

LUCIANA ALÉCIO CABANELAS¹
ADRIANA APARECIDA FERRAZ CARBONEL¹
MIRIAM APARECIDA DOS SANTOS¹
RICARDO SANTOS SIMÕES²
AROLDO WALTER LIBERATORI-FILHO¹
EDMUND CHADA BARACAT²
JOSÉ MARIA SOARES JÚNIOR^{1,2}

Morfologia dos cardiomiócitos e quantificação do colágeno no miocárdio de ratas tratadas com isoflavonas ou estrogênios

Cardiomyocytes morphology and collagen quantification in the myocardium of female rats treated with isoflavones or estrogens

Artigo Original

Palavras-chave

Miocárdio
Fitoestrogênios
Estradiol
Colágeno
Ratos

Keywords

Myocardium
Phytoestrogens
Estradiol
Collagen
Rats

Resumo

OBJETIVOS: Avaliar a morfologia dos cardiomiócitos e quantificar o colágeno presente no miocárdio de ratas tratadas com extrato concentrado de soja ou 17 β -estradiol (E2). **MÉTODOS:** Vinte e oito ratas foram divididas em quatro grupos: GCtrl – fase de estro; GOvx – ovariectomizadas (Ovx); GIsso – Ovx tratadas com extrato de soja (150 mg/kg, por dia); GE2 – Ovx tratadas com E2 (10 μ g/kg, por dia). As drogas e o veículo (0,2 mL de propilenoglicol) foram administrados após 30 dias da realização da ovariectomia, por 30 dias consecutivos. No último dia os animais foram anestesiados, o coração retirado, mergulhado em formaldeído a 10%, e fragmentos dos ventrículos submetidos a processamento histológico, sendo os cortes corados pela hematoxilina e eosina ou pelo picrossirius-red. As análises histomorfométricas (contagem, volume nuclear e quantificação do colágeno) foram realizadas em microscópio de luz e software AxioVision Rel. 4.2, sendo o colágeno determinado pelo programa Imagelab 2000. Os dados foram submetidos ao teste de ANOVA complementado pelo teste de Tukey (p<0,05). **RESULTADOS:** Notamos maior quantidade de núcleos de cardiomiócitos nos animais dos grupos Ovx e Iso do que no GE2 e GCtrl (GOvx=121,7 \pm 20,2=GIsso=92,8 \pm 15,4>GE2=70,5 \pm 14,8=GCtrl=66,3 \pm 9,6; p<0,05), sendo o volume nuclear maior nos animais do grupo Ctrl e E2 (GE2=35,7 \pm 4,8=GCtrl=29,9 \pm 3,6>GIsso=26,5 \pm 4,5=GOvx=22,4 \pm 2,9; p<0,05). Com relação ao colágeno notamos maior concentração no grupo Ovx (GOvx=5,4 \pm 0,1>GCtrl=4,0 \pm 0,1=GIsso=4,4 \pm 0,08=GE2=4,3 \pm 0,5; p<0,05). **CONCLUSÕES:** Os estrogênios previnem a diminuição do volume nuclear dos cardiomiócitos e a deposição de colágeno entre as fibras musculares cardíacas. Já a administração de isoflavonas previne somente a deposição de colágeno, o que pode preservar as propriedades mecânicas das fibras cardíacas.

