomizadas, corroborando os resultados de Hori et.al. (2008). Sabe-se que os metabólitos do estrógeno, estrona e 2-hidroxiestrona, estimula a proliferação de fibroblastos (GROHE, et al., 1996, 1998), entretanto, no presente estudo, as fêmeas repostas com estrógeno e Iso apresentaram, estatisticamente, a mesma porcentagem de fibrose quando comparadas as fêmeas tratadas somente com isoproterenol.

7 CONCLUSÕES

1. A hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol parece ser tempo e não dose dependente, pelo menos no protocolo utilizado;
2. As alterações funcionais cardíacas (analisadas por eletro e ecocardiograma) não parecem ter relação apenas com a massa cardíaca;
3. Algumas alterações eletro e ecocardiográficas são tanto dose como tempo dependentes.
4. O estudo sugere cautela na utilização dos parâmetros eletrocardiográficos (principalmente a amplitude do complexo QRS) para estimativa da hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol, uma vez que em alguns casos apresentou resultado falso – negativo
5. A hipertrofia induzida pelo isoproterenol induz fibrose e algumas áreas de necrose caracterizada por uma localização subendocárdica predominantemente no ventrículo esquerdo.
6. A fibrose induzida pelo Iso tende a ter uma relação dose dependente a partir de utilização de doses maiores do agonista β - adrenérgico.
6. O estrógeno na dose de 140 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ potencializou a hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol, porém o ECG não foi sensível em detectar essa diferença.
7. O estrógeno, no protocolo utilizado, não reduziu a porcentagem de fibrose no modelo de hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol.

8. PERSPECTIVAS

Considerando a potencialização da hipertrofia cardíaca induzida pelo estrógeno em altas doses em ratas ovariectomizadas, pretende-se em futuro próximo buscar as bases moleculares para o provável efeito do E₂ sobre a expressão de proteínas importantes para a condução elétrica cardíaca. Um dos alvos mais importantes para esse estudo seria a conexina 43, que são subunidades protéicas formadoras das junções comunicantes em vários tecidos como o miocárdio, o endotélio vascular e o cérebro.

Alguns estudos sugerem que a conexina 43 exerce papel relevante na condução elétrica e se relaciona com o agravo da hipertrofia cardíaca (TEUNISSEN et al., 2004; KOSTIN et al., 2004). Em pacientes com cardiomiopatia isquêmica ou inflamatória, observa-se uma redistribuição da conexina 43 desde os discos intercalados nas superfícies laterais dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo e nas áreas com alterações estruturais. No ventrículo esquerdo dos corações insuficientes, a quantidade de conexina 43 nos miócitos foi significativamente mais baixa quando comparada aos corações normais (KOSTIN et al., 2003). Além disso, Salameh et al. (2006), demonstraram que estímulo o adrenérgico alterou a expressão da conexina 43 nos cardiomiócitos. Portanto, o estudo da expressão da conexina 43 em nosso modelo, por meio da técnica de reação de polimerização em cadeia (PCR), será decisivo para o melhor entendimento dos nossos resultados.

9. 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.

ADAMS, K. F. J.; SUETA, C. A.; GHEORGHIADE, M.; O'CONNOR, C. M.; SCHWARTZ, T. A.; KOCH, G. G.; URETSKY, B.; SWEDBERG, K.; MCKENNA, W.; SOLER-SOLER, J.; CALIFF, R. M. Gender differences in survival in advanced heart failure. **Circulation**. v. 99, p.1816 – 1821, 1999.

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

AKAZAWA. H.; KUMURO, I. Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy. **Circ res** .v. 92, p.1079-1088, 2003.

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.

ARMOUNDAS, A. A.; WU, R.; JUANG, G.; MARBAN, E.; TOMASELLI, G. F. Electrical and structural remodeling of the failing ventricle. **Pharmacol Ther**. v.92,p.213-230, 2001.

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 guanylyl cyclase A receptor-cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase pathway. **Circulation**.v.109, p. 269-276, 2004.

BABIKER, F. A.; LIPS, D.; MEYER, R.;DELVAUX, E.; ZANDBERG, P.; JANSSEN, B.; VAN EYS, G.; GROHE, C.; DOEVENDANS, P. A. Estrogen receptor β -protects the murine heart against left ventricular hypertrophy. **Arterioscler thromb Vasc Biol**. v.26, p. 1524 – 1530, 2006.

BACHAROVA, L.; KYSELOVIC, J.; KLIMAS, J. The initial stage of left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats is manifested by a decrease in the QRS amplitude/left ventricular mass ratio. **Clin Exp Hypertens**. v. 26, p. 557, 2004.

BACHAROVA, L.; PLANDOROVA, J.; KLIMAS, J.; KRENEK, P.; KYSELOVIC, J.; Discrepancy between increased left ventricular mass and “normal” QRS voltage is associated with decreased connexin 43 expression in early stage of left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Electrocardiology**. v. 41, p.730–734, 2008.

BALAZS, T.; HANING, J. P.; HERMAN, E. H. Toxic responses of the cardiovascular system. **Casarett and Doull's Toxicology: the Basic Science of Poins**. third edition, p. 387–411. Macmillan Publishing Company, New York, USA, 1986.

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

BAZETT, H. C. An analysis of the time-relations of electrocardiograms. **Heart**. v.7, p. 353 – 370,1920.

[BEER, S.](#); [REINCKE, M.](#); [KRAL, M.](#); [CALLIES, F.](#); [STROMER, H.](#); [DIENESCH, C.](#); [STEINHAUER, S.](#); [ERTL, G.](#); [ALLOLIO, B.](#); [NEUBAUER, S.](#) P. High-dose 17beta-estradiol treatment prevents development of heart failure post-myocardial infarction in the rat. **Basic Res Cardiol**. v. 102, p.9-18,2007.

