

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde - ICBS
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

***EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO NA ATIVIDADE MECÂNICA DO CORAÇÃO,
ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO E TECIDUAL EM RATAS SOB DISTINTOS
NÍVEIS ESTROGÊNICOS.***

Dissertação de Mestrado

Fabiano Leichsenring Silva

Porto Alegre, dezembro de 2005.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde - ICBS
Departamento de Fisiologia

***EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO NA ATIVIDADE MECÂNICA DO CORAÇÃO,
ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO E TECIDUAL EM RATAS SOB DISTINTOS
NÍVEIS ESTROGÊNICOS.***

Fabiano Leichsenring Silva

Orientadora: Dra. Adriane Belló Klein

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, dezembro de 2005.

AGRADECIMENTO

A Deus por tudo e por todos. O Criador e mantenedor de toda ciência que me oportunizou descobrir um pouco mais daquilo que tanto gosto, Fisiologia.

A minha amada esposa, Cáren. É maravilhoso poder cada dia acordar e saber que estás ao meu lado para todos os momentos. Teu apoio incondicional me tem dado forças para continuar.

Aos meus pais, Daniel e Lori. Pelas noites em claro comigo e por mim, pelo apoio, cuidado e inigualável dedicação dispendidos por mim.

A Professora Adriane Belló Klein, minha orientadora, pela incansável disposição e exemplar dedicação à pesquisa e arte de ensinar.

Aos bolsistas do laboratório Eduardo, Rafaela, Lessane, Gabriela, Ana Carolina e Ana Raquel pela ajuda nos experimentos.

A Tânia Regina Gattelli Fernandes, pelo apoio técnico e amizade.

Aos todos colegas de laboratório, que faria injustiça se citasse nomes, pois foram partes integrantes de todos momentos desse trabalho. Vocês são uma equipe maravilhosa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias de sinalização intracelular	07
Figura 2. Efeito da lipoperoxidação na membrana plasmática	08
Figura 3. Mecanismos de defesa enzimática	11
Figura 4. Estrutura química do estrogênio	12
Figura 5. Cirurgia de castração	19
Figura 6. Perfusão do coração através da aorta	25
Figura 7. Posição do balonete no ventrículo esquerdo	26
Figura 8. Resultado dos testes de esforço	28
Figura 9. Variação do nível sistêmico das carbonilas	32
Figura 10. Freqüência cardíaca durante perfusão	34
Figura 11. Pressão diastólica ventricular esquerda durante isquemia e reperfusão	37
Figura 12. Derivada negativa de pressão pela derivada de tempo durante diferentes valores de pressão diastólica	39
Figura 13. Pressão de perfusão durante diferentes valores de pressão diastólica	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil oxidativo do músculo gastrocnêmio na 8ª semana do protocolo experimental	29
Tabela 2. Perfil oxidativo sistêmico na 8ª semana do protocolo experimental	30
Tabela 3. Perfil oxidativo cardíaco na 8ª semana do protocolo experimental	31
Tabela 4. Análise sistêmica temporal das carbonilas	32
Tabela 5. Freqüência cardíaca durante isquemia e reperfusão	35
Tabela 6. Pressão sistólica do ventrículo esquerdo em resposta à variação de pressão diastólica de 10 a 40 mmHg	36
Tabela 7. Pressão sistólica ventricular esquerda em resposta à isquemia e reperfusão	36
Tabela 8. Derivada positiva de pressão pela derivada de tempo mediante diferentes pressões diastólicas	38
Tabela 9. Derivada positiva de pressão pela derivada de tempo durante isquemia e reperfusão	38
Tabela 10. Variação da derivada negativa de pressão pela derivada de tempo durante isquemia e reperfusão	40
Tabela 11. Pressão de perfusão durante isquemia e reperfusão	42

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT – Catalase

CS – grupo castrado sedentário

CT – Grupo castrado treinado

- dP/dt – Derivada negativa de pressão por derivada de tempo

+ dP/dt – Derivada positiva de pressão por derivada de tempo

ERO – Espécies reativas de oxigênio

FC – Frequência cardíaca

GPx – Glutathione peroxidase

LPO – Lipoperoxidação

NO – Óxido nítrico

PDVE – Pressão diastólica ventricular esquerda

PMSF – Fluoreto de metil fenil sulfonila

PP – Pressão de perfusão

PSVE – Pressão sistólica ventricular esquerda

QL – Quimiluminescência

S – grupo controle sedentário

SOD – Superóxido dismutase

T – Grupo controle treinado

TBA-RS – Substâncias reativas ao ácido tiobranbitúrico

TE – Teste de esforço

TRH – Terapia de reposição hormonal

VE – Ventrículo esquerdo

VO₂ Max – Consumo máximo de oxigênio

RESUMO

Esse é um estudo experimental que tem por objetivo avaliar as alterações sistêmicas, musculares e mecânica cardíaca em virtude de um programa de exercício físico de média intensidade em ratas ovariectomizadas. Para esse estudo foram utilizadas ratas Wistar fêmeas, divididas em quatro grupos: controle treinado (T), controle sedentário (S), castrado treinado (CT) e castrado sedentário (CS). O protocolo de treinamento utilizado foi de 8 semanas com intensidade inicial de 40% e final de 70% do VO_2 Max. No final do protocolo, foi coletado sangue para análise do estresse oxidativo (EO) sistêmico e os animais foram mortos e retirado o músculo gastrocnêmio para medida da lipoperoxidação (LPO), bem como da atividade enzimática antioxidante. O coração para perfusão pelo método de Langendorff e análise das enzimas antioxidantes e lipoperoxidação. Na análise do músculo gastrocnêmio, os grupos T e CS tiveram aumento significativo ($p < 0,05$) na atividade da superóxido dismutase (SOD) com relação aos outros grupos. Na atividade da catalase (CAT) o grupo CS foi maior que o CT ($p < 0,05$), e na atividade da GPx, o grupo CT foi menor que o T ($p < 0,05$). A LPO do grupo CT foi menor que dos grupos S e CS ($p < 0,05$). Com relação à análise de EO sistêmico, a atividade da SOD esteve aumentada no grupo CS com relação ao S ($p < 0,05$). A CAT não apresentou diferenças significativas entre os grupos. Com relação à atividade da GPx, os grupos T e CS estiveram aumentados com relação ao grupo CT ($p < 0,05$), porém somente o grupo T aumentou com relação ao S ($p < 0,05$). Na análise do miocárdio os resultados encontrados na atividade da superóxido dismutase (SOD) os grupos C e CT tiveram aumento significativo ($p < 0,05$) com relação ao grupo CS; da catalase (CAT) os grupos T e CS estiveram diminuídos com relação ao grupo CT ($p < 0,05$), porém somente o grupo T esteve diminuído com relação a S ($p < 0,05$); na atividade da GPx o grupo CS foi maior que S ($p < 0,05$) e na LPO não houve diferença significativa entre os grupos. Na perfusão de coração isolado foi observada diferença ($p < 0,05$), sendo a pressão diastólica ventricular esquerda do grupo CS maior que T durante a isquemia. Concluímos que o organismo foi capaz de se adaptar a ausência de estrogênio e que o exercício físico promoveu uma menor oxidação de proteínas nos animais castrados, não apresentando modificações entre os grupos com

relação ao estresse oxidativo e mecânica dos corações de ratas treinados sob distintos níveis estrogênicos.

1. INTRODUÇÃO

Com os avanços na área biomédica, o maior acesso a recursos médicos tem aumentado a longevidade e a qualidade de vida. Em virtude disso, uma grande preocupação hoje talvez não seja de quanto viveremos, mas como viveremos.

Dentre todos os eventos fisiológicos pelos quais passamos em nosso desenvolvimento e maturação corporal, destacamos aqui um com que as mulheres convivem durante a maior parte de sua vida, uma ocorrência fisiológica periódica: a menstruação. A menstruação apresenta-se como esboço da maturação corporal que envolve um jogo de hormônios que dependente de pequenos e grandes ajustes cíclicos. Dentre o conjunto de hormônios que regem os ajustes da fisiologia feminina, destacamos um: o estrogênio.

O estrogênio é um hormônio gonadotrófico com ação local e também sistêmica. É produzido principalmente pelas células da granulosa durante a fase folicular do ciclo sexual de mamíferos. Sua estrutura química polifenólica, com um grupo hidroxil e um metil, lhe dá uma característica de varredor de radicais livres por sua capacidade de reagir com essas estruturas químicas (Sugishita et al. 2003). Esse hormônio é produzido durante toda vida fértil da mulher, ou seja, desde a menarca (período da primeira menstruação) até a menopausa (período da cessação da menstruação).

No Brasil, em estudo realizado com população hospitalar, a média etária do início da menopausa variou de 45 a 48 anos (Fernandes et al. 2004). Esse dado sugere que há uma expectativa de vida de aproximadamente 20 anos após o início dessa fase. Daí a necessidade de se compreender melhor as alterações fisiológicas, repercussões, possibilidades de tratamento e prevenção relacionados a esse período.

Muitos sintomas psicológicos e psicossomáticos, incluindo instabilidade de humor, depressão, tensão, ansiedade e dificuldades de concentração (Ballinger, 1990) são associados diretamente com a menopausa. Destacamos, porém, outro dado importante relacionado a esse evento: mulheres na menopausa, possivelmente por perderem a atuação do estrogênio, passam a ter maior

susceptibilidade a problemas cardiovasculares (Fernandes et al. 2004; Barp et al. 2002). Barp et al. (2002) em estudo com ratas castradas sugerem uma ação antioxidante do estrogênio na modulação do dano oxidativo produzido pela hipertensão renovascular no tecido cardíaco. Também Rosano et al. (1993) e Hernández et al. (2000) mostraram um papel vasodilatador coronariano do estrogênio em seus estudos.

Esses dados nos levam a pensar que uma das formas de minimizar os sintomas do climatério (período que se refere à transição da vida fértil para menopausa) e as possíveis complicações pela redução na produção de estrogênio, relacionado ao risco cardiovascular, seria a terapia de reposição hormonal (TRH). Corroboram com esse pensamento o fato de recentes estudos apresentarem diminuição da resistência coronariana e redução do risco cardiovascular em mulheres submetidas à TRH (Nair et al. 2005; Gabriel et al. 2005).

Morgan-Martins (2003) em estudo com coração isolado e perfundido de ratas castradas demonstrou que, aquelas submetidas à TRH, tiveram seus níveis de pressão de perfusão e contratatura cardíaca após isquemia-reperfusão, semelhantes a valores das ratas não castradas. Este estudo também mostrou redução do estresse oxidativo (EO) cardíaco nas ratas submetidas à TRH quando comparadas às ratas castradas.

No entanto, estudo realizado por Manson et al. (2003) demonstrou que mulheres submetidas à TRH não apresentavam melhora com relação aos fatores de risco cardiovascular; ao contrário, as mulheres sujeitas à TRH tiveram um risco aumentado de doenças cardiovasculares. Esse estudo, porém, limitou-se a analisar uma faixa etária acima de 60 anos. Em virtude disso, alguns pesquisadores sugerem que, por esse estudo, não seria possível inferir que a TRH aumenta o risco de distúrbios cardiovasculares, visto que o início da menopausa seria, em média, cerca de 15 anos antes (Fernandes et al. 2004).

Em contrapartida, é possível observar que a atividade física regular, conforme estudo realizado por Slaven & Lee (1997), produz resultados positivos sobre os sintomas da menopausa, tendo melhora na dificuldade de concentração,

humor e nos sintomas vasomotores em mulheres que participaram de um programa de exercício físico regular. Outros estudos (Brow et al. 2003; Powers et al. 1998; Bowles & Starnes, 1994) mostram melhor resposta cardíaca a situações isquêmicas em ratos submetidos a treinamento físico.

Esse benefício cardíaco tem sido atribuído ao fato de que o treinamento físico a média e alta intensidade é gerador de espécies reativas de oxigênio (ERO). O aumento do consumo de oxigênio e a necessidade da maior produção de energia sob forma de adenosina trifosfato (ATP) exige sobremaneira a função mitocondrial. Por sua vez, a mitocôndria aumenta a produção do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) uma ERO. Os antioxidantes (AOX) enzimáticos e não enzimáticos serão consumidos na neutralização das ERO. O desequilíbrio desses fatores, quer por aumento exagerado de ERO ou pela diminuição dos AOX, caracteriza o estresse oxidativo.

Assim, o exercício físico é um meio de produzir estresse oxidativo. Conclui-se que a prática regular de exercício físico, o treinamento físico, adapta o organismo ao estresse oxidativo (EO) por constantemente submetê-lo a essa situação, melhorando a capacidade de resposta a situações diversas que possam promover o aumento das ERO (Cooper et al. 2002). Uma inadequada adaptação do organismo ao aumento das ERO pode acabar em lesões teciduais devido à toxicidade do oxigênio.

1.1 Toxicidade do oxigênio

O mesmo oxigênio que nos é fundamental à sobrevivência também forma ERO (Olszewer, 1992). Esse é o paradoxo que nos mantém vivos, pois em toda natureza o que percebemos é um caráter bifacial do oxigênio. Ao mesmo tempo que somos dependentes dele para vivermos, temos por meio de sua metabolização a formação de radicais livres, moléculas capazes de gerar dano e morte celular.

Com a descoberta do oxigênio como componente químico do ar por Priestley (1774), foi descrita quase que simultaneamente a sua toxicidade. Lavoisier, já em 1783, provou que altas pressões de oxigênio tinham efeito tóxico sobre o pulmão de animais. No entanto, foi Paul Bert (1871), discípulo de Claude Bernard, que estabeleceu as bases da toxicidade do oxigênio hiperbárico. Ele

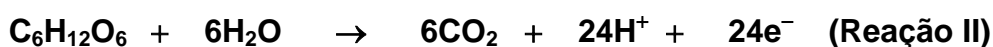
concluiu que todas as formas de matéria viva sofriam efeitos tóxicos sob estas circunstâncias experimentais.

Cerca de 95% do oxigênio que respiramos é usado na combustão lenta dos alimentos e obtenção de energia. Durante esta combustão, o oxigênio é transformado em água e dióxido de carbono. A fim de que isso ocorra, a redução completa de uma molécula de oxigênio requer quatro elétrons.

O consumo de oxigênio pelos organismos aeróbios está intimamente ligado à otimização da extração de energia dos diversos substratos energéticos. Seu alto potencial oxidante pode ser verificado pela comparação da eficiência com que ocorrem as reações do metabolismo aeróbio. Por exemplo, a oxidação completa da glicose pode liberar energia suficiente para ressíntese de 38 ATP, enquanto no sistema anaeróbio apenas 2 ATP são obtidos. No primeiro caso, as células transformam glicose ($C_6H_{12}O_6$) em água e dióxido de carbono graças à oxidação por oxigênio molecular (reação I).



No processo de formação da água, a transferência de grande parte dos elétrons da glicose para o oxigênio é que produz formidável quantidade de energia. Para ficar mais claro a troca de elétrons na reação I, desdobra-se em duas sub-reações: II e III.

