

Efecto del Entrenamiento Físico en Alteraciones Inducidas por el Envejecimiento en el Músculo Papilar de la Rata

Laura Beatriz Mesiano Maifrino^{1,4}; Rubens Correa Araújo¹; Cristiane Castro Faccini⁴, Edson Aparecido Liberti², Eliane Florêncio Gama¹; Antonio Augusto Coppi Maciel Ribeiro³, Romeu Rodrigues de Souza¹

Laboratório de Biodinâmica, Universidade São Judas Tadeu¹; Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas²; Instituto de Ciências Biomédicas e Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo³; Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia⁴, São Paulo, SP - Brasil

Resumo

Fundamento: Los efectos del envejecimiento en el músculo papilar han sido demostrados de modo amplio, pero no hay datos disponibles sobre los efectos del ejercicio en las alteraciones relacionadas a la edad.

Objetivo: Analizar los efectos del envejecimiento en las propiedades morfológicas y cuantitativas del músculo papilar e investigar si un programa continuo de ejercicios moderados puede ejercer un efecto protector contra las consecuencias del envejecimiento.

Métodos: Se utilizó microscopia electrónica para estudiar la densidad de los miocitos, capilares y tejido conectivo, así como el área transversal de los miocitos del músculo papilar en el ventrículo izquierdo de ratas Wistar de 6 y 13 meses, no entrenadas y sometidas a ejercicios.

Resultados: Como se esperaba, la densidad de volumen de los miocitos disminuye significativamente ($p < 0,05$) con el avance de la edad. La densidad de longitud de los capilares también disminuye con la edad, pero no de forma significativa. La fracción de volumen intersticial del tejido del músculo capilar aumenta significativamente con el avance de la edad ($P < 0,05$). El número de perfiles de miocitos mostró una reducción del 20%, seguida de su hipertrofia en el envejecimiento ($P < 0,05$). Sometidos a una sesión diaria de 60 minutos, 5 días/semana a 1,8 km.h⁻¹ de corrida moderada en estera ergométrica durante 28 semanas, los animales mostraron una reversión de todos los efectos del envejecimiento observados en el músculo papilar.

Conclusión: El presente estudio apoya el concepto de que entrenamiento físico de largo plazo impide los cambios letales en el músculo papilar relacionados a la edad. (Arq Bras Cardiol 2009;92(5):373-377)

Palabras clave: Ejercicio, músculos papilares, envejecimiento, ratas.

Introducción

Los músculos papilares forman parte integral de los ventrículos y ejercen un rol importante en su geometría y función sistólica¹⁻⁴. Estudios anteriores sobre variaciones en sus características de acuerdo con la edad^{1-3,5} demostraron que la densidad de los miocitos, del tejido conectivo y los capilares, así como el área transversal de dichos miocitos y las características físicas y bioquímicas del músculo papilar dependen de la edad⁶⁻¹³. Los efectos más evidentes relacionados a éste factor en el músculo papilar son: la pérdida de células musculares y un aumento del tejido conectivo^{9,10}.

Por otro lado, ya se demostró que el ejercicio aeróbico altera algunos de los cambios relacionados a la edad en la pared del miocardio ventricular izquierdo de ratas¹⁴⁻¹⁷. Sin embargo, no se dispone de datos acerca del efecto del ejercicio habitual

sobre los cambios provocados por la edad en el músculo papilar. De esa forma, en el presente estudio, investigamos los efectos del envejecimiento en la morfología y densidad referentes a los miocitos, los capilares y el tejido conjuntivo, así como el área transversal de los miocitos del músculo papilar del ventrículo izquierdo (VI). Analizamos también la hipótesis de que un programa de ejercicios moderados de largo plazo podría ejercer una función protectora contra los efectos letales del envejecimiento.