BENJAMIN, I. J.; JALIL, J.E.; TAN, L.B.; CHO, K.; WEBER, K.T.; CLARK, W.A. Isoproterenol- induced myocardial fibrosis in relation to myocyte necrosis. **Circ Res** . v. 65, p. 657 – 670, 1989.

BERNSTEIN, K. E.; ALI, M. S.; SAYESKI, P. P.; SEMENIUK, D.; MARRERO, M. B. New insights into the cellular signaling of seven transmembrane receptors: the role of tyrosine phosphorylation. **Lab Invest**. v.78, p. 3-7, 1998.

BESTETTI, R. B.; RAMOS, C. P.; FIGUEREDO-SILVA, J.; SALES-NETO, V. N.; OLIVEIRA, J. S. M. Ability of the electrocardiogram to detect myocardial lesions in isoproterenol induced rat cardiomyopathy. **Cardiovascular Research**.v.21, p.916-921, 1987.

BEZNAK, M.; HEMODYNAMICS DURING THE ACUTE PHASE OF MYOCARDIAL DAMAGE CAUSED BY ISOPROTERENOL. **Can J Biochem Physiol** .v. 40, p. 25 – 30, 1962.

BEZNAK, M.; HACKER, P. Hemodynamics during the chronic stage of myocardial damage caused by isoproterenol. **Can J Biochem Physiol**. v. 42, p. 269 – 274, 1964

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.

[BOLUYT, M.O.](#); [LONG, X.](#); [ESCHENHAGEN, T.](#); [MENDE, U.](#); [SCHMITZ, W.](#); [CROW, M.T.](#); [LAKATTA, E.G.](#) Isoproterenol infusion induces alterations in expression of hypertrophy-associated genes in rat heart. **Am J Physiol** .v.269, p.638-647,1995.

BOUTET, M.; HUTTNER, I.; RONA, G. Alteration of the sarcolemmal membrane in catecholamine-induced cardiac muscle cell injury: In vivo studies with fine structural diffusion tracer horseradish peroxidase. **Lab Invest**.v. 34, p.482–488,1976.

BRISTOW, M. R.; HERSHBERGER, R. E.; PORT, J.D.; MONOBE, W.; RASMUSSEN, R. B. 1 AND B2ADRENERGIC RECEPTOR mediated adenylate cyclase stimulation in nonfailing and failing human ventricular myocardium. **Mol Pharmacol**. v. 35,p.295-303, 1989.

BROWN, L.; CONRAD, S.; NEWLING, R.; FLETCHER, P.; Cardiac responses after norepinephrine- induced ventricular hypertrophy in rats. **J Cardiovasc Pharmacol.**v.20,p.316 - 323, 1992.

BURLEW, B. S.; WEBER, K. T. Connective tissue and the heart. Functional significance and regulatory mechanisms. **Cardiol Clin.** v.18, n.3, Aug, p.435-442, 2000.

BURRIDGE, K.; CHRZANOWSKA-WODNICKA, M. Focal adhesions, contractility, and signaling. **Annu Rev Cell Dev Biol.** v.12, p- 463 - 519, 1996.

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

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.

CAMPOS, L. A.; ILIESCU, R.; FONTES, M.; SCHLEGEL, W.P.; BADER, M.; BALTATU, O.C. Enhanced isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in transgenic rats with low brain angiotensinogen. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**v.291,n. 5, p. 2371-2376,2006.

COHN, J. N.; LEVINE, T. B. ; OLIVARE, M. T. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. **N Engl J Med** .v.311, p. 819-823,1984.

COLOMBO, C. E. D.; FERREIRA, S. C. X.; JUNQUEIRA, J. C.; BALDUCCI, I.; CARVALHO, Y.R. Influência da ovariectomia na atrofia e regeneração da glândula parótida: estudo histológico em ratas. **Ciênc. odontol. Bras.** v.6, n. 4, p.70-78, 2003.

COTRAN, R.S. **Patologia estrutural e funcional.** Guanabara Koogan, 5.ed. p.1268,1996.

DASH, R.; SCHMIDT, A. G.; PATHAK, A.; GERST, M. J.; BINIAKIEWICZ, D.; KADAMBI, V. J.; BRIAN, D. H.; ABRAHAM, W. T.; KRANIAS, E. G. Differential regulation of p38 mitogen-activated protein kinase mediates gender-dependent catecholamine-induced hypertrophy. **Cardiovasc Res.** v.57, p – 704 - 714,2003.

DHALLA, K. S.; RUPP, H.; BEAMISH, R. E.; DHALLA, N. S. Mechanisms of alterations in cardiac membrane Ca²⁺ transport due to excess catecholamines. **Cardiovasc Drugs** .Ther.v.10, p.231-238, 1996.

DIEZ, J.; GONZALEZ, A. Mechanisms of disease: pathologic structural remodeling is more than adaptive hypertrophy in hypertensive heart disease. *Nat Clin Pract.* **Cardiovasc Med.** v.2, n.4,p.209-216, 2005.

DRICI, M. D.; BURKLOW, T. R.; HARIDASSE, V.; GLAZER, R. I.; WOOSLEY, R. L. Sex hormones prolong the QT interval and downregulate potassium channel expression in the rabbit heart. **Circulation.** v. 94, p. 1471 – 1474, 1996.