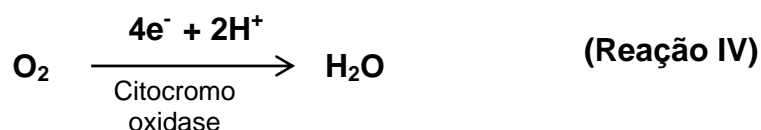


Deste modo, 24 prótons (H^+) e 24 elétrons (e^-) provenientes da glicose (reação II) são consumidos pelo oxigênio (reação III) e não aparecem na reação final (reação I). Na realidade, a reação II pode ser desdobrada em outras, pois a célula efetua a queima da glicose em inúmeras etapas, de modo a aproveitar o

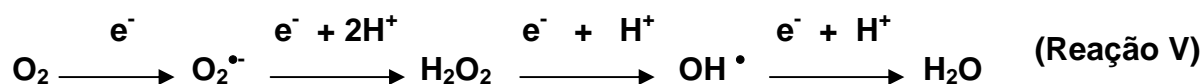
máximo da energia produzida em cada uma. Se a reação ocorresse de uma só vez, com liberação repentina de toda a energia, o aproveitamento seria menor.

A síntese de ATP a partir de ADP, processo denominado fosforilação oxidativa, é realizada com energia liberada da cadeia respiratória. Essa energia provém do auto fluxo de íons hidrogênio gerado por um gradiente de concentração no complexo 5 da membrana interna da mitocôndria (Giordano, 2005). O processo final da respiração celular envolve o transporte dos equivalentes redutores (elétrons), oriundos do Ciclo de Krebs e outras rotas metabólicas, os quais serão transferidos ao oxigênio.

A redução completa de uma molécula de oxigênio à água requer quatro elétrons, redução tetraeletrônica (reação IV), que evita as reações intermediárias e ocorre na cadeia respiratória acoplada à fosforilação oxidativa, pelo sistema citocromo oxidase, que forma ATP (Del Maestro, 1980).



É preciso, porém, ressaltar que nem sempre o oxigênio se transforma em água diretamente. Em cerca de 5% do processo, o oxigênio tem uma tendência forte de receber um elétron de cada vez, redução monoelétrica (reação V), formando, durante as reações, uma série de intermediários tóxicos e reativos que são as espécies reativas de oxigênio (Meneghini, 1987).



Algumas ERO podem gerar radicais livres. Denomina-se que “radical livre (RL) é qualquer espécie química (átomo ou molécula) capaz de existência independente, que possua um ou mais elétrons desemparelhados em qualquer orbital, normalmente no orbital mais externo” (Del Maestro, 1980; Halliwell e

Gutteridge, 1989). As principais ERO formadas em nosso organismo são: radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($\bullet OH$), oxigênio singlet (1O_2) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

1.2 Danos gerados pelos radicais livres

Em 1954, uma investigadora argentina, Rebeca Gerschman, sugeriu pela primeira vez que os radicais livres eram agentes tóxicos e geradores de enfermidades (Perón, 2001).

Em sua estrutura atômica os radicais livres são moléculas que apresentam um elétron desemparelhado, tornando-se assim, moléculas instáveis. Essa estrutura atômica torna os RL extremamente reativos, com capacidade de interagir com uma diversidade de outras, moléculas buscando a sua estabilidade. As moléculas que geralmente reagem com os RL, dando-lhes sua estabilidade são carboidratos, lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e os derivados de cada um deles (Halliwell & Gutteridge, 1989). Quando a produção de RL exceder a capacidade das células de neutralizá-las, é criada uma condição conhecida como estresse oxidativo (Sies, 1991). O estresse oxidativo está envolvido em uma série de condições patológicas, tais como, desordens cardíacas (Khaper e Singal, 1997; Singal et al. 1998), hipertensão arterial (Belló-Klein et al. 2001), catarata, doença de Parkinson, diabete, carcinogênese, envelhecimento e danos provocados pela isquemia e reperfusão (Halliwell, 1987). Muitas alterações cardiovasculares têm sido associadas a um efeito de exposição constante às ERO. Giordano (2005), descreve que o mecanismo de hipertrofia e apoptose cardíaca, assim como alterações na contratilidade, envolve produção de ERO como ativadores das vias de sinalização intracelular. Estes mecanismos de atuação podem ser melhor compreendidos na figura 1.

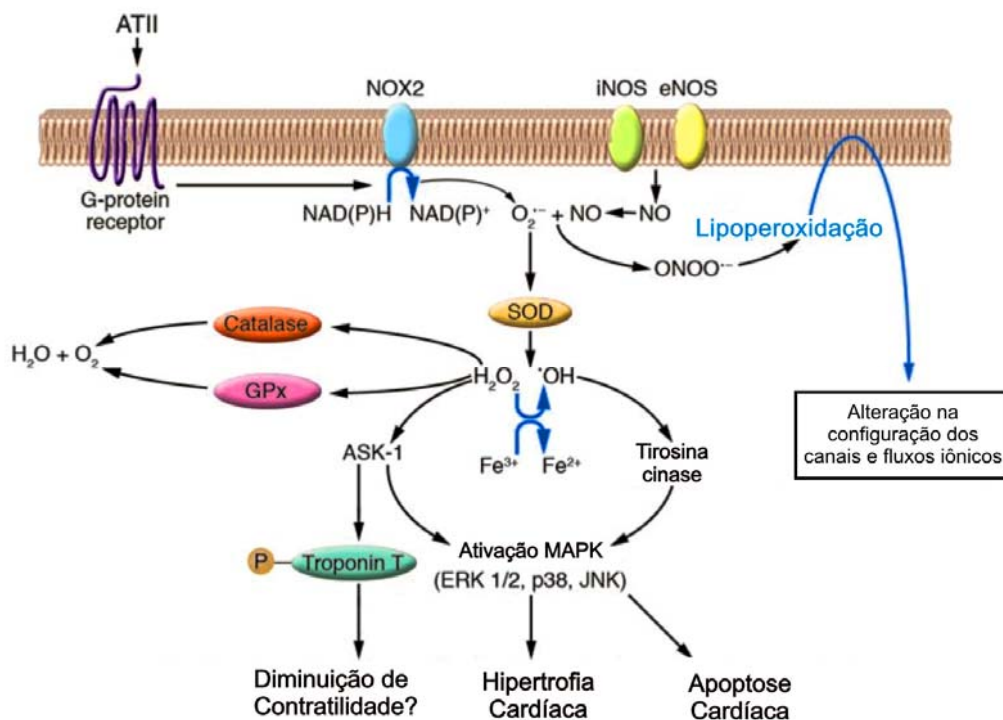


Figura 1. Adaptado de Giordano, 2005.

A angiotensina II (ATII) liga-se ao receptor associado à proteína G, iniciando a cascata de eventos que envolve a ativação da produção de radical superóxido pela NAD(P)H oxidase. O radical superóxido é convertido, pela sua dismutase, em peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. Esses são mediadores da ativação de MAPK via tirosina cinase, as MAPKs ativadas (ERK 1/2, p38, JNK) que iniciam o processo de hipertrofia ou apoptose das células. As ERO também podem gerar sinal via ASK -1 (cinase sinalizadora de apoptose 1), ativando as MAPKs ou a fosforilação da troponina T, que atua nos miofilamentos, podendo gerar alteração na contratilidade cardíaca (Giordano, 2005).

Outro mecanismo importante na adaptação do coração ao aumento da produção de ERO, segundo Nishizawa et al. (1999), é o aumento da expressão de proteínas de choque térmico (HSP). A HSP 70 tem sido relacionada como responsável por melhorar a resposta à isquemia-reperfusão miocárdica, tendo como

fatores de ativação desse sistema o sexo e atividade física, dentre outros (Brown et al. 2005; Thompson et al. 2003).

Também atua nesse complexo sistema de adaptação e proteção cardiovascular o óxido nítrico (NO), produzido pela NO sintase (iNOS e eNOS), que pode interagir com o radical superóxido formando peroxinitrito e, conseqüentemente, induzindo lipoperoxidação (LPO). Esse evento altera a funcionalidade dos canais iônicos e da capacidade de manutenção do equilíbrio homeostático celular. Dessa forma, temos uma atuação paradoxal do NO, pois atua como importante fator vasodilatador intrínseco, facilitando a perfusão tecidual e mediador de dano oxidativo pela produção do peroxinitrito.

As lesões geradas pelos RL ocorrem através de reações em cadeia (Figura 2). Dessa maneira, é gerada uma cascata de reações que danificam a membrana celular. Há alterações da permeabilidade e capacidade de manter o equilíbrio hidroeletrolítico da célula, provocando edema e morte celular. Esse processo é conhecido como lipoperoxidação, que gera subprodutos como o malondialdeído, cuja determinação nos tecidos é uma das formas de se mensurar a reatividade dos RL (Perón, 2001).

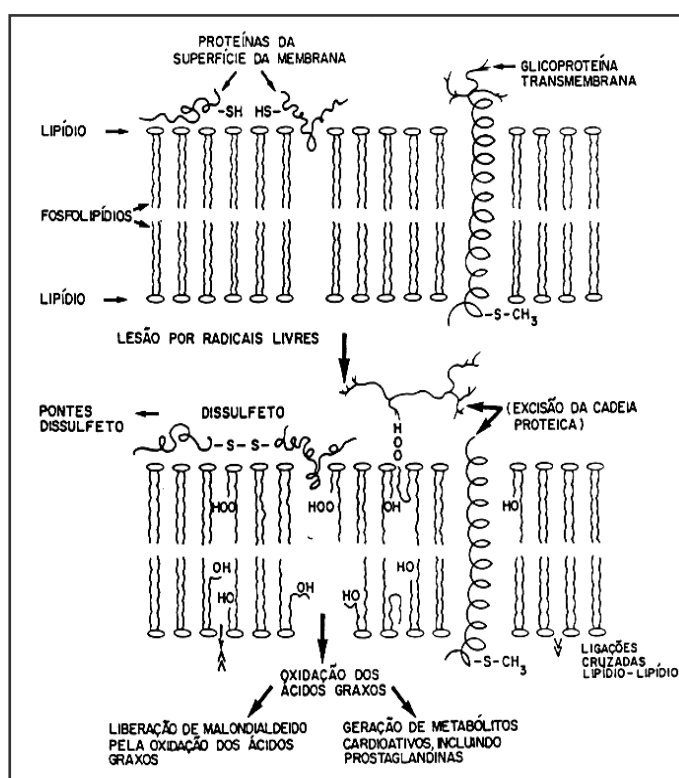


Figura 2. Efeito da LPO na membrana plasmática.

Outras moléculas que podem ser afetadas pelos RL são as do DNA. Os danos aos ácidos nucléicos produzem modificações que trazem sérias conseqüências ao desenvolvimento normal, gerando mutações e podendo originar carcinogênese ou a inibição de expressão gênica por dano em gene específico (Perón, 2001). Contudo, os alvos primordiais dos RL são os lipídios e as proteínas das membranas celulares. A concentração no estado estacionário de RL nos diferentes tecidos de mamíferos aumenta com o estresse, o fumo, a radiação (raios X e ultravioleta) e a poluição (Olszewer, 1992). O nosso organismo apresenta sistemas de defesa, representados principalmente pelas enzimas antioxidantes que neutralizam boa parte dos radicais livres formados.

1.3 Defesas antioxidantes

As ERO, ao reagirem com biomoléculas, causam diferentes tipos de danos que podem levar à morte celular. Os organismos aeróbios desenvolveram diversas formas de defesas antioxidantes - enzimáticas e não-enzimáticas - prevenindo a formação de ERO, bem como, mecanismos para reparar os danos causados pelos mesmos.

Segundo Halliwell e Gutteridge (1989), “antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas às de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato - enzimático ou não enzimático”.

A defesa do organismo contra as ERO vai desde: a) prevenção da formação das ERO; b) interceptação dos radicais formados e c) reparo das células danificadas. Os sistemas que previnem a formação de ERO são considerados biomoléculas ligantes de metais (Fe^{+2} e Cu^{+2}), que são os quelantes. Em termos de interceptação dos radicais formados temos as enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) e as defesas não enzimáticas, por exemplo, as vitaminas C,E, carotenóides e estrogênio.

A distribuição das enzimas antioxidantes nas células está intimamente relacionada com as fontes de ERO. Estão em maior quantidade em locais

particularmente expostos às ERO.

A SOD é a enzima que atua primeiramente sobre o radical superóxido, dismutando essa molécula a peróxido de hidrogênio. Existem três isoformas dessa enzima: a cobre/zinco dependente (Cu/Zn dependente), a manganês dependente (Mn/SOD) e a ferro dependente (Fe/SOD). Sua atividade varia conforme o tecido sendo que os níveis mais elevados se encontram no fígado, glândula adrenal, rins e baço. A SOD apresenta uma isoforma mitocondrial (Mn SOD) e uma isoforma citosólica (Cu/Zn SOD), havendo também isoforma extracelular (Halliwell & Gutteridge, 1999).

A CAT atua na decomposição do peróxido de hidrogênio juntamente com a GPx. A CAT apresenta-se em maior concentração nos peroxissomas e em menor nas mitocôndrias. A GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio à água, às custas da oxidação da GSH (glutathiona reduzida) à GSSG (glutathiona oxidada). Esse processo de oxidação da glutathiona é catalisado pela enzima glutathiona peroxidase, conforme reação VI (Halliwell & Gutteridge, 1989).



Existem duas isoformas de glutathiona peroxidase, uma selênio dependente (Se/GPx) e uma selênio independente (não Se/GPx). A forma Se independente é encontrada no citosol e não apresenta grande capacidade de redução do H₂O₂. A GPx apresenta maior afinidade pelo peróxido de hidrogênio quando esse se encontra em altas concentrações no citosol (Ferreira, 1997).

Caso outros mecanismos antioxidantes (interceptação e prevenção) falhem, há o mecanismo de reparo das biomoléculas modificadas: reparo do DNA e a proteólise de proteínas oxidadas. O mecanismo de reparo do DNA se dá pela excisão das bases. A enzima DNA glicosilase remove as bases danificadas (cliva a ligação entre a base nitrogenada e a pentose) e libera o sítioapurínico/apirimidínico (AA), este é reconhecido por uma DNA-endonuclease que corta a cadeia no sítio AA. A porção danificada da enzima é removida e o DNA

recém sintetizado preenche este espaço, que pela ação da DNA-ligase une ao resto da cadeia (Niki, 1993; Sies, 1991).

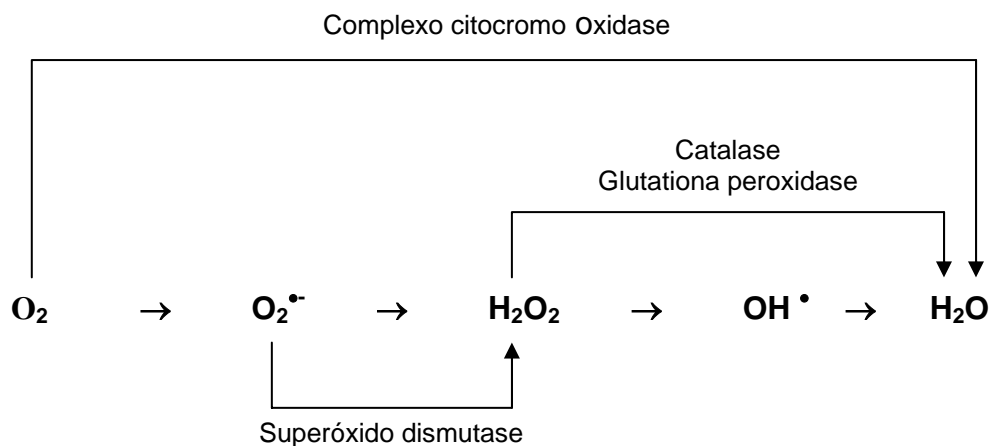


Figura 3. Mecanismo de defesa enzimática contra as ERO (Del Maestro, 1980).