Abstract

PURPOSES: To evaluate the histomorphometry of cardiomyocytes and collagen present in the myocardium of rats treated with a concentrated extract of soy or 17 β -estradiol (E2). **METHODS:** Twenty-eight rats were divided into four groups: GCtrl – estrus phase; GOvx – ovariectomized (Ovx) and receiving vehicle; GIsso – Ovx and treated with soy extract (150 mg/kg per day); GE2 – Ovx and treated with E2 (10 μ g/kg per day). The drugs and vehicle (0.2 mL propylene glycol) were administered for 30 consecutive days after ovariectomy. On the last day the animals were anesthetized, the hearts removed, submerged in 10% formaldehyde and fragments of the ventricles underwent histological procedures, and the sections were stained with hematoxylin and eosin or picrossirius-red. Histomorphometric analysis (number and volume of nuclei and quantification of collagen) was performed under a light microscope with AxioVision Rel. 4.2 software, and collagen fibers were quantified using IMAGELAB-2000 software. Data were submitted to ANOVA followed by the Tukey test (p<0.05). **RESULTS:** We observed a higher number of cardiomyocyte nuclei in animals of the Ovx and Iso groups than in GE2 and GCtrl animals (GOvx=121.7 \pm 20.2=GIsso=92.8 \pm 15.4>GE2=70.5 \pm 14.8=GCtrl=66.3 \pm 9.6; p<0.05), while the nuclear volume was greater in the Ctrl and E2 groups (GE2=35.7 \pm 4.8 GCtrl=29.9 \pm 3.6>GIsso=26.5 \pm 4.5=GOvx=22.4 \pm 2.9; p<0.05). Collagen concentration was higher in the

Correspondência

Adriana Aparecida Ferraz Carbonel
Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Morfologia
Rua Botucatu, 740 – Vila Clementino
CEP: 04023-900
São Paulo (SP), Brasil

Recebido

01/06/2012

Aceito com modificações

05/09/2012

Study carried out at Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina / Unifesp-EPM

¹Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina / UNIFESP-EPM – São Paulo (SP), Brasil.

²Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo – USP – São Paulo (SP), Brasil.

Conflict of interest: none.

Ovx group ($GOvx=5.4\pm 0.1 > GCtrl=4.0\pm 0.1 = GIsso=4.4\pm 0.08 = GE2=4.3\pm 0.5$; $p < 0.05$). **CONCLUSIONS:** Estrogen may prevent the reduction of the nuclear volume of cardiomyocytes and collagen deposition between heart muscle fibers, while the administration of isoflavones only prevents the deposition of collagen, which can preserve the mechanical properties of cardiac fibers.

Introdução

O risco para doenças cardíacas é menor entre as mulheres antes da menopausa em comparação com homens de mesma idade ou mulheres após a menopausa sem terapia hormonal¹. Os efeitos aparentemente cardioprotetores dos estrogênios endógenos parecem prevenir doenças cardiovasculares (DCV) em mulheres na menacme. Por outro lado, a perda da proteção hormonal com a falência ovariana na produção de estrogênios na pós-menopausa leva ao aumento do risco de DCV¹. Sabe-se que o papel preventivo dos esteroides sexuais femininos foi sugerido pela primeira vez há mais de meio século, o que foi confirmado por inúmeros estudos nos quais a terapia de reposição hormonal estaria associada com a redução das DCV em mulheres na pós-menopausa². Contudo, mulheres com idade superior a 65 anos ou com mais de 10 anos de menopausa sofreriam o efeito contrário, ou seja, incremento do risco de DCV³.

O envelhecimento e a perda de estrogênios estão intimamente relacionados a doenças cardíacas na mulher. De fato, há relatos em que o processo inflamatório e o aumento de citocinas séricas como TNF e IL-6 se elevam com a idade e o hipoestrogeneísmo⁴. Além disso, especificamente no sistema cardiovascular, o envelhecimento é acompanhado de aumento da rigidez e da fibrose, perda da reserva contrátil, aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e disfunção endotelial⁵.

Em ratas adultas a ovariectomia induz aumento da expressão gênica de inúmeros genes pró-inflamatórios no coração, incluindo L-selectina, TNF, iNOS, fibronectina, e do receptor de LDL em comparação com animais com reposição imediata de 17β -estradiol (E2)⁶. É nesse contexto que os estrogênios atuam como antioxidantes realizando *upregulation* da expressão de genes que induziam aumento da atividade da eNOS, levando à diminuição da produção de superóxido^{7,8}. Estudos em ratas referem ainda que os estrogênios atenuam a hipertrofia cardíaca, levando a uma diminuição do índice de apoptose e de necrose das células cardíacas e endoteliais^{9,10}.