EBERT, S. N.; LIU, X. K.; WOOSLEY, R. L. Female gender as a risk factor for drug-induced cardiac arrhythmias: evaluation of clinical and experimental evidence. **J Womens Health**. v.7, p. 547 – 557, 1998.

FABRIS, B. J.; KOHZUKI, M.; PERICH, R.; JOHNSTON, C.I. Increased cardiac angiotensin-converting enzyme in rats with chronic heart failure. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol**. v.17, p.309–314, 1990.

FRANCHINI, K. G. Hipertrofia cardíaca: mecanismos moleculares. **Revista Brasileira de Hipertensão**. v.8, p.125-42. 2001.

FRIEDRICH, K.; Alteração da expressão do receptor de estrogênio subtipo α relacionada a abertura de vagina em ratas Sprague-Dawley. **Fundação Oswaldo Cruz**, 2003.

FRIMM, C.C. Disfunção sistólica e diastólica na hipertensão arterial sistêmica com hipertrofia ventricular esquerda. **HiperAtivo**. v.5, n.2, p. 189 - 194,1998.

GARCIA, J. A. D.; INCERPI, E. K. Fatores e mecanismos envolvidos na hipertrofia ventricular esquerda e o papel anti-hipertrofico do óxido nítrico. **Arq.Bras.Cardiol**. v.90, n.6, p.443-450, 2008.

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.

GEISTERFER. A. A.; PEACH, M. J.; OWENS, G. K. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. **Circulation Research** v.62, p. 749–756, 1988.

GENANT, H.K.; LUCAS, J.; WEISS, S.; AKIN, M.; EMKEY, R.; MCNANEY-FLINT, H.; DOWNS, R.; MORTOLA, J.; WATTS, N.; YANG, H. M.; BANAV, N.; BRENNAN, J.J.; NOLAN, J.C. Low-dose esterified estrogen therapy: effects on bone, plasma estradiol concentrations, endometrium, and lipid levels. Estratab/Osteoporosis Study Group. **Arch Intern Med** . v.157, p. 2609 – 2615, 1997.

GIMA K.; RUD, Y. Ionic current basis of electrocardiographic waveforms: a model study. **Circ Res**. v.90, p. 889 – 896,2002.

GOLDSTEIN, S.; KILLIP, T. Catecholamine depletion in thyrotoxicosis: Effect of guanethidine on cardiovascular dynamics. **Circulation**. v.31, p. 219 - 227,1965.

GOODMAN & GILMAN'S. **The pharmacological basis of therapeutics**. Laurence L. Brunton; John S. Lazo, Keith L. Parker. 11th ed. p.2021, 2006.

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.

GRIMM, D.; ELSNER, D.; SCHUNKERT, H.; PFEIFER, M.; GRIESE, D.; BRUCKSCHLEGEL, G.; MUDERS, F.; RIEGGER, G. A. J.; KROMER, E. P. Development of heart failure following isoproterenol administration in the rat: role of the renin–angiotensin system. **Cardiovasc.Res.** v.37, p.91-100, 1998.

GRIMM, D.; CAMERON, D.; GRIESE, D. P.; RIEGGER, G. A.; KROMER, E. P. Differential effects of growth hormone on cardiomyocyte and extracellular matrix protein remodeling following experimental myocardial infarction. **Cardiovasc Res.** v.40, p. 297–306, 1998.

GRODSTEIN, F. & STAMPFER, M. The epidemiology of coronary heart disease and estrogen replacement in postmenopausal women. **Prog Cardiovasc Dis.** v.38, p. 199-210, 1995.

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.

GROHE, C.; KAHLERT, S.; LOBBERT, K.; VETTER, H. Expression of estrogen receptor alpha and beta in rat heart: role of local oestrogen synthesis. **J. Endocrinol.** v.156, p.1 – 7, 1998.

GROHE, C.; KAJLERT, S.; LOBBERT, K.; STIMPEL, M.; KARAS, R. H.; VETTER, H.; NEYSES, L. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. **Federation of European Biochemical Societies.** v.416, p.107–112, 1997.

GROHE, C.; KAHLERT, S.; KARAS, R. H.; LINZ, W. K.; LOBBERT, K.; MEYER, R.; VETTER, H. Modulation of hypertensive heart disease by estrogen. **Steroids.** v. 61, p. 201 -204, 1996.

GRUBER, C. J.; TSCHUGGUEL, W.; SCHENEEBERGER, C.; HUBER, J. C. Production and actions of estrogens. **The New England Journal of Medicine.** v. 346, p. 340 - 352, 2002.

GUN, C.; MADY, C. **Inotrópicos não digitálicos.** In: Batlouni M., Ramires, JAF. Farmacologia e terapêutica cardiovascular.SP: editora Atheneu, p.109, 1999.

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.

HALE, S. L.; BIRNBAUM, Y.; LONER, R. A. Estradiol, administered acutely, protects ischemic myocardium in both female and male rabbits. **J Cardiovasc Pharmacol Ther.** v. 2, p. 47-52, 1997.

HAMADA, H.; KIM, M. K.; IWAKURA, A.; Ii, M.; THORNE, T.; QIN, G.; ASAI, J.; TSUTSUMI, Y.; SEKIGUCHI, H.; SILVER, M.; WECKER, A.; BORD, E.; ZHU, Y.; KISHORE, R.; LOSORDO, D. W. Estrogen Receptors α and β Mediate Contribution of Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells to Functional Recovery After Myocardial Infarction. **Circulation.** v. 114, p. 2261 – 2270, 2006.

HANDFORTH, C. P. Isoproterenol- induced myocardial infarction in animals. **Arch. Pathol.** v.73, p.161 – 165, 1962.