Existe uma variedade de antioxidantes não-enzimáticos que previnem o dano dos RL nos tecidos. Antioxidantes lipofílicos como tocoferóis, carotenóides, bioflavonóides e antioxidantes hidrofílicos como o ascorbato, glutaciona, indóis e catecóis. O α -tocoferol, também chamado vitamina E, é um antioxidante lipossolúvel quebrador de reações em cadeia (*chain breaker*) muito importante: incorporado aos lipídeos de membrana da célula; reage com o radical superóxido, radical hidroxil, radical peroxil convertendo-os em formas menos reativas, agindo como *scavenger* (Sies & Murphy, 1991).

O antioxidante β -caroteno é o neutralizador mais potente do oxigênio singlet, conhecido como *quencher* do oxigênio singlet, impedindo a formação de lipídios hidroperóxidos; possui propriedades antioxidantes particulares a uma baixa pressão de oxigênio (Krinsky, 1989). A vitamina C é um antioxidante hidrossolúvel inibidor de reações em cadeia; reage diretamente com o superóxido e com oxigênio singlet; regenera o tocoferol, quando interage com o radical tocoferil, convertendo-se em radical ascorbil, muito estável (Bisby, 1990; Sies & Murphy, 1991).

1.4 Estrogênio

O estrogênio é um hormônio esteróide sintetizado nos ovários a partir do colesterol. A principal fonte geradora de estrogênio nas mulheres no período fértil são as células da granulosa, durante a fase folicular do ciclo sexual. Três formas de estrogênio estão presentes de maneira significativa no plasma feminino humano, são elas: estrona, estriol e estradiol. O principal estrogênio secretado pelos ovários é o estradiol tendo sua ação muitas vezes maior do que os outros dois juntos, apesar dos efeitos estrogênicos da estrona não serem desprezíveis (Ackerman & Carr, 2002).

A função principal do estrogênio é o crescimento dos tecidos, dos órgãos sexuais femininos e de outros tecidos relacionados com a reprodução. Sendo também atuante no metabolismo e deposição de proteínas e gorduras. Recentemente, tem sido atribuído ao estrogênio um importante papel antioxidante e vasodilatador.

Visto sua conformação química, com um grupamento hidroxil fenólico na posição 3 e um grupo metil na posição 13 (figura 4), o estrogênio assume um papel de *scavenger* de radicais livres de oxigênio.

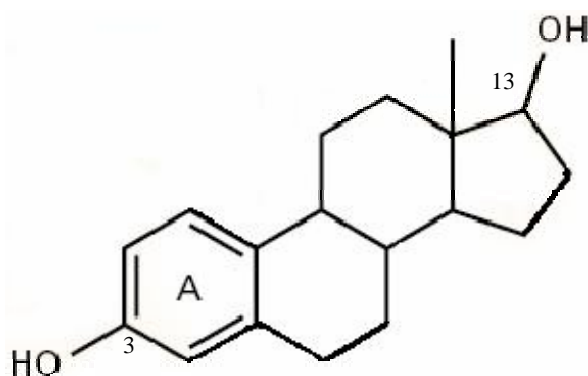


Figura 4. Estrutura química do estrogênio 17-β estradiol.

Além disso, o estrogênio induz a expressão das enzimas antioxidantes, estimulando o sistema de defesa antioxidante (Massafra et al 1998). Semelhante benefício, de estimulação do sistema antioxidante, é obtido por meio da prática de atividade física. Esta fortalece a capacidade antioxidante e soma-se ao melhor condicionamento do sistema cardíaco e vascular, resultantes de adaptações fisiológicas como o aumento do número de mitocôndrias nas células da musculatura esquelética e maior expressão da eNOS.

1.5 Atividade física

Diversas são as formas pelas quais se tem buscado um meio profilático ou curativo para as doenças cardiovasculares. Os acidentes coronarianos estão entre os de maior importância nos acometimentos endêmicos (Timerman, 2001). Acompanhado de uma imposta sobrecarga social, uma maior expectativa de vida, sedentarismo e má qualidade na alimentação, o risco de doenças coronarianas tem crescido anualmente.

Estes fatores conduzem o olhar para uma busca alternativa na prevenção das doenças vasculares e cardíacas. A utilização de drogas na manipulação dessas enfermidades têm sido amplamente investigada.

Há, contudo, um outro vasto campo a ser desbravado. A prática regular de exercício físico tem sido apresentada como uma estratégia não farmacológica eficaz na prevenção das doenças cardiovasculares (Kojda & Hambrecht, 2005), bem como melhora da qualidade de vida dos pacientes.

Isto implica em adaptações do sistema metabólico que irão contribuir para uma maior resistência e maior capacidade de manter a demanda energética. Tais alterações compreendem: aumento no número de mitocôndrias; maior atividade das enzimas antioxidantes; aumento no número e tamanho dos peroxissomas; aumento do número de capilares nas fibras musculares, melhorando a capacidade de perfusão e aporte sangüíneo nos tecidos musculares (Wilmore & Costill, 1994).

Além do aumento do fluxo sanguíneo nos músculos, em virtude de uma maior rede capilar, podemos citar como importantes mecanismos de adaptação fisiológica, em virtude da atividade física, a diminuição da pressão arterial em repouso em indivíduos com hipertensão moderada, diminuição da frequência cardíaca em repouso e melhora do trabalho cardíaco (Scott & Howley, 2000).

Trabalhos recentes feitos com ratos demonstram que a atividade física sob média e alta intensidade são capazes de promover proteção cardiovascular quando o coração desses animais é submetido a uma isquemia e posterior reperfusão (Lennon et al. 2004; Powers et al. 1998).

As lesões causadas pela isquemia são reportadas, em grande parte, ao aumento dos radicais livres e outras ERO, tendo esses um papel chave no processo de injúria tecidual (Powers, 1998). Paradoxalmente, quando restabelecida a circulação, a presença do oxigênio pode gerar eventos como arritmias. Alguns estudos têm reportado que a atividade física é capaz de aumentar tanto a atividade enzimática antioxidante quanto os níveis de glutathione (Belló-Klein et al. 2000; Khassaf et al. 2001; Ji, 1993; Higuchi et al. 1985; Jenkins et al. 1984).

Dessa forma, as alterações geradas pela atividade física são comumente utilizadas como parâmetros da adaptação e efetividade de um treinamento. Essas alterações também contribuem com a prevenção e em alguns casos tratamento de doenças como, por exemplo, a hipertensão (Radák et al. 1999; Pagani et al. 1988).

Como consequência, a atividade física condiciona o organismo a melhor lidar com as situações de estresse oxidativo. Além desse fato, devemos salientar outros importantes como a indução da atividade da eNOS (óxido nítrico endotelial) principalmente pelo estresse de cisalhamento, aumento intermitente de ERO, aumento da produção de superóxido e remodelamento vascular (angiogênese e arteriogênese) (Kojda & Hambrecht, 2005).

Estudo realizado por Wang et al. (1993) demonstrou que o treinamento físico aumenta a vasodilatação dependente do endotélio nas artérias epicárdicas

de cães. Evidências sugerem uma ativação de NO induzida pelo exercício como um mecanismo importante no benefício cardiovascular pela atividade física (Hambrecht et al. 2003).

Estudos realizados *in vivo* têm demonstrado que o exercício resulta no aumento da expressão de eNOS nas células vasculares endoteliais (Fleming & Busse, 2003; Fukai et al. 2000; Kojda et al. 2001; Hambrecht et al. 2003).

Efeito importante foi observado em estudo realizado por Hambrecht et al. (2000) no qual pacientes com insuficiência cardíaca crônica tiveram melhora no desempenho cardíaco e uma redução da cardiomegalia após passarem por um protocolo de treinamento de 6 meses em bicicleta ergométrica durante 20 minutos por dia com pico de VO₂ a 70%.

Resultados anteriores obtidos neste laboratório, em estudo realizado por Morgan-Martins (2003), na perfusão isolada do coração de ratas castradas, quando submetidas a 30 minutos de isquemia e 20 minutos de reperfusão, demonstraram aumento da pressão diastólica do VE (contratura isquêmica) muito superior aos animais controle. A reposição do estrogênio, porém, reverteu esse efeito trazendo os valores de pressão para os mesmos níveis das ratas controle.

2. HIPÓTESE

Baseados nesses dados, hipotetizamos que o benefício gerado pelo exercício físico programado, em ratas castradas, é capaz de melhorar o perfil antioxidante sistêmico, muscular periférico e cardíaco. Melhorando, portanto, a função mecânica do coração submetido à isquemia e reperfusão. Assim, as alterações induzidas pelo exercício seriam semelhantes às produzidas pela terapia de reposição hormonal.

3. OBJETIVOS GERAIS

Verificar o efeito de um programa de atividade física sobre a mecânica cardíaca, estresse oxidativo sistêmico e dos músculos cardíaco e gastrocnêmio em ratas controle e castradas.

3.1 Objetivos específicos

1. Analisar a atividade da glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase do músculo gastrocnêmio.
2. Verificar a lipoperoxidação do músculo gastrocnêmio pelo método de quimiluminescência.
3. Verificar a atividade sistêmica da glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase.
4. Verificar a lipoperoxidação sistêmica pelo método de quimiluminescência.
5. Analisar o conteúdo de nitratos totais e carbonilas plasmáticos.
6. Analisar a atividade da glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase do músculo cardíaco.
7. Verificar a lipoperoxidação do músculo cardíaco pelo método de TBARS.
8. Analisar a função mecânica cardíaca por meio de perfusão pelo método de Langendorff.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Neste estudo foram utilizadas 100 ratas Wistar fêmeas (200-250 gramas), provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS. Elas receberam água e ração Nutripal (Moinhos Purina, Porto Alegre, RS) *ad libitum*.

Os animais foram mantidos sob 12 horas de luz/ 12 horas de escuridão e sob temperatura de 22 a 25°C.

4.2 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

Controle sedentário (S): os animais (n=22) foram submetidos a uma cirurgia fictícia de castração e não submetidos ao protocolo de treinamento.

Controle treinado (T): os animais (n=28) foram submetidos à cirurgia fictícia de castração e ao protocolo de treinamento.

Castrado sedentário (CS): os animais (n=22) foram submetidos à cirurgia de castração e não submetidos ao protocolo de treinamento.

Castrado treinado (CT): os animais (n=28) foram submetidos à cirurgia de castração e ao protocolo de treinamento.

4.3 Cirurgia de castração

Esse procedimento cirúrgico consiste na retirada dos ovários com a finalidade de promover uma redução drástica dos níveis de estrogênio circulantes. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de xilazina (10 mg/kg de peso do animal) e quetamina (90 mg/kg de peso do animal). Foi realizada uma incisão lateral, logo abaixo das costelas na derme e peritônio (figura 5.A), até a visualização de uma massa de gordura que delimita o ovário (figura 5.C). Logo

que o ovário era identificado efetuava-se a ligadura da tuba uterina e um corte distal a essa, retirando dessa forma o ovário (figura 5.E). A sutura da incisão foi realizada em planos separados, primeiramente o peritônio e músculo e depois tecido cutâneo (figura 5.F). O procedimento foi realizado em ambos os lados do animal (Baker et al. 1979).

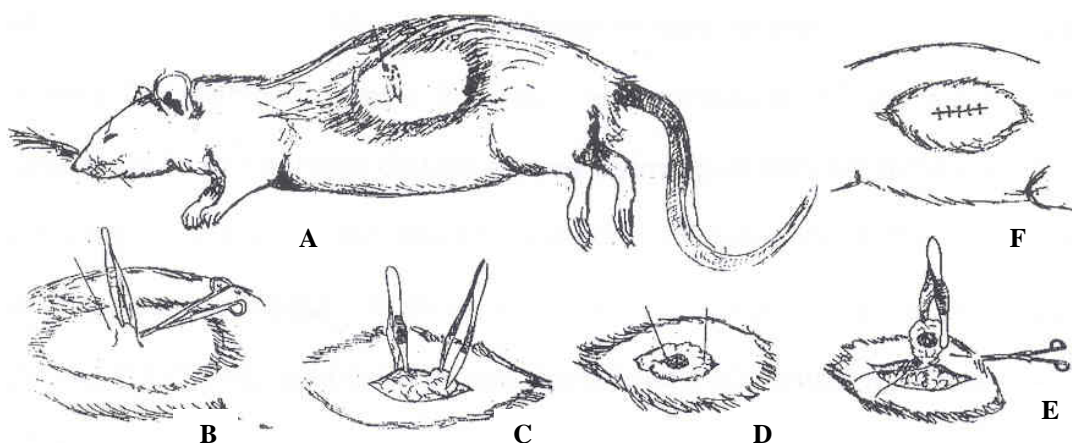


Figura 05. Cirurgia de castração.

4.4 Protocolo experimental

Os animais foram retirados do biotério com 2 meses de idade sendo separados aleatoriamente em caixas com 4 animais cada. Após esse procedimento, foram realizadas as cirurgias de castração ou fictícias. No terceiro dia após a cirurgia, foi iniciada a adaptação dos animais na esteira rolante.

A adaptação foi de 5 dias, sendo igual para todos os animais, independentemente do grupo a que pertenciam. No quinto dia da adaptação, foi realizado o teste de esforço desses animais, sendo progressivo em carga, com aumento da velocidade de 0,3 Km/h a cada 3 minutos. Esse serviu de parâmetro para o protocolo de treinamento.

Após a adaptação, os animais dos grupos treinados iniciaram o protocolo de treinamento de oito semanas, 5 dias por semana. Novos testes de esforço foram feitos na quarta e oitava semanas de treinamento, sendo que nos dias de

teste de esforço os animais não realizavam treinamento. Os animais sedentários foram colocados a caminhar na esteira 1 vez por semana durante 10 minutos a uma velocidade de 0,3 Km/h (Irigoyen et al. 2005).

Este experimento foi repetido por três vezes a fim de que se pudesse fazer coleta de sangue e tecido para todas as análises propostas. Caracterizando-se da seguinte forma:

1º e 2º Experimentos (76 animais) – Perfusão do coração e coleta de tecidos. Após as oito semanas do protocolo, foi coletado sangue dos animais e, 24 horas após, foram mortos, sendo feita a coleta do músculo gastrocnêmio e perfusão do coração isolado.

3º Experimento (24 animais) – Análise temporal de estresse oxidativo e coleta de tecidos. Foi retirado sangue dos animais na primeira semana, na quarta e na oitava semanas após a adaptação, a fim de se fazer análise temporal das carbonilas. Após as oito semanas, os animais foram mortos e retirado o coração para medidas enzimáticas e de lipoperoxidação.

4.5 Coleta de sangue

Para a coleta de sangue, o animal foi submetido à anestesia etérea e após foi realizada a punção do seio retro-orbital. O sangue foi acondicionado em frascos com heparina devidamente identificados.