Numerosos produtos naturais oriundos de plantas, ou seja, os fitoestrogênios, que apresentam algumas propriedades estrogênicas, têm sido intensivamente estudados nos órgãos reprodutores, como útero e vagina, bem como na glândula mamária. Contudo, há poucos dados disponíveis a respeito dos efeitos dos fitoestrogênios sobre o coração. Nesse sentido foi realizado este estudo, com o objetivo de avaliar a ação das isoflavonas e dos estrogênios no coração de ratas.

Métodos

foram utilizadas ratas (*Rattus norvegicus albinus*) adultas, virgens, pesando aproximadamente 250 g, fornecidas pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos de Experimentação (CEDEME) da Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP-EPM). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP/EPM (parecer n° 0278/10), seguindo as diretrizes do Conselho Canadense para os Cuidados dos Animais¹¹.

Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, no Biotério da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural da UNIFESP, com temperatura ambiente controlada a 22 °C e iluminação artificial obtida com lâmpadas fluorescentes (modelo luz do dia de 40 Watts), com fotoperíodo claro de 10 horas (8:00 às 18:00) e 14 horas escuro, com alimentação e água *ad libitum*.

Após sete dias, animais com ciclos estrais regulares, ou seja, que apresentaram atividade ovariana regular, foram incluídos no estudo. Assim, 28 ratas foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos: GCtrl – animais na fase de estro tratados com propilenoglicol (0,2 mL/dia, por gavagem); GOvx – animais ovariectomizados (Ovx) tratados com propilenoglicol, por gavagem); GIsso – animais Ovx que receberam 125 µg/g por dia de genisteína, por gavagem; GE2 – animais Ovx que receberam 10 µg/kg de 17β -estradiol (E2), por dia, por via subcutânea.

Os animais foram ovariectomizados por via ventral após anestesia com cloridrato de xilazina (20 mg/kg) (Rompun®) e cloridrato de cetamina (10 mg/kg) (Ketalar®), via intraperitoneal. A administração das isoflavonas e do 17β -estradiol tiveram início 30 dias após a ovariectomia por mais 30 dias consecutivos, sempre no mesmo período do dia.

No início do experimento e ao final do tratamento hormonal todos os animais foram pesados em balança analítica. O extrato de soja utilizado no estudo apresentava um total de 42,6% de isoflavonas, das quais aproximadamente 36% de genisteína, 62% de daidzeína e 2% de glicitina (incluindo as isoformas das isoflavonas), e 4% do restante do extrato remanescente estava constituído por proteínas (Zhongshan Road, Dalian, China).

Após o término do período experimental os animais foram novamente anestesiados e após toracotomia, retirado o coração, ainda com batimentos, que foi imediatamente seccionado transversalmente ao maior eixo, ao nível dos ventrículos e mergulhado em formaldeído a 10% (tampão-fosfato 10 mM, pH 7,4), para posterior processamento histológico de inclusão em parafina. Os corações foram incluídos nos blocos de parafina de tal maneira

que pudéssemos realizar cortes transversais ao nível dos ventrículos. Dos blocos foram obtidos cortes de 5 µm, os quais foram corados pela hematoxilina e eosina (H.E) ou pelo *picrosirius red*. Ao final da retirada dos corações, os animais foram descartados segundo as normas vigentes na UNIFESP/EPM.

■ Análise morfológica e morfométrica

As análises morfológicas e quantitativas foram realizadas no Serviço de Histologia da UNIFESP/EPM. Para a avaliação morfológica utilizamos microscópio de luz (AxioLab, Carl Zeiss), com objetivas variando de 4 a 100x e oculares de 10x. Para a obtenção dos dados morfométricos, imagens de cortes longitudinais de feixes musculares do ventrículo esquerdo foram capturadas através de uma câmera de alta resolução (AxioCam-MCR da Carl Zeiss) adaptada a microscópio de luz (AxioLab, Carl Zeiss) com objetiva de 40x, que foram transmitidas a computador com *software AxioVision Rel 4.8* (Carl Zeiss).