HARADA, K.; KOMURO, I.; SHIOKIMA, I.; HAYASHI, D.; KUDOH, S.; MIZUNO, T.; KIJIMA, k.; MATSUBARA, H.; SUGAYA, T.; MURAKAMI, K.; YAZAKI, Y. Pressure overload induces cardiac hypertrophy in angiotensin II type 1A receptor knockout mice. **Circulation.** v.97, p.1952 - 1959, 1998.

HORI, Y.; UECHI, M.; EBISAWA, T.; YAMANO, S.; YOSHIOKA, K.; MUTOH, K. I. The influence of gender on cardiac fibrosis induced by sympathetic stimulation. **Chinese Journal of Physiology.** v. 51, p. 146 – 151, 2008.

HUGEL, 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.** v.34, p. 1427 – 1434, 1999.

HULOT, J. S.; DEMOLIS, J. L.; RIVIERE, R.; STRABACH, S.; MAITRE, S. C.; BRENTANO, C. F. Influence of endogenous oestrogens on QT interval duration. **European Heart Journal.** v. 24, p. 1663 – 1667, 2003.

HUNTER, J. J.; CHIEN, K. R. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. **N Engl J Med.** v. 341, p. 1276-1283, 1999.

ISLES, C. G.; HOLE, D. J.; HAWTHORNE, V. M.; LEVER, A. F. Relation between coronary risk and coronary mortality in women of the Renfrew and Paisley survey: comparison with men. **Lancet.** v. 339, p. 702 – 706, 1992.

JALIL, J. E.; DOERING, C. W.; JANICKI, J. S.; PICK, R.; SHROFF, S. G.; WEBER, K. T. Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. **Circ Res.** v. 64, p. 1041-1050, 1989.

KAHN, D. S.; RONA, G.; CHAPPEL, C. I. Isoproterenol-induced cardiac necrosis. **Ann N.Y. Acad Sci.** v.156, p.285- 293,1969.

KANNEL, W.B. Prevalence and natural history of electrocardiographic left ventricular hypertrophy. **Am J Med.** v.3, p.4-11, 1983.

KATSUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,1998.

KEMPF, T.; WOLLERT,K. C. Nitric oxide and the enigma of cardiac hypertrophy. **Bioessays**. v.6, p. 608 - 615, 2004.

KAM, K. W. L.; QI, J. S.; CHEN, M.; WONG, T. M. Estrogen reduces cardiac injury and expression of β -1- adrenoreceptor upon ischemic insult in the rat heart. **Journal of pharmacology and experimental therapeutics Fast Forward**. v. 309, p.8-15, 2003.

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

KOHUTOVA, R.; POGRANOVA, S.; JUSKO, M.; SVEC, P.; STANKOVICOVA, T. Electrical activity of the heart in the rats with experimental hypertension. **Physiol Res**. v. 55, p.3, 2006.

KOMURO, I. Molecular mechanism of cardiac hypertrophy and development. **Jpn Circ J**. v.65, n.5, p.353-358, 2001.

KOSTIN, S.; DAMMER, S.; HEIN, S.; KLOVEKORN, W.P.; BAUER, E.P.; SCHAPER, J. CONNEXIN 43 expression and distribution in compensated and decompensated cardiac hypertrophy in patients with aortic stenosis. **Cardiovasc Res**. v.62, p.426-436, 2004.

KOSTIN, S.; RIEGER, M.; DAMMER, S.; HEIN, S.; RICHTER, M.; KLOVEKORN, W.P; BAUER, E. P.; SCHAPER, J. Gap junction remodeling and altered connexin43 expression in the failing human heart. **Mol Cell Biochem**. v.242, p.135-144,2003.

KRALOVA, E.; MOKRAN, T.; MURIN, J.; STANKOVICOVA, T. Electrocardiography in two models of isoproterenol- induced left ventricular remodeling. **Physiol. Res**. v. 57, p.83 - 89, 2008.

KRENEK, P.; KLIMAS, J.; KROSLAKOVA, M.; GAZOVA, A.; PLANDORAVA, J.; KUCEROVA, D.; FECENKOVA, A.; SVEC, P.; KYSELOVIC, J. Increased expression of endothelial nitric oxide synthase and caveolin-1 in the aorta of rats with isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. **Can J Physiol Pharmacol** . v .84, p.1245-1250, 2006.

KUDEJ, R. K.; IWASE, M.; UECHI, M.; VATNER, D. E.; OKA, N.; ISHIKAWA, Y.; SHANNON, R. P.; BISHOP, S. P.; VATNER, S. F. Effects of chronic β -adrenergic receptor stimulation in mice. **Journal of molecular and cellular cardiology**. v. 29, n.10, p. 2735-2746, 1997.

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 Pharmacol Exp Ther**. v.293, p.592-598, 2000.

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

LIMA, S. M.; ALDRIGHI, J. M.; CONSOLIM- COLOMBO, F. M.; MANSUR, A. P.; RUBIRA, M. C.; KRIEGER, E. M.; RAMIRES, J. A. Acute administration of 17 beta-estradiol improves endothelium-dependent vasodilation in postmenopausal women. **Maturitas**. v. 50, p. 266 – 274, 2005.

LIN, Y. C. Hemodynamics in the rat with isoproterenol induced cardiac hypertrophy. **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.** v. 6, p. 213 – 220, 1973.

LORELL, B. H.; CARABELLO, B. A. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. **Circulation**. v.102, p. 470 - 479, 2000.

LUNA, L.G. **Manual of Staining Methods of Armed Forces Institute of Pathology**. McGraw-Hill Book Company, New York, 3th ed, 1968.