4.6 Preparação das amostras de sangue e plasma

Foi coletado aproximadamente 1 mL de sangue, em tubo heparinizado e centrifugado a 3000 rpm durante, 15 minutos, em centrífuga refrigerada. O plasma foi separado e congelado a -70°C para a determinação das carbonilas.

Os glóbulos vermelhos foram lavados com soro fisiológico (NaCl 0,9%), novamente centrifugados e aliqotados. Uma parte foi ressuspensa em soro para medida de quimiluminescência, ao restante foi adicionada uma solução de ácido acético 1 mmol/L e sulfato de magnésio 4 mmol/L (solução para enzimas), as

amostras foram congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análise de atividade da catalase, glutathiona peroxidase e superóxido dismutase.

4.7 Preparação dos homogeneizados de tecido

Cada rato foi pesado (balança Marte) e morto com uma pancada na cabeça e deslocamento cervical. O tórax foi aberto e rapidamente removido o coração e, instantes depois, o músculo gastrocnêmio esquerdo. Os músculos cardíaco e gastrocnêmio foram lavados por três vezes em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15%, secos e pesados; em seguida, homogeneizados. Para cada grama de tecido, foram acrescentados 5 mL de KCl. Foram acrescentados 10 μL de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), 100 mmol/L, para cada 1 ml do homogeneizado e 15 μL de solução de Triton a 10% para cada 1 grama de músculo gastrocnêmio. Após os tecidos foram colocados em tubos onde foram homogeneizados em Ultra-Turrax por 40 segundos e centrifugados em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B - Rotor SM 24) por 10 minutos ($0 - 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Llesuy et al. 1985).

4.8 Técnicas de lipoperoxidação

4.8.1 Teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

A técnica do TBA-RS consiste em aquecer o material biológico a ser testado na presença do ácido tiobarbitúrico (TBA), sob condições ácidas e medir a formação de um produto cor de rosa, espectrofotometricamente. Para tanto, foi utilizada uma alíquota de 0,5 mL dos homogeneizados de tecido cardíaco e músculo gastrocnêmio ao qual foi adicionado 1,5 mL de TBA (0,67%) e 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) à 10%. A mistura foi incubada por 15 minutos a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após, o material foi esfriado e centrifugado por 10 minutos a 2500 rpm, sendo desprezado o precipitado e o sobrenadante utilizado para a leitura no espectrofotômetro (535 nm). Os resultados foram expressos em nmoles de TBA-RS/ mg de proteína (Buege & Aust, 1978).

4.8.2 Quimiluminescência

O método consiste em adicionar um hidroperóxido orgânico de origem sintética ao homogeneizado de tecido, avaliando-se a capacidade de resposta produzida pela amostra. A realização deste tipo de teste consiste no fato de que os hidroperóxidos são espécies químicas bastante instáveis, reagindo com lipídios por um mecanismo radicalar que gera produtos que emitem luz pela amostra em estudo. A quimiluminescência (QL) foi medida em contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer). O meio de reação no qual foi realizado o ensaio consistiu em 3,5 mL de uma solução reguladora de KCl 140 mmol/L, fosfatos 20 mmol/L, (pH 7,4), na qual foi adicionado o homogeneizado de tecido. Os resultados foram expressos em contagens por segundo (cps), por miligrama de proteína (González-Flecha et al. 1991).

4.9 Técnica de oxidação de proteínas

4.9.1 Carbonilas

A avaliação das carbonilas foi realizada de acordo com o método descrito por Reznick & Packer (1994). Consiste na reação da dinitrofenilhidrazina (DNPH) com as carbonilas das proteínas formando hidrazonas que podem ser medidas espectrofotometricamente. Foi colocado 0,8 mL de DNPH com 0,2 mL de plasma em um tubo para que ocorresse reação do DNPH com as carbonilas da amostra. Os tubos foram incubados por uma hora, no escuro, e agitados a cada quinze minutos.

Após foi adicionado 1 mL de solução de TCA 20% nos tubos. Colocou-se no gelo por 10 minutos e centrifugou-se por cinco minutos em centrífuga refrigerada a 3000 rpm. Em seguida, acrescentou-se ao precipitado 0,8 mL de TCA 10% e agitou-se mecanicamente com bastão de vidro. O precipitado foi lavado por três vezes com 0,8 mL de etanol – acetato de etila (proporção 1:1) para remover o DNPH livre e lipídios contaminantes. O precipitado final foi dissolvido em 0,4 mL de guanidina 6M e agitado por 10 minutos à 37°C. O material insolúvel foi removido por centrifugação adicional. O sobrenadante foi lido

em espectrofotômetro a 360 nm e o resultado foi expresso em nmol/mg de proteína.

4.10 Dosagem da atividade antioxidante

4.10.1 Catalase

O ensaio consiste em medir a diminuição da absorbância do peróxido de hidrogênio a 240 nm. A medida espectrofotométrica consiste em colocar nas cubetas o meio de reação (solução reguladora de fosfato 50 mmol/L - pH 7,2) com as alíquotas das amostras (no caso, homogeneizados dos tecidos). Logo, foram agregados 20 µL de H₂O₂ (300 mol/L), o que resulta numa concentração final de H₂O₂ de 2 mmol/L. A atividade enzimática foi expressa em pmoles/mg de proteína (Aebi, 1984).

4.10.2 Superóxido dismutase

A superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. A técnica baseou-se na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. O superóxido é gerado pela autooxidação do pirogalol quando em meio básico, a SOD presente na amostra compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. Portanto, quanto maior for a concentração de SOD na amostra, menor seria a autooxidação do pirogalol.

A atividade da enzima SOD foi determinada em homogeneizados pela inibição da autooxidação do pirogalol a 420 nm. Foi estabelecida uma curva padrão de SOD, disponível comercialmente. A atividade da enzima foi expressa em U SOD/mg de proteína (Marklund, 1985).

4.10.3 Glutationa peroxidase

A atividade da enzima pode ser determinada medindo-se o consumo do complexo enzimático catalisador (NADPH) na reação de redução da glutatona oxidada (GSSG) acoplada à reação da GPx. A atividade da GPx (em nmoles/min/mg prot.) foi determinada num espectrofotômetro, medindo a

oxidação do NADPH a 340 nm em um meio de reação contendo solução reguladora de fosfatos 50 mmol/L (pH 7,0), NADPH 0,1 mmol/L, GSH 0,17 mmol/L, glutationa redutase 0,2 U/mL e t-BOOH 0,5 mmol/L (Flohé & Gunzler, 1984).

4.11 Determinação de nitratos

Os níveis de nitratos e nitritos no plasma e tecido foram medidos pela reação das amostras com o reagente de Griess. Alíquotas de 50 μ L foram incubadas com cofatores enzimáticos e nitrato redutase por 30 minutos em temperatura ambiente, para conversão de nitrato em nitrito. O nitrito formado foi analisado pela reação deste com o reagente de Griess. O composto formado foi medido espectrofotometricamente no comprimento de onda de 540 nm e expresso em mmol/L (Granger et al. 1999).

4.12 Quantificação de proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry et al. (1951) que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1 mg/mL. A medida foi efetuada em espectrofotômetro a 625 nm e os resultados expressos em mg/mL.

4.13 Perfusão do coração isolado

4.13.1 Perfusato

Foi utilizada, como perfusato, a solução de Krebs-Henseleit. Essa solução foi composta de: NaCl 120 mmol/L; KCl 5,4 mmol/L; $MgCl_2$ 1,8 mmol/L; $CaCl_2$ 1,25 mmol/L; $NaHCO_3$ 27 mmol/L; NaH_2PO_4 2 mmol/L; Na_2SO_4 1,8 mmol/L e glicose 11,1 mmol/L.

Foram preparadas três soluções-estoque: uma a base de cloretos, contendo NaCl, KCl e $MgCl_2$; outra à base de “sódios” contendo Na_2SO_4 , $NaHCO_3$ e NaH_2PO_4 ; e outra contendo $CaCl_2$. As soluções-estoque foram preparadas com uma concentração 20 vezes maior que aquela usada nas perfusões.

A fim de preparar um litro de perfusato, misturou-se 50 ml da solução de cloretos, 50 ml da solução de “sódios”, 12,5 ml da solução de cloreto de cálcio e 2 gramas de glicose, completando o volume com água destilada. Posteriormente, o perfusato foi filtrado através de uma membrana GS e éster de celulose com 0,22 μm de poro e 47 mm de diâmetro (Millipore, SP), minutos antes de ser utilizada para a perfusão dos corações.

4.13.2 Procedimento

Os animais foram mortos por pancada na cabeça e deslocamento cervical. Para a avaliação da mecânica cardíaca, foi retirado o coração imediatamente após a morte do animal. A aorta foi canulada e fixada ao aparelho de perfusão de Langendorff (Hugo Sachs Elektronik, Alemanha), conectado a uma bomba de fluxo, mantendo constante o fluxo de perfusão em 11ml/min (figura 06). Foi mantida uma perfusão, com entrada do perfusato pelos óstios coronários direito e esquerdo. O fluxo de 11 ml/min foi escolhido com base nos resultados obtidos por Oliveira (1993), em estudo comparando resposta da mecânica cardíaca com diferentes fluxos na perfusão de coração isolado de rato.

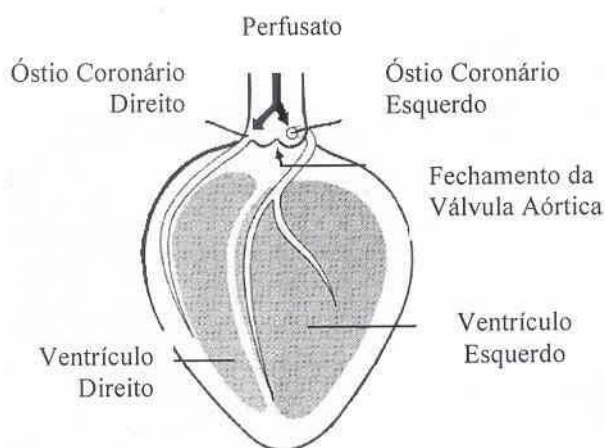


Figura 06. Perfusão do coração através da aorta.

Em seguida, foi introduzido no ventrículo esquerdo um balonete ligado a um transdutor de pressão e a uma seringa para fixar a pré-carga do ventrículo esquerdo (figura 07).

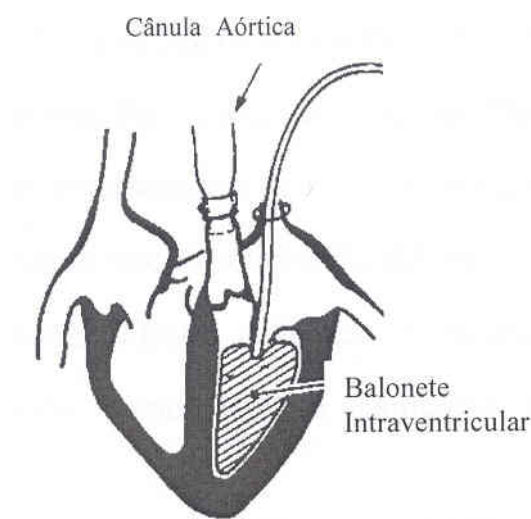


Figura 07. Posição do balonete no ventrículo esquerdo.

Tanto a cânula fixada na aorta como o balonete intraventricular estavam conectados a transdutores de pressão e ligados a um sistema de aquisição de dados PLUGSYS da Hugo Sachs Elektronik Alemanha.

O programa utilizado foi o *Bios Setup* da *American Megatrends Inc.* Esse programa converte os dados da planilha D-Base utilizando o programa ISOHEART, o qual fez o registro dos parâmetros analisados durante o período experimental.

O protocolo de perfusão foi composto das seguintes fases:

Estabilização (20 min.) - foi mantida a pressão dentro do balonete do ventrículo esquerdo em 10 mmHg;

Controle (10 min.) – a bomba de fluxo foi mantida ligada, sem que houvesse alteração externa na pressão do balonete intraventricular.

Resposta a diferentes níveis de pressão diastólica (curva de função cardíaca) - variação de 10 mmHg a cada 5 minutos indo de 10 mmHg de pressão diastólica até 40 mmHg.

Estabilização (10 min.) – após o término da curva de função cardíaca, a pressão do balonete foi fixada em 10 mmHg, antes da isquemia;

Isquemia (20 min.) – durante esse período a bomba de fluxo foi desligada;

Reperusão (20 min.) – a bomba de fluxo foi religada, sem que houvesse alteração externa na pressão do balonete intraventricular.

4.14 Análise estatística

Com base nos resultados das análises, foram calculadas as médias e os erros padrão das médias para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados. Para a comparação entre os grupos de dados não pareados foi utilizado o software GraphPad InStat, versão 3.00 para Windows e foi aplicada análise de variância de uma via (ANOVA), complementado com o teste de Student-Newmann-Keuls. Para análise de medidas repetidas foi utilizado o software PROC MIXED SAS. Para comparações múltiplas o teste de Tukey-Kramer.

As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentou $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados na seguinte ordem:

5.1 Teste de esforço

A figura 8 mostra a comparação do teste de esforço (TE) dos diferentes grupos, onde pode-se perceber que no 1º TE, feito após o período de adaptação, não há diferenças entre os grupos. No entanto, a partir do 2º TE, feito na 4ª semana do protocolo, os grupos treinados (T e CT) apresentaram diferença significativa com relação aos grupos sedentários (S e CS). Essa diferença se manteve também no 3º TE realizado na oitava semana do protocolo (Figura 08).

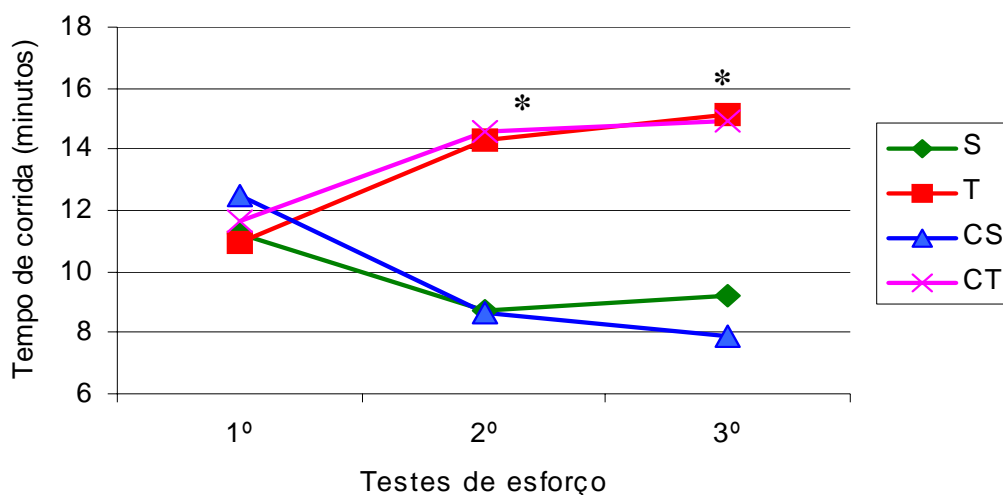


Figura 08. Resultado dos três testes de esforço nos diferentes grupos. Dados expressos em média \pm EPM. Onde: CS (n=22) – castrado sedentário; CT (n=28) – castrado treinado; S (n=22) controle sedentário e T (n=28) – controle treinado.

n = número de animais por grupo.