Para a avaliação dos volumes nucleares dos cardiomiócitos foram obtidas 10 imagens de cada coração, perfazendo um total de 70 imagens por grupo. Posteriormente, com o auxílio de um *mouse*, foram medidos o menor e o maior diâmetro de 20 núcleos por imagem, para avaliação da atividade celular, sendo os valores aplicados na seguinte fórmula: $v = a^2 \cdot b / 1,91$ onde a = menor diâmetro, b = maior diâmetro e 1,91 uma constante. Para a determinação do número de cardiomiócitos por área utilizamos as mesmas fotomicrografias empregadas para a determinação do volume nuclear, sendo inicialmente delimitada a área de cada fotomicrografia e, em seguida, contados cardiomiócitos presentes, com os dados expressos em número de núcleos em $0,66 \text{ mm}^2$.

A quantificação do colágeno foi realizada com o mesmo equipamento mencionado, com objetivas de 40x. No entanto, foram adaptados ao microscópio de luz filtros de polarização, sendo as imagens analisadas com o programa *IMAGELAB*[®]. A quantificação do colágeno foi expressa em porcentagem de área ocupada.

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa *Graphpad Prism*[®] 5.0–2007. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando significantes, complementados pelo teste de Tukey, para observar as possíveis diferenças entre os grupos. O nível de significância foi fixado em 0,05 ou 5% ($p \leq 0,05$).

Resultados

O ganho de peso corporal dos vários grupos de estudo está expresso na Tabela 1. Podemos notar que o ganho de peso foi maior nos grupos Ovx e Iso em relação aos demais ($GOvx = 56,00 \pm 3,55 = GIso = 52,40 \pm 5,50 > GE2 = 32,80 \pm 2,50 > GCtrl = 10,20 \pm 5,95$; $p < 0,05$).

Tabela 1. Médias e desvios padrão do ganho de peso, número de núcleos, volume nuclear e porcentagem de colágeno presente no miocárdio de ratas pertencentes aos vários grupos de estudo

	Grupos			
	Ctrl	Ovx	Iso	E2
Ganho de peso (g)	10,2±5,9 ^a	56,0±3,5 ^a	52,4±5,5 ^a	32,8±2,5 ^b
Nº de Núcleos/0,66 mm ²	66,3±9,6 ^b	121,7±20,2 ^a	92,8±15,4 ^a	70,5±14,8 ^b
Volume nuclear (µm ³)	29,9±3,6 ^a	22,4±2,9 ^b	26,5±4,5 ^b	35,7±4,8 ^a
Colágeno (%)	4,0±0,1 ^b	5,4±0,1 ^a	4,4±0,08 ^b	4,3±0,5 ^b

Código: Ctrl: ratas na fase estro; Ovx: ratas ooforectomizadas; Iso: ratas tratadas com isoflavonas (125 µg/g, por dia de genisteína); E2: ratas tratadas com 17β estradiol (10 µg/kg, por dia). a>b>c; p<0,05.

■ Análise morfológica

Os miocárdios dos animais pertencentes aos vários grupos de estudo apresentaram a mesma arquitetura, ou seja, estavam constituídos por vários feixes de fibras musculares cardíacas separados uns dos outros por fibras colágenas do tipo I. Esses feixes estavam formados por células musculares cardíacas (cardiomiócitos), de forma alongada com um ou dois núcleos em posição central, contendo no citoplasma estriações transversais. Ao redor dos cardiomiócitos notamos a presença de células do tecido conjuntivo, fibras colágenas tipo III e capilares sanguíneos. Nos grupos Ctrl e tratados com isoflavonas (GIso) ou estradiol (GE2) percebemos cardiomiócitos mais evidentes contendo núcleos mais volumosos, com nucléolos mais evidentes em relação ao grupo ovariectomizado (GOvx) (Figura 1).

■ Morfometria

Notamos haver maior quantidade de núcleos nos animais dos grupos Ovx e Iso do que no GE2 e GCtrl ($GOvx = 121,7 \pm 20,2 = GIso = 92,8 \pm 15,4 > GE2 = 70,5 \pm 14,8 = GCtrl = 66,3 \pm 9,6$; $p < 0,05$), sendo o volume nuclear maior nos animais do grupo Ctrl e E2 ($GE2 = 35,7 \pm 4,8 = GCtrl = 29,9 \pm 3,6 > GIso = 26,5 \pm 4,5 = GOvx = 22,4 \pm 2,9$; $p < 0,05$). Com relação à concentração do colágeno notamos maior concentração no grupo Ovx ($GOvx = 5,4 \pm 0,1 > GCtrl = 4,0 \pm 0,1 = GIso = 4,4 \pm 0,08 = GE2 = 4,3 \pm 0,5$; $p < 0,05$). Os dados relativos ao número de núcleos, volume nuclear e porcentagem de colágeno presente no coração de ratas pertencentes aos vários grupos de estudo estão expressos na Tabela 1.