MACHIDA, S.; KARIYA, F.; KOBAYASHI, K.; NARUSAWA, M. Lack of effect of running training at two intensities on cardiac myosin isoenzyme composition in rats. **The Japanese Journal of Physiology**. v.50, p. 577- 583, 2000.

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.

MALLORY, F. B. **Pathological Technique. A practical Manual for workers in Pathological Histology**. W.B.Saunders Company. **Philadelphia and London**. p.156-157, 1938.

MATSUBARA, L. S.; MATSUBARA, B. B.; OKOSHI, M. P.; CICOGNA, A. C. JANICKI, J. S. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. v.279, p. 1534 – 1539, 2000.

MC LENACH, J. M.; HENDERSON, E.; MORRIS, K. L.; DERGIE, H. J. Ventricular arrhythmias in hypertensive left ventricular hypertrophy. **N Engl J Med** . v.317, p.789-792, 1987.

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. **Journal of Renin Angiotensin Aldosterone System**. v. 9 , p. 169 – 175, 2007.

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.

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.

MILEI, J.; RAPAPORT, M. Localization by autoradiography of tritiated isoproterenol in infarct-like lesions of rat myocardium. **Am. Heart J.** v.92, p. 351-355, 1976.

MILEI, J.; NUNES, R. G.; RAPAPORT, M. Pathogenesis of isoproterenol-induced myocardial lesions: its relation to human coagulative myocytolysis. **Cardiology.** v.63,p. 139-151,1978.

MILL, J. G. Hipertrofia Cardíaca. **Revista Brasileira de Hipertensão.**v.18, p.63-75, 2001.

MILANEZ, M. C. **Efeitos do uso de captopril sobre o conteúdo de colágeno cardíaco e em parâmetros ponderais e hemodinâmicos após infarto do miocárdio em ratos.** Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo. p.1-128, 1995.

MIRANDA, A. **Avaliação morfofuncional da progressão do infarto experimental em ratos.** Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, p. 95, 2004.(Tese, Mestrado)

MIRCOLI, L.; FEDELE, L.; BENETTI, M.; BOLLA, G. B.; RADAELLI, A.; PERLINI, S.; FERRARI, A. U. Preservation of the baroreceptor heart rate reflex by chemical sympathectomy in experimental heart failure. **Circulation.** v. 106, p. 866 - 872, 2002.

MOHAN, P.; BLOOM, S.; Lipolysis is an important determinant of isoproterenol-induced myocardial necrosis. **Cardiovasc. Pathol.** v.8, p.255-261,1999.

MOORE, W. G.; HUKHINS, G. M.; BULKLEY, B. H.; TSENG, J. S.; KI, P. F. Constituents of the human ventricular myocardium connective tissue hyperplasia accompanying hypertrophy. **Am Heart J.** v.100, p. 610 - 616, 1980.

MORGAN, H. E; GORDON, E. E.; KIRA, Y.; CHUA, B. H. L.; RUSSO, L. A.; PETERSON, C. I.; MCDERMOTT, P. J.; WATSON, P. A. Biochemical mechanisms of cardiac hypertrophy. **Ann Rev Physiol.** 1987; 49: 533-43.

MURAD, N.; FRANCO, M. F.;TUCCI, P. J. F. Caracterização funcional da hipertrofia miocárdica induzida pelo isoproterenol e de sua regressão. **Arq.Bras.Cardiol.** v.77,nº1,2001.

[NAGANO, M.; HIGAKI, J.; NAKAMURA, F.; HIGASHIMORI, K.; NAGANO, N.; MIKAMI, H.; OGIHARA, T.](#) Role of cardiac angiotensin II in isoproterenol-induced left ventricular hypertrophy. **Hypertension.** v.19, p.708-712, 1992.

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

NORONHA-DUTRA, A. A.; STEEN, E. M. Lipid peroxidation as a mechanism of injury in cardiac myocytes. **Lab. Invest.**v.47, p.346-253,1982.

OIGMAN, W. Sistema renina-angiotensina e hipertrofia ventricular esquerda. **Revista**

Brasileira de Hipertensão, v.3, p.261-267, 2000.

OLIVARES, E. L.; RIBEIRO, V. P.; CASTRO, W. J. P. S.; RIBEIRO, K. C.; MATTOS, E. C.; GOLDENBERG, R. C. S.; MILL, J. G.; DOHMANN, H. F.; SANTOS, R. R.; CARVALHO, C. A. C.; MASUDA, M. O. Bone marrow stromal cells improve cardiac performance in healed infarcted rat hearts. **Am J Physiol Heart Cir Physiol**. v. 287, p 464-470, 2004.

OLIVARES, E. L. **Cardiomioplastia celular: uma contribuição experimental**. Tese de doutorado, Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

[OLIVARES, E. L.](#); [SOUSA, C. R. H.](#); [CASTRO, W. J. P.](#); [RIBEIRO, P. V.](#); [SILVA, M. G.](#); [RIBEIRO, K. C.](#); [MATTOS, E. C.](#); [GOLDENBERG, R. C.](#); [CARVALHO, C. A. C.](#); [MASUDA, M. O.](#) Cellular cardiomyoplasty in large myocardial infarction: Can the beneficial effect be enhanced by ACE-inhibitor therapy? **Eur J Heart Fail**. v. 9, p. 558-567, 2007.

OLIVEIRA, E. M. **Bases moleculares da ativação da enzima conversora de angiotensina (ECA) na hipertrofia cardíaca no rato**. Tese de Doutorado, Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999.

OPIE, L. H. **Heart physiology: from cell to circulation**. Lippincott Williams & Wilkins, fourth edition, 2004.