* diferença significativa de T e CT vs S e CS ($p < 0,05$).

5.2 Estresse oxidativo de gastrocnêmio na 8ª semana do protocolo experimental

A comparação entre os grupos S, T, CS e CT em termos da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e lipoperoxidação pelo método de quimiluminescência (QL) é apresentada na Tabela 1. Houve aumento significativo do grupo controle treinado (T) e castrado sedentário (CS) com relação aos grupos controle sedentário (S) e castrado treinado (CT) na atividade da SOD ($p < 0,05$). Na atividade da catalase, houve diferença ($p < 0,05$) entre os grupos castrado sedentário e castrado treinado. Portanto, o treinamento sem castração e a castração sem treinamento aumentaram a atividade da SOD e a castração aumentou a atividade da CAT. Também houve diferença ($p < 0,05$) na atividade da glutathione peroxidase do grupo castrado treinado, sendo menor com relação ao controle treinado. Na quimiluminescência, observamos uma redução ($p < 0,05$) do grupo castrado treinado com relação ao grupo castrado sedentário; também do grupo controle treinado com relação ao grupo controle sedentário.

Tabela 1. Perfil oxidativo do gastrocnêmio na 8ª semana do protocolo experimental.

	S	T	CS	CT
SOD (U/mg prot)	5 ± 1 (11)	7 ± 1 (8) *	7 ± 1 (11) *	5 ± 1 (9)
Catalase (pmoles/mg prot)	16 ± 2 (5)	19 ± 2 (5)	22 ± 2 (7) †	14 ± 2 (7)
GPx (nmoles/min/mg prot)	43 ± 5 (6)	59 ± 6 (4)	41 ± 5 (5)	35 ± 2 (5) Ψ
QL (cps/mg prot)	850 ± 42 (6)	546 ± 38 (6) €	804 ± 107 (7)	475 ± 50 (11) β

Dados expressos em média ± EPM. Entre parênteses o número de animais por grupo.

* com relação à S e CT ($p < 0,05$).

† com relação à CT ($p < 0,05$).

Ψ com relação à T ($p < 0,05$).

β com relação à S e CS ($p < 0,05$).

€ com relação à S ($p < 0,05$).

5.3 Estresse oxidativo sistêmico na 8ª semana do protocolo experimental

As medidas das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx e de lipoperoxidação (QL) foram feitas em hemáceas previamente lavadas e preparadas conforme descrito na seção de materiais e métodos. A análise indireta da metabolização do óxido nítrico (NO), a quantificação de nitratos, foi realizada em plasma.

A comparação dos grupos S, T, CS e CT para atividade das enzimas antioxidantes e marcador de lipoperoxidação, bem como produção de NO, é apresentada na Tabela 2. Há diferença significativa do grupo castrado sedentário, sendo maior do que o controle sedentário ($p < 0,05$) na atividade da SOD. Na atividade da catalase não se observa diferença significativa, porém podemos inferir uma tendência ($p = 0,07$) de maior atividade da catalase nos grupos castrados. A atividade da glutathione peroxidase do grupo controle treinado esteve maior do que o controle sedentário ($p < 0,05$) e tanto o grupo controle treinado quanto o castrado sedentário estiveram aumentados com relação ao castrado treinado ($p < 0,05$). Com relação aos nitratos não se observou diferença entre os grupos. Na quimiluminescência, o grupo controle treinado esteve significativamente menor ($p < 0,05$) do que o controle sedentário.

Tabela 2. Perfil oxidativo sistêmico na 8ª semana do protocolo experimental.

	S	T	CS	CT
SOD (U/mg prot)	15 ± 1 (7)	17 ± 2 (5)	22 ± 3 (6) *	21 ± 1 (5)
Catalase (pmol/mg prot)	318 ± 54 (11)	354 ± 30 (10)	464 ± 49 (8)	464 ± 47 (14)
GPx (nmoles/min/mg prt)	52 ± 6 (9)	87 ± 4 (21) * †	77 ± 8 (12) †	53 ± 6 (18)
Nitratos (mmol/L)	1,8 ± 0,3 (7)	1,6 ± 0,1 (5)	1,6 ± 0,1 (6)	1,4 ± 0,1 (6)
QL (cps/mg prot)	14266 ± 1343 (11)	10514 ± 782 (11) *	12021 ± 863 (13)	11498 ± 427 (18)

Dados expressos em média ± EPM. Entre parênteses o número de animais por grupo.

* com relação à S ($p < 0,05$).

† com relação à CT ($p < 0,05$).

5.4 Estresse oxidativo cardíaco na 8ª semana do protocolo experimental

A comparação dos grupos S, T, CS e CT para atividade das enzimas antioxidantes e marcador de lipoperoxidação no tecido cardíaco na 8ª semana do protocolo experimental é apresentada na Tabela 03. Encontramos diferença significativa do grupo controle treinado e castrado treinado, sendo menor do que o castrado sedentário ($p < 0,05$) na atividade da SOD. Na atividade da catalase, o grupo controle treinado foi significativamente menor ($p < 0,05$) do que os grupos controle sedentário e castrado treinado. A atividade da glutathiona peroxidase do grupo castrado sedentário esteve significativamente maior ($p < 0,05$) com relação ao grupo controle sedentário. Com relação ao marcador de LPO (TBARS) não se observou diferença entre os grupos.

Tabela 3. Perfil oxidativo cardíaco na 8ª semana do protocolo experimental.

	S (n=5)	T (n=6)	CS (n=5)	CT (n=6)
SOD (U/mg prot)	10,5 ± 0,5	8,1 ± 0,4 Ψ	13,1 ± 1,2	8,7 ± 0,3 Ψ
CAT (pmol/mg prot)	22,4 ± 0,8	17,6 ± 1,0 * †	20,4 ± 1,6 †	24,3 ± 0,9
GPx (nmoles/min/mg prot)	60 ± 3	62 ± 3	80 ± 6 *	67 ± 5
TBARS (μmol / mg prot)	1,7 ± 0,5	1,6 ± 0,3	1,8 ± 0,6	1,9 ± 0,2

Ψ com relação a CS ($p < 0,05$)

* com relação a S ($p < 0,05$)

† com relação a CT ($p < 0,05$)

5.5 Análise temporal das carbonilas

A comparação dos grupos S, T, CS e CT para oxidação das proteínas (Carbonilas), nos diferentes períodos do protocolo experimental, é apresentada na Tabela 4. A variação dos valores de carbonilas (valor 40º dia – valor 1º dia) durante o período experimental é apresentada na Figura 09.

Tabela 4. Análise sistêmica temporal das carbonilas (oxidação protéica) em nmol/mg de proteína.

	S (n=5)	T (n=6)	CS (n=5)	CT (n=6)
1ª semana	3,8 ± 0,5	6,0 ± 0,7 *	1,7 ± 0,3 * †	3,7 ± 0,5 Ψ
4ª semana	4,1 ± 0,4	5,5 ± 0,3	4,8 ± 0,6	4,1 ± 0,5
8ª semana	2,6 ± 0,2	2,8 ± 0,3	3,8 ± 0,3 *	3,4 ± 0,2

Valores expressos como média ± EPM

* diferente com relação a S (p < 0,05) dentro da mesma semana

† diferente com relação a CT e T (p < 0,05) dentro da mesma semana

Ψ diferente com relação a T (p < 0,05) dentro da mesma semana

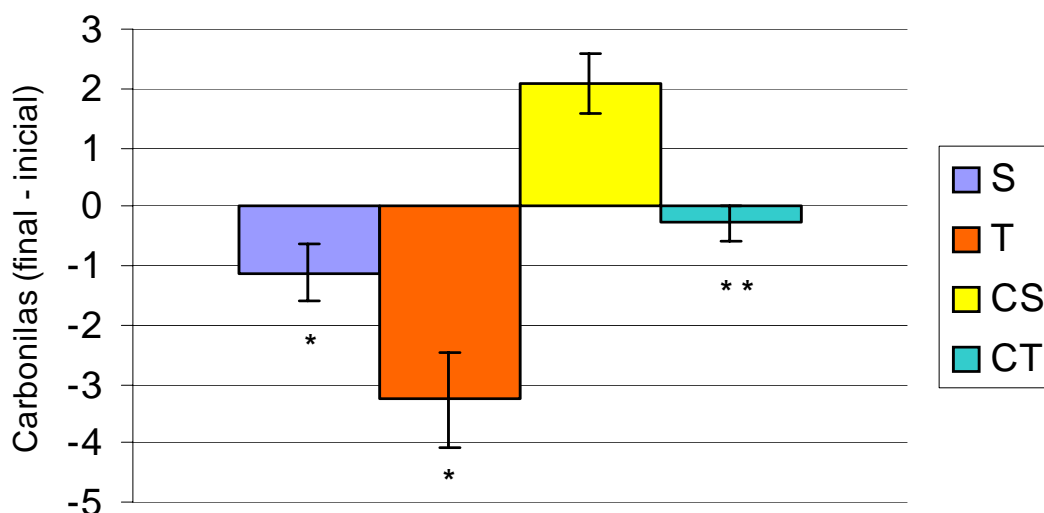


Figura 09. Variação do nível sistêmico das carbonilas (oxidação protéica) do 1º dia (inicial) ao 40º dia (final) do protocolo experimental.

* diferença significativa com relação a CS (p < 0,05)

** diferença significativa com relação a T (p < 0,05)

Observa-se que o treinamento inicialmente aumenta o dano oxidativo a proteínas e que, com o passar do tempo, este é reduzido de modo que ao final do

protocolo experimental não há diferenças em relação ao controle. A castração, ao contrário, reduz inicialmente o nível de carbonilas que vai sendo progressivamente aumentado, sendo essa diferença significativa ao final do protocolo experimental.

Fazendo-se a diferença do dano a proteínas final menos inicial, observa-se que o único grupo que mostra incremento significativo deste parâmetro é o castrado sedentário. Quando os animais são treinados esse dano é revertido.

5.6 Perfusão de coração isolado

5.6.1 Frequência cardíaca

Na análise da frequência cardíaca, quando a pressão diastólica do VE variou de 10 a 40 mmHg, não houve diferença estatística entre os grupos, apesar de podermos observar, conforme a Figura 10, uma tendência ($p=0,058$) de menor frequência cardíaca do grupo controle treinado (T).

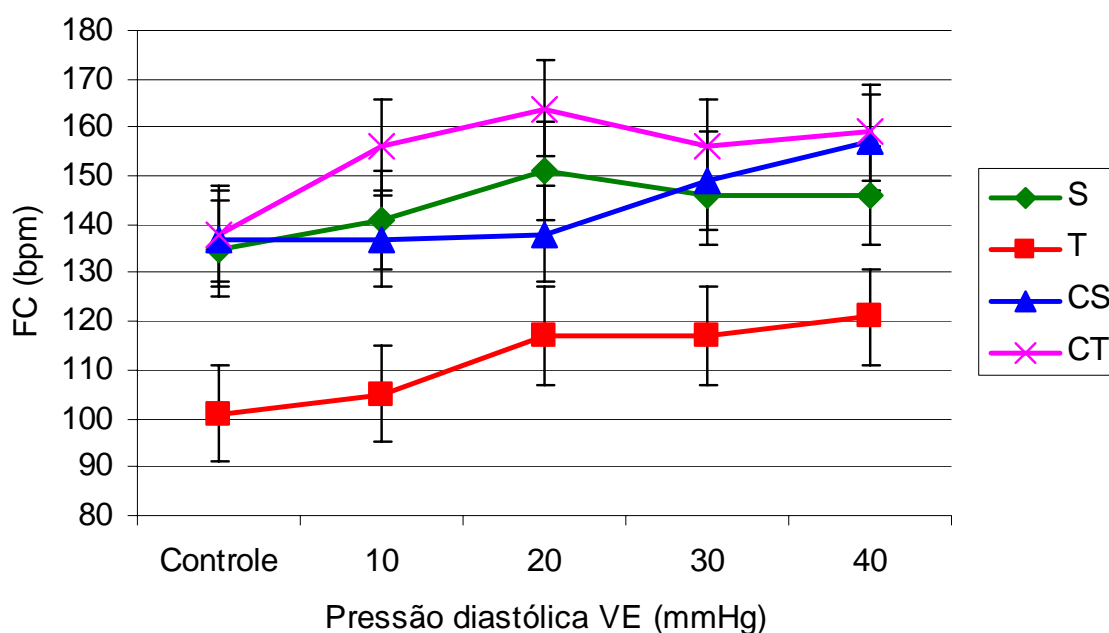


Figura 10. Frequência cardíaca, em batimentos por minuto (bpm), durante a variação de pressão diastólica de 10 a 40 mmHg. Os dados apresentados são a média das médias do último minuto de cada etapa do protocolo, as barras EPM. Onde: S – controle sedentário (n=8), T – controle treinado (n=7), CS – castrado sedentário (n=12) e CT – castrado treinado (n=8). Análise de medidas repetidas ($p=0,058$).

Abaixo, apresentamos os resultados da perfusão de coração isolado durante a isquemia e reperfusão (Tabela 5). Não se observou diferença significativa entre os grupos em nenhum momento dessas etapas, em termos de frequência cardíaca.

Tabela 5. Frequência cardíaca (em bpm) durante isquemia e reperfusão.

Grupo (n)	Estabilização	Isquemia	Reperfusão
S (8)	137 ± 22	0	135 ± 27
T (7)	117 ± 25	0	121 ± 14
CS (12)	163 ± 21	0	173 ± 14
CT (8)	139 ± 31	0	154 ± 25

Os dados apresentados são a média das médias do último minuto de cada etapa do protocolo ± EPM. Onde: S – controle sedentário, T – controle treinado, CS – castrado sedentário e CT – castrado treinado.

5.5.2 Pressão sistólica ventricular esquerda

A análise da variação de pressão sistólica ventricular esquerda, em resposta à variação de pressão diastólica de 10 a 40 mmHg, não mostrou diferença estatística entre os grupos (Tabela 6).

Tabela 6. Pressão sistólica ventricular esquerda (em mmHg) em resposta à variação da pressão diastólica de 10 a 40 mmHg.

Grupo (n)	Controle	10	20	30	40
S (8)	73 ± 13	81 ± 14	99 ± 13	115 ± 12	130 ± 12
T (7)	103 ± 12	114 ± 10	132 ± 9	150 ± 12	156 ± 11
CS (12)	73 ± 6	75 ± 7	93 ± 8	114 ± 10	123 ± 11
CT (8)	87 ± 11	99 ± 11	117 ± 13	128 ± 13	139 ± 13

Os dados apresentados são a média das médias do último minuto de cada etapa do protocolo ± EPM. Onde: S controle sedentário, T – controle treinado, CS – castrado sedentário e CT – castrado treinado.

Em resposta à variação da pressão sistólica do ventrículo esquerdo durante a isquemia e reperfusão (Tabela 7), encontramos uma diferença significativa ($p < 0,05$) do grupo controle treinado, sendo menor que o grupo castrado sedentário.