Discussão

Investigamos os efeitos da reposição hormonal com isoflavonas e estrogênios sobre a morfologia cardíaca, sendo selecionadas ratas após um período de 30 dias de ovariectomia, por ser esse um período que corresponde ao de uma mulher na pós-menopausa imediata¹². Com relação à dose de extrato de soja administrada baseamos em trabalho prévio, no qual, utilizando este mesmo extrato de soja em ratas castradas por 28 dias, realizamos

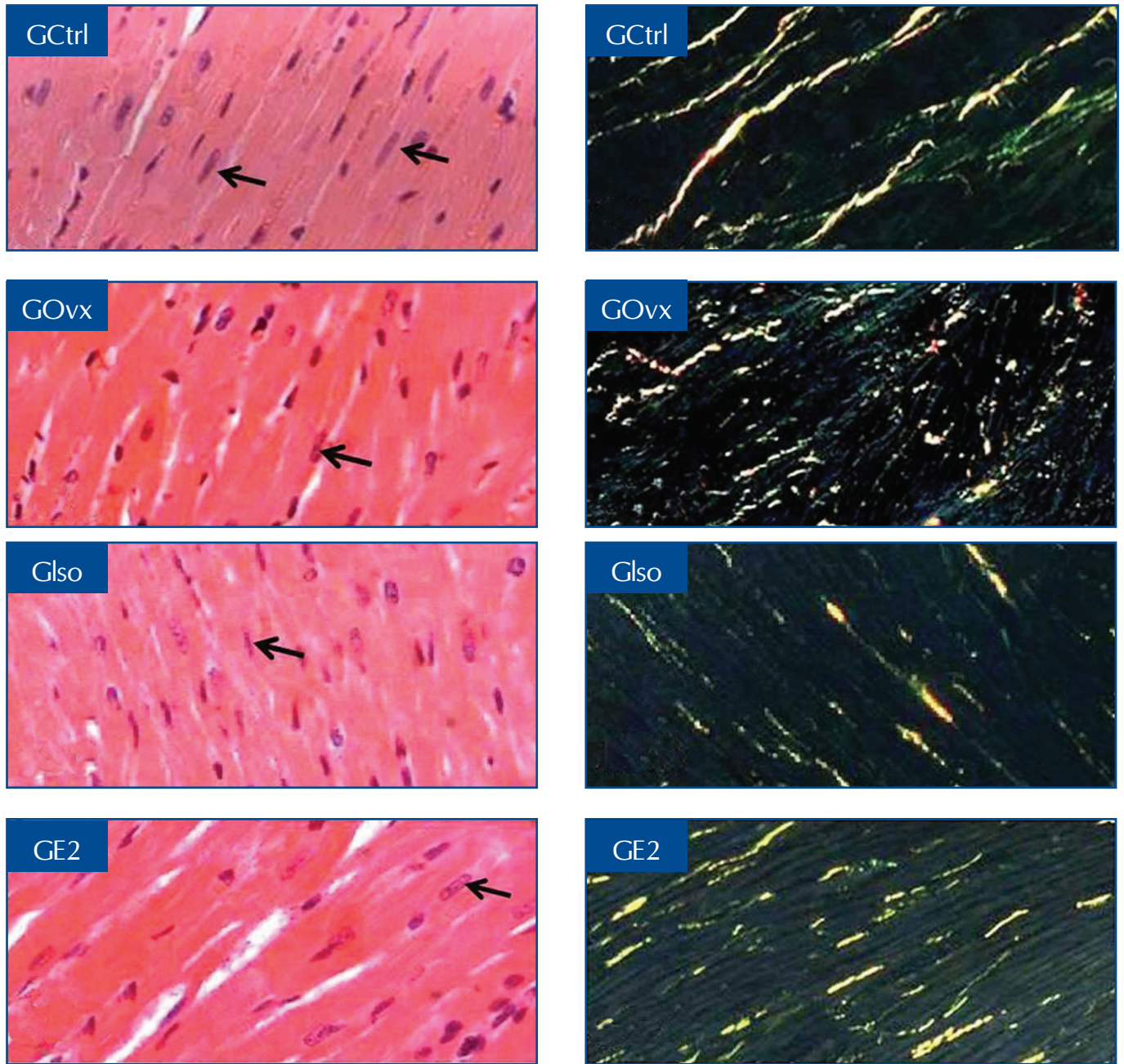


Figura 1. Fotomicrografias de cortes de corações corados pelo H.E. (vistas em microscópio de luz) e pelo picosirius red (vistas em microscópio de polarização) pertencentes aos vários grupos de estudo. Nos cortes corados pelo H.E., notar nas setas núcleos de cardiomiócitos. Ao microscópio de polarização observar as fibras colágenas birrefringentes e sua disposição no tecido muscular cardíaco. GCtrl: controle; GOvx: ovariectomizado; GE2: tratado com 17β estradiol, Glso: tratado com isoflavonas. 400x.

curva dose resposta avaliando-se o exame colpocitológico e o peso do útero em relação ao conteúdo de genisteína administrada. A dose por nós selecionada no presente estudo foi a menor dose capaz de produzir queratinização do epitélio vaginal e aumento significativo no peso do útero em comparação ao Grupo Controle, o que correspondeu a $125 \mu\text{g/g}$ de peso corporal de genisteína¹³. A dose de E2 é a mais utilizada em ratas ovariectomizadas¹⁴.

A maioria dos estudos avalia a ação dos estrogênios e dos fitoestrogênios sobre o sistema reprodutor da rata, sendo poucos os que avaliam os efeitos dos estrogênios