Material y métodos

Animales y procedimientos

Se mantuvieron 15 ratas machos Wistar de 6 meses de edad, con peso de aproximadamente 420 g cada, en grupos de 5, dentro de una sala con luz y temperatura controladas, con ración *ad libitum*. Se dividieron los animales de modo aleatorio en tres grupos: joven control (JC), ejercicio (E) y no entrenado (N). El grupo E corrió en una cinta ergométrica, cinco días por semana. La intensidad del programa aumentó progresivamente hasta la 4ª semana, cuando las ratas empezaron a correr por 1 hora diaria a 1,8 km.h⁻¹. Ese nivel

Correspondencia: Laura Beatriz Mesiano Maifrino •

Rua Pirandello, 770 casa 08 - Brooklin Paulista - 04.623-000, São Paulo, SP - Brasil.

E-mail: lmaifrino@uol.com.br

Artículo recibido el 02/04/2008; revisado recibido el 13/05/2008;

aceptado el 15/05/2008.

se mantuvo durante el restante del período experimental. El período de entrenamiento total fue de 28 semanas.

Se puede considerar como moderado el tipo de ejercicio utilizado en ese experimento. Se pusieron las ratas del grupo N sobre la cinta ergométrica parada por 10 minutos, diariamente, para que el manejo de los animales resultara equivalente. El Comité de Ética de nuestra Universidad aprobó el manejo de los animales, de acuerdo con el *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, D. C., 1996)* así como los Principios Éticos en Experimentos Animales del Colegio Brasileño de Experimentos Animales (COBEA).

Preparación de las muestras de tejido

Al final del experimento, se anestesiaron los animales de los grupos N y E con 13 meses de edad (considerados con edad mediana^{4,18}) con pentobarbital sódico (3 mg/100 g de peso corporal, vía intraperitoneal) y, enseguida, sacrificados. Se sacrificó el grupo adicional de 5 animales (grupo joven control, JC) a los 6 meses de edad. Se pararon los corazones en la diástole. Se realizó la perfusión del miocardio a través de la aorta a una presión constante de 80 mmHg, por medio de 0,1 M de tampón cacodilato (3 minutos), seguido de solución de glutaraldehído 2,5 % diluida en tampón cacodilato.

Se heparinizaron a los animales antes de la fijación para optimizar la perfusión-fijación. Se retiró el corazón; enseguida se abrió el VI y disecó el músculo papilar. Se cortó cada músculo papilar en tajadas de aproximadamente 3 mm de ancho y 5 mm de longitud. Se postfijaron esas tajadas de tejido en tetróxido de osmio, en tampón cacodilato de sodio, por 1 hora. Se deshidrató el tejido en graduaciones de alcohol, embebido en resina Epon y seccionado, de modo que las células musculares de mitad de los bloques se cortaron transversalmente, mientras que la otra mitad se seccionó longitudinalmente. Se colorearon cortes finos con acetato de uranila¹⁹ y citrato de plomo²⁰, para estudio con microscopía electrónica de transmisión. Se utilizaron las secciones longitudinales para evaluar el estado de fijación del miocardio con base en la medición de la longitud del sarcómero en los 3 grupos.

Estereología

Para efectuar el análisis cuantitativo, se utilizaron dos bloques elegidos al azar de cada músculo papilar, cuyos miócitos se cortaron en transversal. Se pusieron las secciones ultrafinas sobre una parrilla de cobre; se seccionaron 10 campos por bloque, también elegidos al azar, para micrografías, producidas con un microscopio electrónico de transmisión Jeol. Se utilizaron micrografías electrónicas de baja potencia (x600) para el análisis cuantitativo de la composición de tejido del músculo papilar del VI. Se analizó cada micrografía electrónica con auxilio de un software procesador de imágenes digitales para el área biomédica (Axio Vision, Zeiss). Se analizó un total de 300 micrografías electrónicas. Se utilizó un sistema test con 72 puntos de muestra en la pantalla del monitor y se lo calibró.

Se analizó el miocardio teniendo en cuenta los miócitos

(mi) y el intersticio cardiaco (tejido conectivo [tc]). Se estimó la densidad de volumen para los miócitos ($Vv[mi]$) y el tejido conectivo ($Vv[tc]$): ($Vv[estructura] = P_p[estructura]/P_T$) (P_p es el número de puntos que inciden sobre la estructura; P_T es el número total de puntos-test). Se estimó la densidad de longitud de los capilares miocárdicos, $C_v[ca] = 2Q_A$ mm/mm³, así como el valor de Q_A –la densidad numérica por área de unidad– para miócitos (Q_A [mi]). Se valoró la densidad numérica de los perfiles celulares o capilares en una determinada área a través de la siguiente fórmula: $Q_A = \sum \text{perfiles} / \text{determinada área}$.