Tabela 7. Pressão sistólica ventricular esquerda em mmHg em resposta à isquemia e reperfusão.

Grupo (n)	Estabilização	Isquemia	Reperfusão
S (8)	72 ± 11	6 ± 2	60 ± 5
T (7)	105 ± 8	3 ± 1*	77 ± 8
CS (12)	79 ± 10	10 ± 5	63 ± 8
CT (8)	80 ± 14	6 ± 1	84 ± 10

Os dados apresentados são a média das médias do último minuto de cada etapa do protocolo ± EPM. Onde: S controle sedentário, T – controle treinado, CS – castrado sedentário e CT – castrado treinado.

* grupo T x CS ($p < 0,05$).

5.5.3 Pressão diastólica ventricular esquerda

Na análise da pressão diastólica ventricular esquerda, nos diferentes momentos do protocolo de perfusão, mostrou-se diferença estatística ($p < 0,05$), durante a isquemia, tendo o grupo castrado sedentário uma pressão maior que o controle treinado. Abaixo, é apresentado o resultado da variação da pressão diastólica ventricular esquerda durante a isquemia e reperfusão (Figura 11).

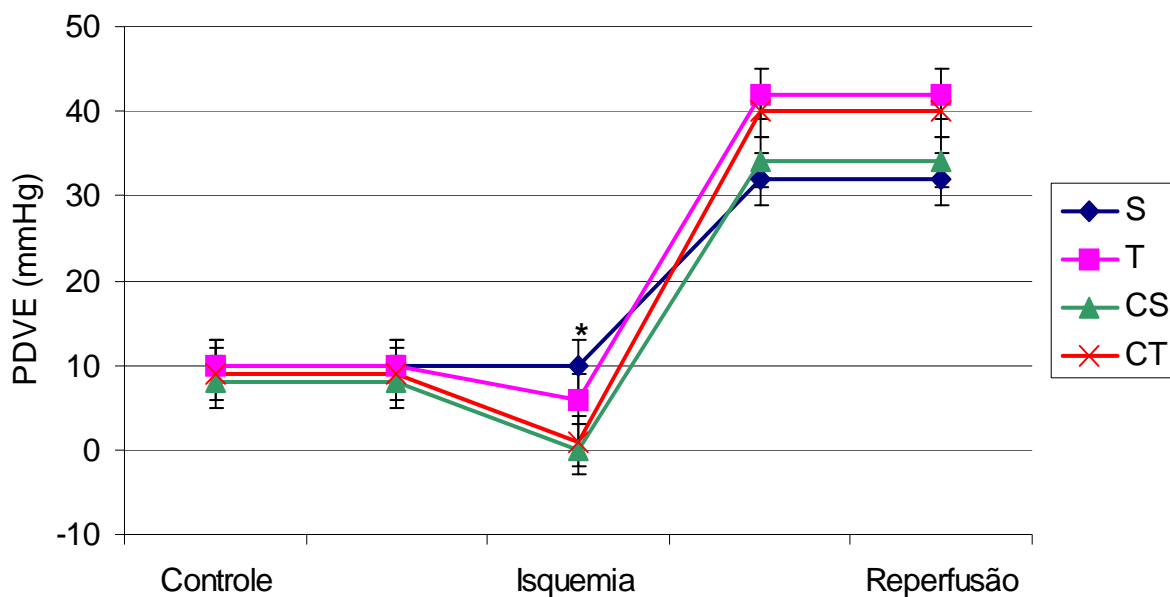


Figura 11. Pressão diastólica ventricular esquerda (PDVE em mmHg), durante a isquemia e reperfusão. Os dados apresentados são a média das médias do último minuto de cada etapa do protocolo, as barras, o EPM. Onde: S controle sedentário (n=8), T – controle treinado (n=7), CS – castrado sedentário (n=12) e CT – castrado treinado (n=8).

* diferença significativa de CS x T ($p < 0,05$).

5.5.4 Derivada positiva de pressão (+ dP/dt)

Durante o protocolo de perfusão, não foi encontrada diferença estatística para derivada positiva de pressão por derivada de tempo entre os grupos experimentais. Também não encontrou-se diferença significativa no cálculo da + dP/dt desenvolvida (valor na pressão de 40 mmHg - valor controle). Os valores da + dP/dt obtidos durante a variação da pressão diastólica (tabela 8) e durante a isquemia e reperfusão (tabela 9) são apresentados abaixo.

Tabela 8. Derivada positiva de pressão pela derivada de tempo (em mmHg/seg) mediante diferentes pressões diastólicas (10 a 40 mmHg).

Grupo (n)	Controle	10 mmHg	20 mmHg	30 mmHg	40 mmHg
S (8)	1045 ± 149	1195 ± 444	1462 ± 186	1679 ± 194	1761 ± 174
T (7)	1438 ± 201	1723 ± 394	1968 ± 178	2051 ± 180	2108 ± 219
CS (12)	1185 ± 153	1299 ± 172	1447 ± 202	1595 ± 196	1780 ± 219
CT (8)	1255 ± 139	1625 ± 121	1858 ± 152	1960 ± 149	2034 ± 156

Os dados apresentados são a média das médias do último minuto de cada etapa do protocolo ± EPM. Onde: S controle sedentário, T – controle treinado, CS – castrado sedentário e CT – castrado treinado.

Tabela 9. Derivada positiva de pressão pela derivada de tempo (em mmHg/seg) durante isquemia e reperfusão.

Grupo (n)	Estabilização	Isquemia	Reperfusão
S (8)	1298 ± 151	0	524 ± 171
T (7)	1826 ± 182	0	562 ± 185
CS (12)	1574 ± 182	0	598 ± 140
CT (8)	1489 ± 152	0	648 ± 179

Os dados apresentados são a média das médias do último minuto de cada etapa do protocolo ± EPM. Onde: S controle sedentário, T – controle treinado, CS – castrado sedentário e CT – castrado treinado.

5.5.5 Derivada negativa de pressão (- dP/dt)

Durante o protocolo de perfusão, não foi encontrada diferença estatística significativa para derivada negativa de pressão por derivada de tempo entre os grupos experimentais. Os valores da $-dP/dt$ obtidos durante a variação da pressão diastólica (Figura 12) e durante a isquemia e reperfusão (Tabela 10) são apresentados abaixo.

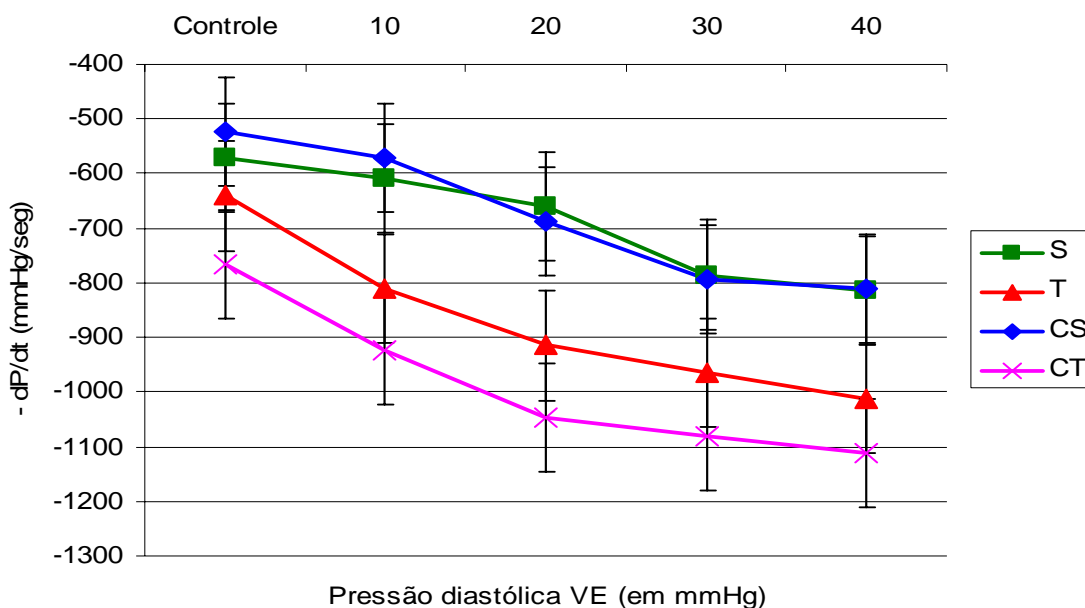


Figura 12. Derivada negativa de pressão pela derivada de tempo ($-dP/dt$) durante diferentes valores de pressão diastólica. Os dados apresentados são a média das médias do último minuto de cada etapa do protocolo, as barras, o EPM. Onde: S controle sedentário (n=8), T – controle treinado (n=7), CS – castrado sedentário (n=12) e CT – castrado treinado (n=8).

Tabela 10. Variação da derivada negativa de pressão pela derivada de tempo (em mmHg/seg) durante isquemia e reperfusão.

Grupo (n)	Estabilização	Isquemia	Reperfusão
S (8)	- 577 ± 92	0	- 258 ± 68
T (7)	- 956 ± 84	0	- 280 ± 64
CS (12)	- 701 ± 100	0	- 288 ± 58
CT (8)	- 685 ± 127	0	- 362 ± 94

Os dados apresentados são a média das médias do último minuto de cada etapa do protocolo ± EPM. Onde: S controle sedentário, T – controle treinado, CS – castrado sedentário e CT – castrado treinado.

5.5.6 Pressão de perfusão (PP)

Durante o protocolo de perfusão, foi encontrada diferença estatística ($p < 0,05$) da pressão de perfusão do grupo castrado treinado quando submetido à pressão diastólica de 40 mmHg, sendo esta aumentada com relação à pressão de perfusão durante os valores de diastólica no controle e 10 mmHg (Figura 13). Os valores de PP obtidos durante a isquemia e reperfusão não apresentaram diferença significativa entre os grupos e estão apresentados abaixo (Tabela 11).

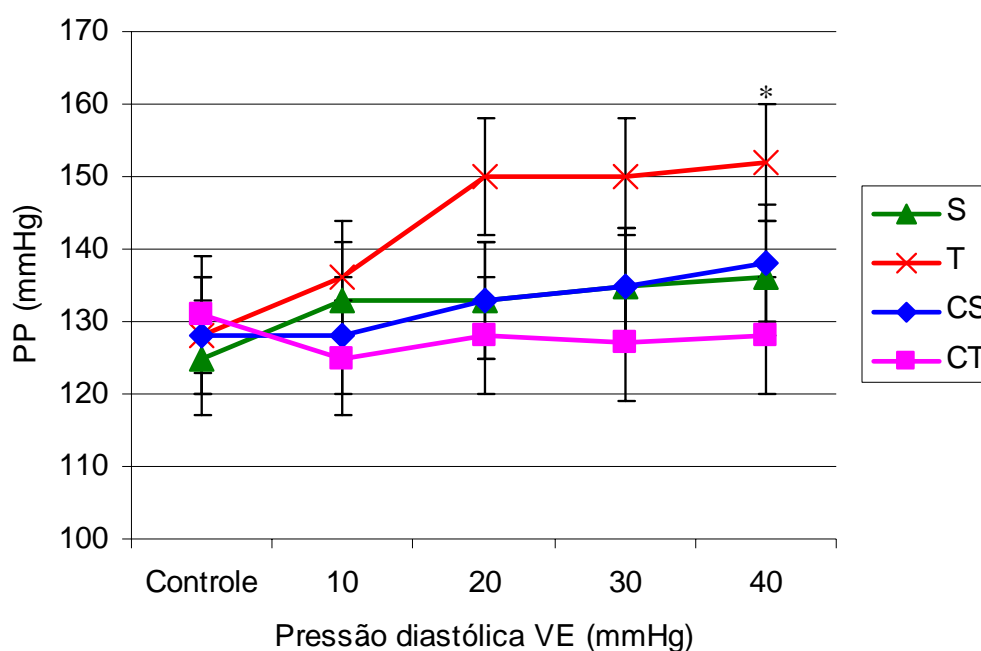


Figura 13. Pressão de perfusão (PP), em mmHg, durante diferentes valores de pressão diastólica. Os dados apresentados são a média das médias do último minuto de cada etapa do protocolo, as barras EPM. Onde: S – controle sedentário (n=8), T – controle treinado (n=7), CS – castrado sedentário (n=12) e CT – castrado treinado (n=8).

* diferença significativa em relação à pressão controle e 10 mmHg do grupo CT ($p < 0,05$).

Tabela 11. Pressão de perfusão (em mmHg) durante isquemia e reperfusão.

Grupo (n)	Estabilização	Isquemia	Reperfusão
S (8)	129 ± 20	0	139 ± 14
T (7)	124 ± 15	0	130 ± 17
CS (12)	126 ± 15	0	134 ± 11
CT (8)	134 ± 17	0	155 ± 9

Dados apresentados são a média das médias do último minuto de cada etapa do protocolo ± EPM. Onde: CS – castrado sedentário; CT – castrado treinado; S controle sedentário e T – controle treinado.

6. DISCUSSÃO

Diversos estudos têm demonstrado que a incidência de doenças cardiovasculares é maior em homens do que em mulheres com atividade menstrual; contudo, após o período menstrual, os riscos de eventos cardiovasculares das mulheres se igualam aos dos homens (Fernandes et al. 2004). Esse fato é remetido ao papel protetor dos estrogênios sobre o risco de doenças cardiovasculares (Dantas & Carvalho, 2000). O mecanismo exato pelo qual esse hormônio pode interferir no sistema cardiovascular ainda é pouco conhecido. Sabe-se, no entanto, que a reposição exógena de estrogênios pode melhorar as condições cardiovasculares, após o período menstrual ativo (Fernandes et al. 2004), prática conhecida como terapia de reposição hormonal (TRH).

Por outro lado, a atividade física tem sido preconizada como importante fator de proteção do sistema cardíaco e vascular. Esse fato tem recebido importante atenção nos últimos anos, principalmente pela modulação gerada no sistema antioxidante em virtude da atividade física. O estresse oxidativo na atividade física tem se tornado alvo de muitos estudos que procuram compreender e relacionar, de forma mais clara, as adaptações metabólicas com os possíveis benefícios gerados pelas mesmas. Dentre os benefícios da atividade física podemos citar a melhora nos sintomas da menopausa, melhora na dificuldade de concentração, humor e nos sintomas vasomotores (Slaven & Lee, 1997).

Em uma revisão recente, Asikainen et al. (2004) apresentam os benefícios do exercício sobre o peso corporal, constituição óssea, resistência da musculatura estriada, flexibilidade, consumo de oxigênio, pressão sangüínea e controle metabólico em mulheres pós-menopáusicas. Também Jurca et al. (2004) em estudo realizado com mulheres pós-menopáusicas, aplicando um programa de treinamento físico aeróbio de 8 semanas à média intensidade, evidenciaram um aumento na variabilidade e diminuição da frequência cardíaca com relação ao grupo sedentário. Irigoyen et al. (2005) apresentam evidências de que um treinamento físico de oito semanas à média intensidade em ratas

ovariectomizadas foi capaz de melhorar o controle reflexo da circulação, associando esse achado com uma diminuição do estresse oxidativo no miocárdio e sugerindo um papel homeostático da atividade física, reduzindo o risco cardiovascular de ratas castradas. Contudo, os efeitos do treinamento físico sobre a mecânica cardíaca na ausência do estrogênio, bem como a possibilidade da relação com a atividade antioxidante e estresse oxidativo não estão completamente esclarecidos.