sobre o músculo cardíaco¹⁵. Estudos experimentais indicam haver efeito protetor dos estrogênios no índice de apoptose dos cardiomiócitos⁶. No entanto, ensaios clínicos não mostraram haver proteção cardíaca nos esquemas de reposição hormonal^{16,17}. Nossos dados mostram que o estrogênio teve um efeito protetor no coração mais relevante que as isoflavonas quando analisados o número de núcleo e o volume nuclear. Contudo, os efeitos de ambas as substâncias foram semelhantes quanto à quantificação do colágeno. Salienta-se que quanto maior o percentual de colágeno, pior é a contração cardíaca¹⁸.

No coração adulto normal cerca de 2 a 4% do miocárdio é formado por colágeno; no entanto, visto a rigidez e sua força tênsil, pequenas mudanças na sua concentração podem acarretar efeitos nas propriedades mecânicas do coração. Assim, o comportamento do miocárdio depende da proporção, tipo e o diâmetro das fibras colágenas¹⁸. Com relação ao conteúdo de colágeno verificamos maior quantidade de colágeno no grupo Ovx e menor no Controle (Ctrl) e nos tratados com estrogênio (E2) ou isoflavonas (Iso). Isto sugere que as isoflavonas e os estrogênios são agentes protetores contra a fibrose cardíaca devido à deprivação hormonal. Nossos dados encontram apoio em trabalhos que referem que a reposição com 17 β -estradiol atenua a deposição de colágeno tipo I no miocárdio de ratas, e impede a fibrose perivascular^{19,20}. Nas ratas hipertensas, com hipertrofia do ventrículo esquerdo e aumento da expressão do colágeno tipo I, a administração de genisteína é capaz de restaurar a ação do óxido nítrico (NO) e a expressão da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), com melhora da remodelação cardíaca, atenuando a expressão excessiva do colágeno tipo I¹⁰.