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.

OZAKI, M.; KAWASHIMA, S.; YAMASHITA, T.; HIRASE, T.; OHASHI, Y.; INOUE, M.; HIRATA, K.; YOKOYAMA, M. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase attenuates cardiac hypertrophy induced by chronic isoproterenol infusion. **Circ J**. v. 66, p.851 - 856, 2002.

PATTEN, R. D.; POURATI, I.; MARK, J.; ARONOVITZ, B. A.; ALSHEIKH- ALI, A.; EDER, S.; FORCE, T.; MENDELSON, M. E.; KARAS, R. H. 17 – β estradiol differentially affects left ventricular and cardiomyocyte hypertrophy following myocardial infarction and pressure overload. **Journal of cardiac failure**. v. 14, n.3, 2008.

PATTERSON, E.; MA, L.; SZABO, B.; ROBINSON, C. P.; THADANI, U. Ovariectomy and estrogen – induced alterations in myocardial contractility in female rabbits: Role of the L-type calcium channel. **Pharmacology and experimental therapeutics**. v.284, p. 586 – 591, 1998.

PELOUCH,V.; DIXON, I. M. C.; GOLFMAN, L.; BEAMISH, R. E.; DHALLA, N. S. Role of extracellular matrix proteins in heart function. **Mol Cell Biochem**. v.129, p.101 - 120, 1994.

PELZER, T.; LOZA, P. A.; HU, K.; BAYER, B.; DIENESCH, C.; CALVILLO, L.; COUSE, J. F.; KORACH, K. S.; NEYSES, L.; ERTL, G. Increased Mortality and Aggravation of Heart Failure in Estrogen Receptor- β Knockout Mice After Myocardial Infarction. **Circulation**. v. 111, p. 1492 – 1498, 2005.

PENPARGKUL, S.; MALHOTRA, A.; SCHAIBLE, T.; SCHEUER, T.; SCHEUER, J. Cardiac contractile proteins and sarcoplasmic reticulum in hearts of rats trained by running. **J Appl Physiol**.v. 48, p. 409 - 413, 1980.

PEREIRA, F. E. L. **Hipertrofia cardíaca: aspectos morfológicos e patogênicos. In: Contratilidade miocárdica. Aspectos básicos e clínicos.** Editores Vassallo D.V, e Lima EG. São Paulo, BYK, 13-28, 1993.

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.

RAAB, W.; VAN LITH, P.; LOPESCHKIN, B.; HERRLICH, H. C. Catecholamine-induced myocardial hypoxia in the presence of impaired coronary dilatability independent of external cardiac work. **Am J Cardiol** . v. 9, p. 455-470, 1962.

REICHEK, N.; DEVEREUX, R. B. Left ventricular hypertrophy: Relation of anatomic, echocardiographic and electrocardiographic findings. **Circulation**. v.63, p.1391 - 1398, 1981.

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 Coll Cardiol**. v. 36, p. 529 – 533,2000.

ROMHILT, D. W. ESTES, E. R. Point score system for the ECG diagnosis of left ventricular hypertrophy. **Am Heart J**. v.75, p. 752 - 758, 1968.

RONA G.; CHAPPEL, G. I.; BALAZS, T.; GAUDRY, R. An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. **Arch Pathol**.,v.67, p.443 - 455, 1959.

RONA, G. Catecholamine cardiotoxicity. **J Mol Cell Cardiol**.v.17, p. 291-306, 1985.

RONA, G.; KAHN, D.S; CHAPPEL, C. L. Studies on infarct-like myocardial necrosis produced by isoproterenol:a review. **Rev can Biol**. v.22, p. 241-306, 1963.

ROSENMAN, E.; GAZENFIELD, E.; LAUFER, A.; DAVIES, A. M. Isoproterenol induced myocardial lesions in the immunized and non- immunized rat. Histopathological lesions in normal rats. **Path Microbiol (Basel)**. v.27,p. 303-309,1964.

ROSSI, M. A. Fibrosis and inflammatory cells in human chronic chagasic myocarditis: scanning electron microscopy and immunohistochemical observations. **International Journal of Cardiology**. v.66, p.183-194, 1998.

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.

RUSSELL, B.; MOTLAGH, D.; ASHLEY, W. W. Form follows function: how muscle shape is regulated by work. **J Appl Physiol.**v. 88, p.1127 - 1132, 2000.

SADOSHIMA, J.; XU, Y.; SLAYTER, H. S; IZUMO, S. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. **Cell**, v. 75, p. 977–984, 1993.

SALAMEH, A.; FRENZEL, C.; BOLDT, A.; RASSLER, B.; GLAWE, I.; SCHULTE, J.; MUHLBERG, H.; ZIMMER, G.; PFEIFFER, D.; DHEIN, S. Subchronic alpha- and beta-adrenergic regulation of cardiac gap junction protein expression. **The faseb journal**, v.20, p. 365 – 367, 2006.

[SALGADO, H. C.](#); [SKELTON, M. M.](#); [SALGADO, M. C.](#);COWLEY, A. W. Physiopathogenesis of acute aortic coarctation hypertension in conscious rats. **Hypertension**. v.23, p. 178-181, 1994.

SARAIVA, J. F. K. Doença cardíaca hipertensiva: da hipertrofia à insuficiência cardíaca. **HiperAtivo**. v. 2, p. 102-114, 1997.

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.

SCHAIBLE, T. F.; MALHOTRA, A.; CIAMBRONE, G.; SCHEUER, J. The effects of gonadectomy on left ventricular function and cardiac contractile proteins in male and female rats. **Circ Res**. v.54, p. 38 – 49, 1984.