Em nosso estudo, os animais foram submetidos a um protocolo de atividade física de média intensidade, durante 8 semanas, semelhante ao utilizado por Irigoyen et al. (2005), iniciando o treinamento a aproximadamente 50% do VO_2 max, chegando no final do protocolo, a 70% do VO_2 max. A partir da 4ª semana de treinamento, percebeu-se diferença significativa ($p < 0,05$) com relação à capacidade física, pois as ratas treinadas apresentaram melhor desempenho no teste de esforço quando comparadas com os animais sedentários, porém essa diferença não esteve relacionada com a castração. De fato, não era esperado que os animais castrados tivessem desempenho físico diferenciado dos controles, visto que não há grande modificação da capacidade de condicionamento físico na ausência do estrogênio.

Morgan-Martins (2003) em estudo realizado com ratas Wistar, em nosso laboratório, demonstrou que após sete dias da cirurgia de ovariectomia os animais apresentavam níveis estrogênicos séricos não detectáveis. Desta forma, neste estudo, iniciou-se a adaptação ao exercício 3 dias após o procedimento cirúrgico, sendo que o protocolo de treinamento foi iniciado 10 dias após o mesmo, quando já não havia estrogênio detectável.

Estudos realizados por Inal et al. (2001) e Petibois & Déléris (2005) demonstraram que o exercício a média e alta intensidade, atingindo de 60% a 75% do VO_2 max, aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio em eritrócitos de ratos. Estes mesmos autores referem que o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio pode iniciar um aumento da LPO e maior atividade das enzimas antioxidantes como forma de adaptação ao estresse gerado.

Ao ser analisada a atividade das enzimas antioxidantes e a lipoperoxidação do músculo gastrocnêmio, após as oito semanas do protocolo experimental, observamos uma diminuição da quimiluminescência nos grupos treinados com relação aos sedentários. Claramente percebemos que a atividade física foi capaz de reduzir a LPO. No grupo controle treinado tivemos um aumento da SOD ($p < 0,05$) o que poderia contribuir para diminuição da QL. Esse dado, no entanto, não se repetiu no grupo castrado treinado, ao contrário, as enzimas CAT e GPx apresentaram-se significativamente diminuídas, com relação ao grupo controle treinado. Em virtude desse achado, pode-se considerar a atuação de um antioxidante não enzimático atuando sobre as ERO durante a adaptação muscular na ausência de estrogênio.

Na medida da LPO sistêmica, após as oito semanas do protocolo experimental, observamos igualmente a diminuição do dano oxidativo sistêmico do grupo controle treinado com relação ao controle sedentário, porém não houve diferença entre os outros grupos. Reportamos esse fato ao aumento da atividade da GPx do grupo controle treinado com relação ao grupo controle sedentário. Outros dados importantes são o aumento da SOD e GPx do grupo castrado sedentário com relação aos grupos controle sedentário e castrado treinado, respectivamente. Apesar de não termos encontrado diferença na LPO do grupo castrado sedentário com relação aos outros grupos, o aumento da atividade enzimática sugere que houve maior mobilização de proteção antioxidante nesse grupo com relação aos outros. Salientamos ainda que o grupo castrado treinado não apresentou diferença na LPO, tão pouco na atividade enzimática, podendo assim sugerir que, após 8 semanas de treinamento físico, esses animais foram capazes de manter seu perfil oxidativo sistêmico semelhante aos animais não castrados.

Percebe-se que a resposta da atividade enzimática, bem como da LPO no músculo cardíaco, músculo gastrocnêmio e eritrócitos não obedecem a um mesmo perfil, diferindo entre si. Esses dados corroboram com a literatura demonstrando uma resposta tecido-dependente ao estresse gerado pela atividade física (Petibois & Déléris, 2005; Morán et al. 2004; Atalay et al. 1996). A castração,

em nosso estudo, não aumentou a LPO em nenhum dos tecidos analisados, diferindo de outros estudos.

Barp et al. (2002) ao analisarem o coração de ratas Wistar, após sete dias de castração, encontraram uma maior LPO no tecido cardíaco dos animais castrados com relação aos controles. Também Morgan-Martins (2003), ao analisar tecido cardíaco e eritrócitos, após 28 dias de castração, em ratas Wistar demonstrou maior LPO nos animais castrados com relação aos controles. Pode-se relacionar essa diferença de resultados com o fato de que em nosso estudo a duração da castração foi de 42 dias, propiciando maior tempo para adaptação à ausência do estrogênio. Também outro fator, não menos importante, é relacionarmos a adaptação ao protocolo de treinamento físico realizado que também pode interferir no perfil do estresse oxidativo.

Nos animais treinados, foi observada uma diminuição da LPO no músculo gastrocnêmio e nos eritrócitos. Trabalho realizado por Irigoyen et al. (2005) corrobora com nossos achados apresentando uma menor LPO no tecido cardíaco e músculo gastrocnêmio dos animais castrados submetidos a um protocolo de treinamento. Esses dados demonstram uma adaptação à ausência do estrogênio desses tecidos pela atividade física.

A atividade física foi capaz de diminuir a LPO no músculo gastrocnêmio apesar de haver uma diminuição da atividade das enzimas antioxidantes. Em virtude disso, podemos sugerir que possivelmente há atuação de algum outro sistema de defesa antioxidante impedindo o aumento da LPO. No coração, o aumento na atividade da enzima CAT no grupo castrado treinado e da GPx no grupo castrado sugere uma elevação na concentração de peróxido de hidrogênio, hipótese que foi comprovada por Strehlow et al. (2003) que demonstrou que na ovariectomia há maior produção de peróxido de hidrogênio. A resposta diferenciada possivelmente se deva ao fato de que a CAT e GPx apresentam uma correlação inversa nas suas atividades. Quando as concentrações de peróxido de hidrogênio são da ordem de nmol/L a CAT é mais ativa, sendo que a GPx atua preferencialmente na faixa de concentração de peróxido de hidrogênio de $\mu\text{mol/L}$ (Yu, 1994). Porém, a associação da atividade física à castração poderia, através

da redução da produção de peróxido de hidrogênio, diminuir a formação de radical hidroxil reduzindo, dessa forma, a LPO.

Morán et al. (2004) analisaram a resposta das defesas antioxidantes e da proteína de choque térmico HSP72 do miocárdio de ratos mediante o treinamento físico à média intensidade num período de 12 e 24 semanas. Esse estudo demonstrou que o treinamento a longo prazo (24 semanas) promoveu uma discreta melhora da atividade enzimática antioxidante e aumentou a expressão de HSP72. O treinamento de 12 semanas, porém, não foi efetivo em aumentar as defesas antioxidantes, sendo que não foi observada diferença significativa nas TBARS e carbonilas entre os grupos treinados e sedentários após 12 semanas de treinamento. Esses dados corroboram com nosso estudo, que também não demonstrou diferença significativa entre os grupos nesta medida de LPO, após 8 semanas de treinamento.

As carbonilas, no entanto, na primeira semana de treinamento estiveram aumentadas no grupo controle treinado. Isso demonstra que houve uma lesão oxidativa inicial em virtude da atividade física, porém o grupo castrado treinado não apresentou esse aumento nas carbonilas possivelmente por haver uma adaptação prévia à ausência de estrogênio. Quando comparamos a variação do nível sistêmico das carbonilas podemos observar que há uma elevação somente no grupo castrado sedentário, da primeira para quarta semana. A melhor recuperação do dano a proteínas é do grupo controle treinado que começa aumentado na primeira semana e vai diminuindo nas semanas seguintes. Esses dados demonstram que a castração aumenta o dano oxidativo protéico, característica compensada pela atividade física que fez com que o grupo castrado treinado tivesse uma recuperação do dano às proteínas durante o período experimental. Esses dados concordam com estudo realizado por Morán et al. (2004) que apresentou iguais níveis de carbonilas, em ratos machos, após doze semanas de treinamento.

A fim de avaliarmos a função cardíaca, com relação à mecânica, utilizamos a perfusão de coração isolado. A frequência cardíaca (FC) variou fisiologicamente em resposta ao aumento da pressão diastólica final. Observamos, porém, que

após a pressão de 20 mmHg não houve grande acréscimo à FC, sendo esta diminuída ou estabilizada nos grupos treinados quando submetidos as pressões de 30 e 40 mmHg.

Esse fato nos apresenta um platô fisiológico de resposta à pré-carga imposta ao ventrículo esquerdo, sendo o melhor valor de resposta para o mecanismo de Frank-Starling a pressão de 20 mmHg de pré-carga. Isso possivelmente se deve o fato de que uma maior tensão na parede do ventrículo esquerdo, em virtude do aumento da pré-carga, gera uma resposta de contração mais vigorosa em resposta a maior distensão das fibras musculares ventriculares. Quando, porém, a pressão excede os níveis fisiológicos há uma distensão das fibras além do ponto ideal para contração, resultando em perda da função contrátil (Tucci & Kanashiro, 2004).

Salientamos ainda uma tendência de a FC do grupo controle treinado ser menor em todas as etapas do protocolo de curva pressórica, principalmente com relação aos grupos castrados ($p < 0,056$). Reportamos isso à adaptação cardíaca a maior demanda metabólica gerada pela atividade física. A prática regular de atividade física produz uma hipertrofia fisiológica adaptativa ao aumento de carga imposta ao coração durante a prática dessa atividade. Essa adaptação consiste em uma contração mais vigorosa, aumentando o volume sistólico e a fração de ejeção (Bregagnollo et al. 2000). O resultado final dessa adaptação é uma bradicardia quando em repouso e menor aumento da frequência cardíaca quando submetido a esforço físico, às custas do melhor desempenho do miocárdio. Nos demais parâmetros analisados durante a curva pressórica ($-dP/dt$, $+dP/dt$, pressão de perfusão) não encontramos diferenças significativas entre os grupos.

Durante a isquemia, o grupo castrado sedentário apresentou uma maior pressão ventricular diastólica (sugerindo maior contratatura cardíaca), sendo que o grupo castrado treinado se manteve sem diferença com relação aos grupos não castrados. Após a reperfusão, no entanto, observamos que a diferença de pressão diastólica entre os grupos deixa de existir. É pertinente compararmos os dados encontrados nesse estudo com estudo feito por Paroo et al. (2002), que observou a função cardíaca pós-isquemia em ratos machos e fêmeas treinados e

sedentários. Tal estudo apresenta uma melhor função cardíaca pós-isquêmica nos animais machos submetidos a treinamento quando comparados às fêmeas treinadas. Porém, quando as fêmeas são castradas passam a apresentar mesmo comportamento, ou seja, melhor função cardíaca pós-isquêmica assim como os machos. Esse fato é relacionado com a integridade da estrutura do miocárdio, pois a concentração de creatina quinase (CK) dos machos e fêmeas castradas estavam diminuídas.

Outro fator importante a ser considerado é que a expressão da proteína de choque térmico HSP 70 nos animais machos treinados e fêmeas castradas treinadas foi maior e isso foi diretamente relacionado com a melhor recuperação pós-isquêmica (Paroo et al. 2002). Tais achados sugerem a hipótese de que a HSP 70 atuaria como um segundo mensageiro não genômico, contribuindo para manutenção da estabilidade da membrana plasmática. No entanto, em fêmeas produtoras de estrogênio esse hormônio seria capaz de manter a estabilidade da membrana, principalmente em virtude de suas características antioxidantes.

Por outro lado, percebemos que a atividade física a média e alta intensidade aumenta a expressão da HSP 70 em machos, mas não em fêmeas capazes de produzir estrogênio (Paroo et al. 2002). Em fêmeas castradas, a expressão da HSP 70 se iguala a dos machos demonstrando, dessa forma, um dimorfismo sexual. Também Thompson et al. (2003) mostraram papel importante das HSP e MAPK nas respostas da musculatura esquelética ao exercício em mulheres na pré-menopausa. Da mesma forma, Nishizawa et al. (1999) relacionam o aumento de ERO na isquemia-reperfusão tendo papel fundamental na ativação das HSP.

Em nosso estudo, observamos uma melhor resposta, nas derivadas de pressão e pressão sistólica, do grupo castrado treinado juntamente com o grupo controle treinado, durante o período de reperfusão, porém dentre esses dois ainda se destaca o castrado treinado. Reportamos isso ao fato de que nos grupos controles a produção de estrogênio foi capaz de manter a proteção da integridade da membrana plasmática, porém nos grupos castrados, por não haver essa proteção hormonal, há necessidade de uma adaptação para proteção ao estresse

gerado pelo exercício físico. Um possível mecanismo para isso é o aumento na síntese das HSP.

Como a proteção hormonal estrogênica não é um fator intrínseco da estrutura miocárdica, era esperado que os animais capazes de se adaptarem ao estresse do exercício por fator intrínseco, quer seja o aumento na expressão de HSP 70 ou algum outro fator, tivessem melhor recuperação da isquemia. Podemos observar que a pressão ventricular diastólica esquerda esteve aumentada no grupo castrado sedentário com relação ao controle treinado. Nesse caso, temos o somatório da ausência do estrogênio e da falta de adaptação ao estresse por não ter participado do protocolo de treinamento.

Tanto no índice de contratilidade cardíaca (+ dP/dt) quanto no de relaxamento (- dP/dt) não observamos diferença significativa entre os grupos. No entanto, é possível se observar uma tendência de melhor contratilidade e relaxamento do grupo castrado treinado com relação aos outros grupos durante o período de reperfusão. Isso possivelmente se deve aos fatores já mencionados de adaptação do tecido muscular na ausência do estrogênio e submetido a exercício físico (Paroo et al. 2002; Nishizawa et al. 1999; Powers et al. 1998). Relacionamos esse evento diretamente à função intrínseca das fibras musculares, descartando a hipótese de um componente vascular pós-isquêmico. Isso pelo fato de não observarmos diferença na pressão de perfusão entre os grupos em nenhum momento do protocolo de perfusão do coração isolado e também por não se ter encontrado diferenças significativas na análise dos nitratos plasmáticos.

Inicialmente, foi hipotetizado que a castração induziria um aumento do estresse oxidativo, que estaria associado à piora da função mecânica pós isquemia-reperfusão do miocárdio. No entanto, com o protocolo experimental utilizado, não mostrou-se alteração significativa da função mecânica do coração na ausência de estrogênio. Em termos de estresse oxidativo, igualmente não se demonstrou aumento do dano oxidativo dos lipídios em função da castração. Quando avaliado o dano sistêmico às proteínas, verificou-se que, após 8 semanas, os animais castrados apresentavam maior dano, sendo este revertido pelo treinamento físico. A melhor resposta adaptativa mostrou-se no músculo

gastrocnêmio, onde os dois grupos exercitados apresentam redução de lipoperoxidação.

Dessa forma, não foi confirmada a hipótese inicialmente proposta, uma vez que não houve aumento do estresse oxidativo tecidual com a retirada de estrogênio e, portanto, não se aplica a possibilidade de melhora da função mecânica neste protocolo de estudo. Estes dados reforçam a idéia da adaptação ao estresse oxidativo e a importância da avaliação temporal do mesmo.