Entre as alterações mais comuns no coração destaca-se a fibrose, evento importante na progressão das doenças cardíacas. Agentes como a angiotensina II (Ang II) e a endotelina I produzidos pelos fibroblastos, macrófagos e o endotélio, têm como resultado final a síntese dos colágenos tipos I e III. Em estudo experimental foi possível observar que em corações de ratas ovariectomizadas a infusão da Ang II levou a hipertrofia e fibrose cardíaca, enquanto os estrogênios preveniram esses acontecimentos, mas não em animais sem o receptor beta de estradiol (ER β)²¹.

Em nosso experimento, notamos haver aumento de ganho de peso corporal nos animais dos grupos ooforectomizados e tratados com isoflavona em relação ao Controle e aos tratados com estrogênio, indicando que as isoflavonas nesse período de estudo não foram capazes de reverter o ganho de peso devido à deprivação hormonal. Alguns autores referem que os níveis séricos de leptina (sintetizada e segregada por adipócitos) estão relacionadas com a massa

gorda, visto que foi observado associação entre SM e os níveis séricos de leptina em mulheres na pós-menopausa^{22,23}.

Alguns estudos sugerem que a menopausa está associada a alterações hemodinâmicas e a um remodelamento ventricular esquerdo. Estudo coorte com mulheres na pré e pós-menopausa da mesma idade, etnia, peso e pressão arterial mostrou que mulheres na pós-menopausa apresentam evidências de início de remodelamento ventricular esquerdo concêntrico, que se manifesta por maior espessura da parede ventricular do que em mulheres antes da menopausa com níveis estrogênicos normais²⁴.

Em nosso estudo a análise histomorfométrica, número e volume nuclear dos cardiomiócitos do grupo que recebeu isoflavona apresentou valores semelhantes aos do grupo Ovx; já os dados do grupo E2 apresentaram-se semelhantes aos do Grupo Controle, mostrando ação protetora do estradiol em relação aos cardiomiócitos. Esses dados encontram apoio em trabalhos que referem haver diminuição na porcentagem de apoptose no miocárdio de ratas tratadas com estrogênios devido à diminuição do TNF-alfa, Fas ligante (Fas L), receptores da morte Fas (FAS), Fas-associado ao domínio de morte (FADD), das caspases 3 e 8 ativadas^{6,9}.

Alguns autores relatam ainda que a ovariectomia aumenta o índice de apoptose nos cardiomiócitos e induz alterações dos genes pró-apoptóticos Bcl-2 e Bax^{9,24}. Em modelo experimental de isquemia e reperfusão em coelhos a genisteína, quando administrada após cinco minutos do infarto, foi capaz de reduzir o tamanho do infarto e o índice de apoptose dos cardiomiócitos²⁵.

Os achados deste estudo mostraram que a reposição com estrogênio em ratas ovariectomizadas tem efeito benéfico no coração, e que as isoflavonas mimetizam esse efeito em menor grau, no entanto novos estudos devem ser realizados.

Agradecimentos

Fonte de financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

Referências

1. Leuzzi C, Marzullo R, Modena MG. Is menopause a risk factor for ischemic heart disease in women? *G Ital Cardiol (Rome)*. 2012;13(6):401-6.
2. Duncan AC, Petrie JR, Brosnan MJ, Devlin AM, Bass RA, Charnock-Jones DS, et al. Is estradiol cardioprotection a nitric oxide-mediated effect? *Hum Reprod*. 2002;17(7):1918-24.
3. Hodis HN, Mack WJ. A "window of opportunity:" the reduction of coronary heart disease and total mortality with menopausal therapies is age- and time-dependent. *Brain Res*. 2011;1379:244-52.
4. Donato AJ, Black AD, Jablonski KL, Gano LB, Seals DR. Aging is associated with greater nuclear NF kappa B, reduced I kappa B alpha, and increased expression of proinflammatory cytokines in vascular endothelial cells of healthy humans. *Aging Cell*. 2008;7(6):805-12.
5. Knowlton AA, Lee AR. Estrogen and the cardiovascular system. *Pharmacol Ther*. 2012;135(1):54-70.
6. Aksakal E, Akaras N, Tanboga IH, Kurt M, Halici Z, Odabasoglu F, et al. Relationship between oxidative stress and cardiomyopathic changes in ovariectomized rats. *Cardiology*. 2011;119(4):235-41.
7. Florian M, Freiman A, Magder S. Treatment with 17-beta-estradiol reduces superoxide production in aorta of ovariectomized rats. *Steroids*. 2004;69(13-14):779-87.