SCHEUER, J.; MALHOTRA, A.; SCHAIBLE, T. F.; CAPASSO, J. Effects of gonadectomy and hormonal replacement on rat heart. **Circ Res**. v.61.p. 12 – 19, 1987.

SCHLEGEL, A.; WANG, C.; KATZENELLENBOGEN, B. S.; PESTELL, R. G.; LISANTI, M. P. Caveolin–1 potentiates estrogen receptor α (ER α) signaling: caveolin-1 drives ligand-independent nuclear translocation and activation of ER α . **The Journal of Biological Chemistry**. v. 274, p.33551-33556, 1999.

SENBONMATSU, T.; ICHIHARA, S.; PRICE, E.; GAFFNEY, F. A.; INAGAMI, T. Evidence for angiotensin II type 2 receptor-mediated cardiac myocyte enlargement during in vivo pressure overload. **J Clin Invest**. v.106, R25–R29, 2000.

SHIRAI, H.; TAKAHASHI, K. KATADA, T.; INAGAMI, T. Mapping of G protein coupling sites of the angiotensin II type 1 receptor. **Hypertension**.v.25, p.726-30, 1995.

SHLIPAK, M. g.; ANGEJA, B. G.; GO, A. S.; FREDERICK, P. D.; CANTO, J. G.; GRADY, D. Hormone Therapy and In-Hospital Survival After Myocardial Infarction in Postmenopausal Women. **Circulation**. v. 104, p. 2300-2304, 2001.

SHUBEITA, H. E.; MARTINSON, E. A.; VAN BILSEN, M.; CHIEN, K. R.; BROW, J. H. Transcriptional activation of the cardiac myosin light chain 2 and atrial natriuretic factor genes by protein kinase C in neonatal rat ventricular myocytes. **Proc Natl Acad Sci** . v. 89: 1305 - 1309, 1992.

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.

SILVER, M. A.; PICK, R.; BRILLA, C. G; JALIL, J. E; JANICKI J. S.; WEBER, K. T. Reactive and reparative fibrillar collagen remodeling in the hypertrophied rat left ventricle: two experimental models of myocardial fibrosis. **Cardiovascular research**. v.24, p.741-747, 1990.

SIMKO, F. Is NO the king? Pathophysiological benefit with uncertain clinical impact. **Physiol res** . v.56, p.1-6, 2007.

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.

SJAASTAD, I.; SJERSTED, O. M.; ILEBEKK, A.; BJORNERHEIM, R. Echocardiographic criteria for detection of postinfarction congestive heart failure in rats. **J Appl Physiol**. v. 89, p. 1445 - 1454, 2000.

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.

SINGAL, P. K.; DHILLON, K. S.; BEAMISH, R. E.; DHALLA, N. S. Protective effect of zinc against catecholamine-induced myocardial changes electrocardiographic and ultrastructural studies. **Lab. invest**.v. 44, p. 426 – 433, 1981.

SINGAL, P. K.; KAPUR, N.; DHILLON, K. S.; BEAMISH, R. E.; DHALLA, N. S. Role of free radicals in catecholamine-induced cardiomyopathy. **Can J Physiol Pharmacol**. v.60,p. 1390 – 1397,1982.

SINGAL, P. K.; BEAMISH, R. E.; DHALLA, N. S. Potencial oxidative pathways of catecholamines in the formation of lipid peroxides and genesis of heart disease. **Adv. Exp.Med. Biol**. v.161, p.391-401, 1983.

STAMPFER, M. J.; COLDITZ, G. A.; WILLETT, W. C.; MANSON, J. E.; ROSNER, B.; SPEIZER, F. E.; HENNEKENS, C. H. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. **N Engl J Med.** v. 325, p. 756 – 762, 1991.

SWYNGHEDAUW, B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. **Physiol Rev.** v. 79, p. 216-261, 1999.

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.

SUSSMAN, A.; MCCULLOCH, A.; BORG, T. K. Dance band on the titanic: biomechanical signaling in cardiac hypertrophy. **Circ Res.** v.91, p.888 - 898, 2002.

SZAKACS, J. E.; DIMMETTE, R. M.; COWARD, E.C. **Pathologic implications of the catecholamines, epinephrine, and norepinephrine.** US Armed Forces Med J. v.10, p. 908 - 925, 1959.

TAKESHITA, D.; SHIMIZU, J.; KITAGAWA, Y.; YAMASHITA, D.; TOHNE, K.; NAKAJIMA-TAKENAKA, C.; ITO, H.; TAKAKI, M. Isoproterenol – Induced hypertrophied rat hearts: Does short-term treatment correspond to long-term treatment? **J. Physiol.Sci.** vol.58, n.3, p. 179 – 188, 2008.

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

TANG, Q.; TAYLOR, P.B. Altered contractile function in isoproterenol-induced hypertrophied rat heart. **J. Hypertens.** V.14, p. 751–757, 1996.

TARAZI, R. C.; SEN, S.; SARAGOÇA, M.; KHHAIRALLAH, P. The multifactorial role of catecholamines in hypertensive cardiac hypertrophy. **Eur heart J.** v.3, p.103 -110, 1982.

TEERLINK, J. R.; PFEFFER, J. M.; PFEFFER, M. A. Progressive ventricular remodeling in response to diffuse isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats. **Circ res.**, v.75, p. 105 – 113, 1994.

TEUNISSEN, B. E.; JONGSMA, H.J.; BIERHUIZEN, M.F. Regulation of myocardial connexins during hypertrophic remodelling. **European Heart Journal.** v. 25, p.1979-1989, 2004.