Assim, seria relevante avaliar outros parâmetros a fim de explorarmos os mecanismos pelos quais a adaptação ao estresse oxidativo ocorre nesse modelo experimental.

7. CONCLUSÃO

Com base nos dados apresentados pode-se concluir que o protocolo de treinamento utilizado neste estudo foi capaz de condicionar os animais a partir da quarta semana de treinamento. No entanto, o treinamento físico bem como a castração não produziram variações na mecânica cardíaca dos diferentes grupos experimentais analisados.

Na análise da atividade enzimática antioxidante e da lipoperoxidação pode-se observar que o treinamento físico foi capaz de diminuir o dano lipídico do músculo gastrocnêmio em animais castrados, apesar da diminuição da atividade enzimática antioxidante.

De forma semelhante, houve diminuição da LPO sistêmica no grupo controle treinado, porém não no castrado treinado. Assim, pode-se inferir que o treinamento físico foi capaz de proteger contra o dano oxidativo, porém não na ausência do estrogênio sistemicamente. Soma-se a esse dado, o fato de que a variação do nível sistêmico de carbonilas teve melhor recuperação nos animais não castrados, principalmente com relação ao grupo castrado sedentário que ao final do protocolo tinha maior dano protéico. No músculo cardíaco, apesar da variação das enzimas antioxidantes, não foi observada alteração na LPO, após as oito semanas do protocolo experimental.

Dessa forma, o programa de exercício físico não foi capaz de melhorar a função cardíaca dos animais castrados quando submetidos ao processo de isquemia-reperfusão. No entanto, diminuiu o dano oxidativo lipídico do músculo gastrocnêmio desses animais e modulou sistemicamente a oxidação de proteínas na ausência de níveis estrogênicos detectáveis.

8. REFERÊNCIAS

1. Ackerman GE, Carr BR. Estrogens. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 2002;3:225-230.
2. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126, 1984.
3. Atalay M, Seene T, Hanninen O, Sen CK. Skeletal muscle and heart antioxidant defenses in response to sprint training. *Acta Physiol Scand* 1996 oct;158(2):129-34.
4. Asikainen TM, Kukkonen-Harjula K, Miilunpalo S. Exercise for health for early postmenopausal women: a systematic review of randomised controlled trials. *Sports Med.* 2004;34(11):753-78.
5. Baker H, Lindsey JR, Weisbroth SH. *The laboratory rat biology and disease.* Academic Press; V1, 1979.
6. Ballinger, CB. Psychiatric Aspects of the Menopause. *British Journal of Psychiatric*,156, 773-787 – 1990.
7. Barp J, Araujo AS, Fernandes TR, Rigatto KV, Llesuy S, Bello-Klein A, Singal P. et al. Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. *Braz J Med Biol Res* 35:1075-1081, 2002.
8. Bello-Klein A, Lagranha CJ, Bock P, Barp J, Araújo ASR, Llesuy S, Bello AA, Khaper N, Singal PK. Submaximal exercise training in postnatal rats: hemodynamic and oxidative stress changes. *Exp clin cardiol* 2000;5(3):149-153.
9. Bello-Klein A, Bock PM, Travacio M, Senna SM, Llesuy S, de Bitencour PI Jr, Irigoyen MC, Bello AA, Kumar D, Singal PK. Myocardial oxidative stress and antioxidants in hypertension as a result of nitric oxide synthase inhibition. *Cardiovasc Toxicol* 1(1):43-50; 2001.
10. Bisby RH: Interactions of Vitamin E with Free Radicals and Membranes. *Free Rad. Res. Comms.* 8: 4-6, 1990.
11. Bowles DK & Starnes JW. Exercise training improves metabolic response after ischemia in isolated working rat heart. *J Appl Physiol.* Apr; 76(4): 1608-14, 1994.

12. Bregagnollo EA, Okoshi K, Matsubara BB, Tucci PJF. End-systolic pressure diameter relation of the left ventricle during transient and sustained elevations of blood pressure. *Arq Bras Cardiol*, Volume 75 (nº 1), 26-32, 2000.
13. Brown DA, Jew KN, Sparagna GC, Musch TI, Moore RL. Exercise training preserves coronary flow and reduces infarct size following ischemia-reperfusion in rat Heart. *J Appl Physiol*. Aug 22, 2003.
14. Brown DA, Lynch JM, Armstrong CJ, Caruso NM, Ehlers LB, Johnson MS, Moore RL. Susceptibility of the heart to ischemia-reperfusion injury and exercise induced cardioprotection are sex-dependent in the rat. *J Physiol* 564.2 (2005) pp 619-630.
15. Buege JA & Aust SD: Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* 52: 302-309, 1978.
16. Cooper CE, Vollaard NBJ, Choueiri T, Wilson MT. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, volume 30, part 2, 2002.
17. Dantas APV, Carvalho MHC. Efecto protector de los estrógenos em el sistema cardiovascular. *Antioxidantes y calidad de vida*. Mayo, Vol 7, nº 28, 6-11, 2000.
18. Del Maestro, R. F. An Approach to Free Radicals in Medicine and Biology. *Act Physiol Scand*, Suppl. 492: 153-168, 1980.
19. Fernandes CE, Baracat EC, Lima GR. *Climatério; manual de orientação*. São Paulo: Ponto, 2004. 372 p.
20. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil* 1997;43(1):61-8.
21. Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelium nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;284:R1
22. Flohé L, Gunzler WA. Assay of glutathione peroxidase. *Methods Enzymolgy.* 105:114-121, 1984.
23. Fukui T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Cheng Y, Kojda G, Harrison DG. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest* 2000;105:1631-9.

24. Gabriel SR, Carmona L, Roque M, Sanchez GL, Bonfill X. Hormone replacement therapy for preventing cardiovascular disease in post-menopausal women. *Cochane Database Syst Rev.* 2005 Apr 18;(2):CD002229.
25. Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest* 115:500-508(2005).
26. Gonzalez-Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Rad. Biol. Med.* 10: 93-100, 1991.
27. Granger DL, Anstey NM, Miller WC, Weinberg JB. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods in Enzymology*, 301:58-61,1999.
28. Halliwell B: Oxidants and Human disease: some new concepts. *FASEB J* 1987, 1:358-364.
29. Halliwell B, Gutteridge JMC: *Free Radical in Biology and Medicine*. Claredon Press, Oxford, 2 ed., 1989.
30. Hambrecht R, Adams V, Erbs S, Linke A, Krankel N, Shu Y, et al. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2003;107:3152-8.
31. Hambrecht R, Gielen S, Linke A, Fiehn E, Yu JT, Walther C, et al. Effects of exercise training on left ventricular function and peripheral resistance in patients with chronic heart failure – a randomized trial. *J Am Med Assoc* 2000;283:3095-101.
32. Hernandez I, Delgado JL, Diaz J, Quesada T, Teruel MJ, Llanos MC, Carbonell LF. 17beta-estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000 Nov;279(5):R1599-605.
33. Higuchi M, Cartier LJ, Chen M, Holloszy JO. Superoxide dismutase and catalase in skeletal muscle: adaptive response to exercise. *J Gerontol.* 1985 May;40(3):281-6.
34. Inal M, Akyuz F, Turgut A, Getsfrid WM. Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. *Med Sci Sports Exerc* 2001;33:564-567.

35. Irigoyen MC, Paulini J, Flores LJ, Flues K, Bertagnolli M, Moreira ED, Consolim-Colombo F, Bello-Klein A, Angelis KD. Exercise training improves baroreflex sensitivity associated with oxidative stress reduction in ovariectomized rats. *Hypertension* 2005 46(4):998-1003.
36. Jenkins RR, Friedland R, Rowald H. The relationship of oxygen uptake to superoxide dismutase and catalase activity in human skeletal muscle. *Int J Sports Med.* 1984 Feb;5(1):11-4.
37. Ji LL. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med Sci Sports Exerc.* 1993 Feb;25(2):225-31.
38. Jurca R, Church TS, Morss GM, Jordan AN, Earnest CP. Eight weeks of moderate-intensity exercise training increases heart rate variability in sedentary postmenopausal women. *Am Heart J.* 2004 May;147(5):e21.
39. Khaper N & Singal PK: Effects of afterload-reducing drugs on pathogenesis of antioxidant changes and congestive heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1997, 29: 856-861.
40. Khassaf M, Child RB, McArdle A, Brodie DA, Esanu C, Jackson MJ. Time Course of responses of human skeletal muscle to oxidative stress induced by nondamaging exercise. *J appl Physiol* 2001, 90:1031-1035.
41. Kojda G, Hambrecht R. Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? *Cardiovas Res.* 2005, Aug 1;67(2):187-97.
42. Kojda G, Cheng Y, Burchfield J, Harrison DG. Dysfunctional regulation of eNOS expression in response to exercise mice lacking one eNOS gene. *Circulation* 2001;103:2839-44.
43. Krinsky NI: Antioxidant Functions of Carotenoids. *Free Rad. Biol. & Med.* 7: 617-635, 1989.
44. Lennon SL, Quindry JC, French JP, Kim S, Mehta L, Powers SK. Exercise and myocardial tolerance to ischemia-reperfusion. *Acta Physiol Scand* 2004,182, 161-169.
45. Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A & Milei S: Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori* 71: 241-249, 1985.

46. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-267, 1951.
47. Manson J, Hsia J, Johnson K, Rossouw JE, Assaf A, Lasser N, Trevisan M, Black H, Heckbert SR, Detrano R, Strickland OL, Wong ND, Crouse J, Stein E, Cushman M. For the women's health initiative investigators. *N Engl J Med.* 349(6) 523-34, 2003.
48. Massafra C et al. Variations in erythrocyte antioxidant glutathione peroxidase activity during the menstrual cycle. *Clinical Endocrinology*, 49:63-67, 1998.
49. Marklund S: In: *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton. CRC Press. Pa.243-247, 1985.
50. Meneghini R: A Toxicidade do Oxigênio. *Ciência Hoje* 5(6): 57 - 62, 1987.
51. Morán M, Delgado J, González B, Manso R, Megías A. Responses of rat myocardial antioxidants defenses and heat shock protein HSP72 induced by 12 and 24-week treadmill training. *Acta Physiol Scand* 2004,180, 157-166.
52. Morgan-Martins MI. A reposição do estrogênio diminui o dano oxidativo, aumenta a atividade das enzimas antioxidantes e melhora a função cardíaca em ratas. Tese de doutorado, programa de pós graduação em ciências fisiológicas da UFRGS. ICBS - TFGRS, Porto Alegre, 2003.
53. Nair GV, Chaput LA, Vittinghoff E, Herrington DM. Pulse pressure cardiovascular events in postmenopausal women with coronary heart disease. *Chest.* 2005 May;127(5):1477-80.
54. Niki E: Antioxidant Defenses in Eukariotic Cells: an Overview. in: *Free Radicals: From Science to Medicine*. G. Pole, E. Albano & M. U. Dianzani (eds), 1993.
55. Nishizawa J, Nakai A, Matsuda K, Komeda M, Ban T, Nagata K. Reactive oxygen species play an important role in the activation of heat shock factor 1 in ischemic-reperfused heart. *Circulation* 1999;99:934-941.
56. Oliveira AR. Efeitos do estresse oxidativo em corações isolados de ratos sedentários e treinados. Dissertação de mestrado, programa de pós graduação em ciências fisiológicas da UFRGS, Porto Alegre, 1993.
57. Olszewer E: *Radicais Livres em Medicina*. São Paulo: Fundo Editorial BYK, 122p, 1992.

58. Pagani M, Somers V, Furlan R, Dell'Orto S, Conway J, Baseli G, Cerutti S, Sleight P, Mallini A. Changes in autonomic regulation induced by physical in mild hypertension. *Hypertension* 1988;12:600-61.
59. Paroo Z, Haist JV, Karmazyn M, Noble EG. Exercise improves postischemic cardiac function in males but not in females. *Circ Res.* 2002;90:911-917.
60. Perón JMR, Lopez JRM, Lopez YT. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cubana Med Milit* 2001;30(1):36-44.
61. Petibois C & Délérís G. Erythrocyte adaptation to oxidative stress in endurance training. *Archives of Medical Research* 36 (2005) 524-531.
62. Powers SK, Demirel HA, Vincent HK, Coombes JS, Naito H, Hamilton KL, Shanely RA, Jessup J. Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Am J Physiol.* Nov.;275(5 pt 2):R1468-77, 1998.
63. Radák Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Ohno H, Sasvári M, Nyakas C, Goto S. The effect of exercise training on oxidative stress damage of lipids, protein and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free radicals biology & medicine.* Vol. 27, Nos 1/2, 69-74;1999.
64. Reznick AZ & Packer L. Carbonyl Assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 233; 357-363; 1994.
65. Rosano GM, Sarrel PM, Poole-Wilson PA, Collins P. Beneficial effect of oestrogen on exercise-induced myocardial ischaemia in women with coronary artery disease. *Lancet* 342:133-36, 1993.
66. Scott K. Powers & Edward T. Howley. *Fisiologia do exercício, teoria e aplicação ao conhecimento e ao desempenho.* Ed. Manole; 2000.
67. Singal PK, Khaper N, Palace V, Kumar D: The role of oxidative stress in genesis of heart disease. *Cardiovasc Res* 40:426-432, 1998.
68. Sies H: *Oxidative Stress, Oxidants and Antioxidants.* New York: Academic Press; 1991.
69. Sies H & Murphy ME: Role of Tocopherols in the protection of Biological Against Oxidative Damage. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 8: 211-224, 1991.
70. Slaven L & Lee C. Mood and symptom reporting among middle-age women: the relationship between menopausal status, hormone replacement therapy, and exercise participation. *Health Psychology* Vol. 16, nº 3, 203-208, 1997.

71. Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, Adam O, Grohe C, Laufs K, Bohm M, Nickenig G. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ Res.* 2003 Jul 25;93(2):170-7. Epub 2003 Jun 19.
72. Sugishita K, Li F, Su Z, Barry WH. Anti-oxidant effects of estrogen reduce $[Ca^{2+}]_i$ during metabolic inhibition. *J Mol Cell Cardiol.* 2003 Mar;35(3):331-6
73. Timerman A, Santos RD, Souza MFM, Serrano CUJ. Aspectos Epidemiológicos das Doenças Cardiovasculares no Meio: Tendência da Mortalidade por Doença Isquêmica do Coração no Brasil 1979 a 1996. *Revista da sociedade de cardiologia do estado de São Paulo.* V4 p. 715-723, 2001.
74. Thompson HS, Maynard EB, Morales ER, Scordilis SP. Exercise-induced HSP27, HSP70 and MAPK responses in human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 2003, 178, 61-72.
75. Tucci PJF & Kanashiro RM. A redução do ventrículo esquerdo não apenas diminui a pós-carga. *Arq Bras Cardiol*, Volume 82 (nº 3), 209-11, 2004.
76. Wang J, Wolin MS, Hintze TH. Chronic exercise enhances endothelium-mediated dilation of epicardial coronary artery in conscious dogs. *Circ Res* 1993;73:829-38.
77. Wilmore JH & Costill DL. Physical energy: fuel metabolism. *Nutr Rev.* 2001 Jan;59(1 Pt 2):S13-6.
78. Yu BC. Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74:139-162, 1994.