También se determinó el área transversal media de los miócitos (Área[mi]) en cada animal y para cada grupo. Los resultados se presentan en promedio \pm EPM computados a partir del promedio de medidas obtenidas de cada animal.

Análisis estadístico

Al evaluar la significancia estadística a través de ANOVA y la prueba de Bonferroni; se consideraron significantes los valores de P menores que 0,05.

Resultados

Efectos del ejercicio

La Figura 1 muestra la apariencia ultramicroscópica de secciones transversales del músculo papilar del VI en el presente grupo de ratas. Si se comparan las ratas del grupo N y JC, el análisis con microscopía electrónica de secciones ultrafinas reveló la presencia de áreas focales escasas de fibrosis –tanto la intersticial como la de sustitución– a través del miocardio del músculo papilar del primer grupo, de ratas a los 13 meses de edad (Fig. 1C, D), con relación al segundo, compuesto por ratas JC (Fig. 1A, B). En las ratas del grupo E, el programa de corrida continua en cinta ergométrica, utilizado en ese estudio, redujo la fibrosis intersticial en el músculo papilar entrenado envejecido (Fig. 1E, F). La longitud del sarcómero de todas las secciones de tejido era similar (aproximadamente 2.1 μ m) (Fig. 2), lo que permitió, por tanto, su comparación. Diferentes longitudes de sarcómero no permitiría la comparación, ya que afectaría los diámetros celulares y, consecuentemente, los volúmenes celulares y la densidad de volumen.

En la Tabla 1 están detalladas las características generales de los tres grupos de ratas y sus respectivas VI. El peso corporal de los grupos E y N al inicio del entrenamiento (a los 6 meses de edad) fue 421 ± 8 g y 427 ± 9 g, respectivamente (NS). Al final de programa de corrida, el peso corporal de las ratas adultas mayores del grupo E (con 13 meses de edad en esta época) era significativamente más bajo (461 ± 10 g) que el de ratas semejantes (también con 13 meses de edad) del grupo N (509 ± 11 g) ($P < 0,05$). El peso del VI aumentó el 19,5% en el grupo E ($P < 0,05$). La relación peso del VI/ peso corporal resultó significativamente mayor ($P < 0,05$) en los animales adultos mayores del grupo E, si comparados al grupo N.

Ya la Tabla 2 detalla los cambios cuantitativos en el miocardio del músculo papilar, provocados por el envejecimiento, y los efectos del ejercicio. La densidad de volumen de los miócitos en el miocardio envejecido fue el 11% más baja que la densidad medida en el grupo JC

($P < 0,05$). Como también muestra la Tabla 2, las alteraciones en dirección opuesta a aquellas vistas en el compartimiento miocito ocurrieron en la fracción de volumen intersticial del tejido. Ese constituyente cuantitativo resultaba más alto en el miocardio envejecido del grupo N, cuando comparado con el grupo JC ($P < 0,05$). La densidad de longitud de los capilares miocárdicos era levemente menor en las ratas adultas mayores del grupo N, en comparación con el JC (NS). El conteo de los perfiles de miocitos por milímetro cuadrado mostró una reducción del 20% en el número de miocitos de las ratas del grupo N, con su envejecimiento ($P < 0,05$). Las ratas adultas mayores del grupo N presentaban hipertrofia de los miocitos. Si se comparan éstos a los del grupo JC ($P < 0,05$), se percibe que hubo un aumento del 50% del área [mi]. Sin embargo, no se verificaron esos cambios relacionados a la edad en ratas adultas mayores condicionadas por el entrenamiento físico crónico (Tabla 2).