8. Siow RC, Mann GE. Dietary isoflavones and vascular protection: activation of cellular antioxidant defenses by SERMs or hormesis? *Mol Aspects Med.* 2010;31(6):468-77.
9. Liou CM, Yang AL, Kuo CH, Tin H, Huang CY, Lee SD. Effects of 17 β estradiol on cardiac apoptosis in ovariectomized rats. *Cell Biochem Funct.* 2010;28(6):521-8.
10. Liu A, Gao L, Kang S, Liu Y, Xu C, Sun H, et al. Testosterone enhances estradiol's cardioprotection in ovariectomized rats. *J Endocrinol.* 2012;212(1):61-9.
11. Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA, editors. *Guide to the care and use of experimental animals.* 2nd ed. Ottawa: Canadian Council on Animal Care; 1993.
12. Nakao S, Minamide A, Kawakami M, Boden SD, Yoshida M. The influence of alendronate on spine fusion in an osteoporotic animal model. *Spine (Phila Pa 1976).* 2011;36(18):1446-52.
13. Santos ET, Sampaio MD, Cecon PR, Simões MJ, Sartori MG, Girão MJ. Effects of soy isoflavones on the uterus and urethra of ovariectomized rats. *Int Urogynecol J.* 2010;21(1):111-6.
14. Ozcura F, Dündar SO, Cetin ED, Beder N, Dündar M. Effects of estrogen replacement therapy on apoptosis and vascular endothelial growth factor expression in ocular surface epithelial cells: an experimental study. *Int J Ophthalmol.* 2012;5(1):64-8.
15. Nguyen BT, Kararigas G, Wuttke W, Jarry H. Long-term treatment of ovariectomized mice with estradiol or phytoestrogens as a new model to study the role of estrogenic substances in the heart. *Planta Med.* 2012;78(1):6-11.
16. Nelson HD, Humphrey LL, Nygren P, Teutsch SM, Allan JD. Postmenopausal hormone replacement therapy: scientific review. *JAMA.* 2002;288(7):872-81.
17. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA.* 2002;288(3):321-33.
18. Brower GL, Gardner JD, Forman MF, Murray DB, Voloshenyuk T, Levick SP, et al. The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2006;30(4):604-10.
19. Xu Y, Arenas IA, Armstrong SJ, Davidge ST. Estrogen modulation of left ventricular remodeling in the aged heart. *Cardiovasc Res.* 2003;57(2):388-94.
20. Voloshenyuk TG, Gardner JD. Estrogen improves TIMP-MMP balance and collagen distribution in volume-overloaded hearts of ovariectomized females. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;299(2):R683-93.
21. Pedram A, Razandi M, O'Mahony F, Lubahn D, Levin ER. Estrogen receptor-beta prevents cardiac fibrosis. *Mol Endocrinol.* 2010;24(11):2152-65.
22. Lee SW, Jo HH, Kim MR, You YO, Kim JH. Association between metabolic syndrome and serum leptin levels in postmenopausal women. *J Obstet Gynaecol.* 2012;32(1):73-7.
23. Morris DH, Jones ME, Schoemaker MJ, McFadden E, Ashworth A, Swerdlow AJ. Body mass index, exercise, and other lifestyle factors in relation to age at natural menopause: analyses from the breakthrough generations study. *Am J Epidemiol.* 2012;175(10):998-1005.
24. Gardner JD, Brower GL, Janicki JS. Effects of dietary phytoestrogens on cardiac remodeling secondary to chronic volume overload in female rats. *J Appl Physiol.* 2005;99(4):1378-83.
25. Fabris B, Candido R, Bortoletto M, Toffoli B, Bernardi S, Stebel M, et al. Stimulation of cardiac apoptosis in ovariectomized hypertensive rats: potential role of the renin-angiotensin system. *J Hypertens.* 2011;29(2):273-81.