TODD, G. .; BAROLDI, G.; PIEPER, G. M.; CLAYTON, F. C.; ELIOT, R. S. Experimental catecholamine- induced myocardial necrosis.Morphology,quantification and regional distribution of acute contraction band lesions. **J. mol. Cell.Cardiol.** v.17, p. 317 – 338, 1985.

TODD, A, G. L.; CULLAN, G. E.; CULLAN, G. M. Isoproterenol induced myocardial necrosis and membrane permeability alterations in the isolated perfused rabbit heart. **Exper. Mol. Pathol.** v. 33, p. 43 – 54, 1980.

TRINDADE, D. C.; TRINDADE, R. C.; MARASSI, M. P.; MARTINS, O. P. P. R.;

E SOUSA, R. H.; MATTOS, E. C.; MARINHO, A. J.; REIS, L. C.; OLIVARES, E. L. Role of renin- angiotensin system in development of heart failure induced by myocardial infarction in rats. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.70, p. 251 – 259, 2007.

YAN, G. X.; ANTZELEVITCH, C. Cellular basis for the normal T wave and the electrocardiographic manifestations of the long QT syndrome. **Circulation**. v.98, p. 1928 – 1936, 1998.

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.

VAN EICKELS, M.; PATTEN, R. D.; ARONOVITZ, M. J.; ALSHEIKH-ALI, A.; GOSTYLA, K.; CELESTIN, F.; GROHE, C.; MENDELSON, M. E.; KARAS, R. H. 17 – β estradiol increases cardiac remodeling and mortality in mice with myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol**. v. 41, p. 2084 – 2092, 2003.

VAN VLEET, J. F.; FERRANS, J. V.; HERMAN, E. **Cardiovascular and skeletal muscle system**. In Handbook of Toxicologic Pathology (W. M. Haschek, C. G. Rousseaux, and M. A. Wallig, eds), v.. 2, p 363–455. Academic Press, San Diego, CA, USA, 2002.

VASSALO, D. V.; LIMA, E. G. **Contratilidade miocárdica. Aspectos básicos**. BYK – São Paulo, 1993.

VASSALLO, D. V.; VASQUEZ, E. C.; CABRAL, A. M. Contractile performance of papillary muscles of renovascular hypertensive and isoproterenol-pretreated rats. **Pharmacol Res Comm**. v. 20, p. 61 - 72, 1988.

VENTURA – CLAPIER, R.; MEKHFI, H.; OLIVIERO, P.; SWYNGHEDAUW, B. Pressure overload changes cardiac skinned-fiber mechanics in rats, not in guinea-pigs. **Am J Physiol**. v. 254, p.517 - 524, 1988.

VON HARSDORF, R.; KANG, R. E.; FULLERTON, M.; WOODCOCK, E. A. Myocardial stretch stimulates phosphatidyl-inositol turnover. **Circ Res**. v.65, p.494 - 50, 1989.

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.

WEBER, K. T. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. **J Am Coll Cardiol**. v. 13, p. 1637 - 1652, 1991.

WEBER, K. T.; BRILLA, C. G.; JANICKI, J. S. Myocardial remodeling and pathological hypertrophy. **Hospital Practice**. v. 26, p. 73 - 80, 1991.

WEBER, K. T.; PICK, R.; SILVER, M. A.; MOE, G. W.; JANICKI, J. S.; ZUCKER, I. H. ARMSTRONG, P. W. Fibrillar collagen and remodeling of dilated left ventricle. **Circulation**. v. 82, p.1387 - 13401, 1990.

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.

WIDGREN, B. R.; PERSSON, B.; WIKSTRAN, J. Reduced left ventricular distensibility in normotensive men with a positive family history of hypertension. **Am J Hypert.** v. 6, p. 750 - 757, 1993.

WILLIAMS, B. Angiotensin II and the pathophysiology of cardiovascular remodeling. **Am .J. Cardiol.** v.87, p.10 – 17, 2001.

WOLLERT, K. C.; DREXLER, H. Regulation of cardiac remodeling by nitric oxide: focus on cardiac myocyte hypertrophy and apoptosis. **Heart Fail Rev.** v.7, p. 317 -325, 2002.

[YEAGER, J. C.](#); [IAMS, S. G.](#) The hemodynamics of isoproterenol-induced cardiac failure in the rat. **Circ Shock.** v. 8, p. 151 - 163,1981.

YLIKORKALA, O.; ORPANA, A.; PUOLAKKA, J.; PYORALA, T.; VIINIKK, L. Postmenopausal hormonal replacement decreases plasma levels of endothelin-1. **J Clin Endocrinol Metab.** v.80, p.3384 – 3387,1995.

YUNGE, L.; BRUNEVAL, P.; COKAY, M. S.; BERRY, B.; PETTERS, H.; POULSEN, R.; HUTTNER, I. Perturbation of the sarcolemmal membrane in isoproterenol-induced myocardial injury of the rat: Permeability and freeze- fracture studies in vivo and in vitro. **Am J Pathol.** v.134, p.171-185, 1989.

ZHAN, E.; KEIMIG, T.; XU, J.; PETERSON, E.; DING, J.; WANG, F.; YANG, X.P. Dose – dependent cardiac effect of oestrogen replacement in mice post-myocardial infarction. **Exp Physiol.** v.93, p.982 – 993, 2008.

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.

ZIERHUT, W.; ZIMMER, H. G. Significance of myocardial alpha- and beta-adrenoreceptors in catecholamine- induced cardiac hypertrophy. **Circ Res.** v. 65, p. 1417-1425, 1989.