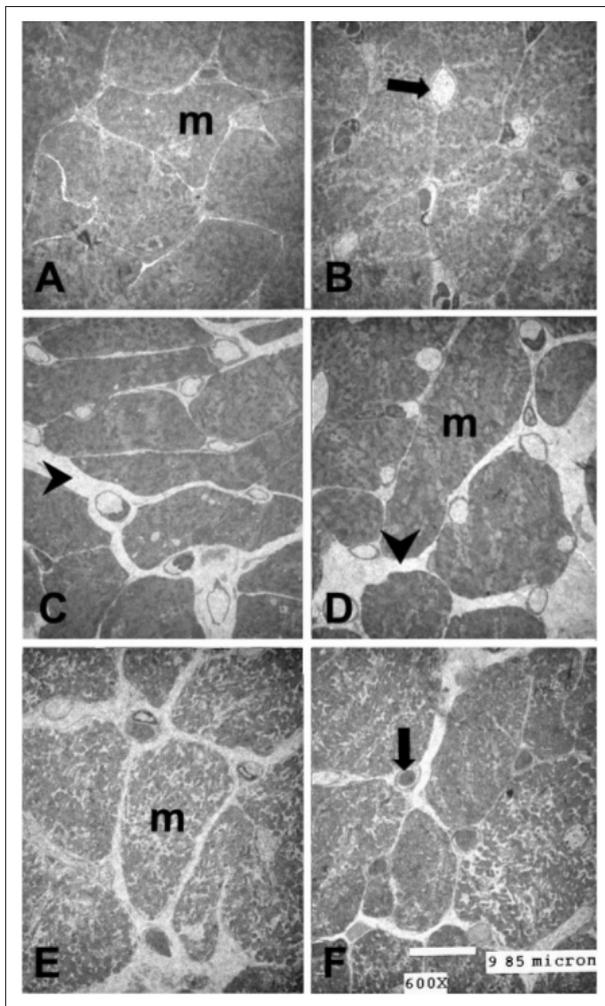


Figura 1 - Cortes ultrafinos de bloques de tejido de músculo papilar, embebidos en Epon, de ratas de los grupos JC (paneles A y B), N (paneles C y D) y E (paneles E y F). Observe la fibrosis intersticial y de sustitución (flechas) en el grupo N (paneles C y D), algo que no se observó en otros grupos (grupo JC, paneles A y B y grupo E, paneles E y F). Flechas: capilares; m: miocitos. Se delimitan fácilmente los perfiles de los capilares y los límites celulares musculares se pueden diferenciar con seguridad. Barra: 9,85 μm .

Tabla 1 – Peso corporal y del corazón en tres grupos de ratas estudiados

Parámetro /Grupos	JC	N	E
n	5	5	5
Edad, meses	6	13	13
Peso corporal, inicial, g	421 \pm 9	427 \pm 9	421 \pm 8
Peso corporal, terminal, g	-	509 \pm 11	461 \pm 10 ^a
VI, g	0,912 \pm 8	0,920 \pm 32	1,100 \pm 46 ^b
Peso VI /peso corporal, $\times 10^{-3}$	2,1 \pm 0,05	1,8 \pm 0,07	2,3 \pm 0,15 ^a

Grupos: JC - joven control; N - no entrenado; E - Ejercicio; Los valores están expresados en promedios \pm EPM; n - número de ratas; VI - ventrículo izquierdo; ^a $P < 0,05$ vs. U; ^b $P < 0,05$ vs. JC y N.

Tabla 2 – Parámetros estereológicos (Promedio \pm EPM)

Parámetro /Grupos	JC	N	E
Vv[mi] (%)	83 \pm 4 ^a	74 \pm 5	80 \pm 6 ^a
Vv[tc] (%)	8 \pm 4 ^a	14 \pm 5	12 \pm 1 ^a
Lv[ca] (10^2 mm/mm ³)	17 \pm 9	16 \pm 8	20 \pm 2 ^b
QA[mi] /mm ²	5 \pm 1 ^a	4 \pm 1	5 \pm 1 ^a
Área [mi] (μm^2)	180 \pm 74 ^a	270 \pm 83	210 \pm 60 ^c

Grupos: JC - joven control; N - no entrenado; E - Ejercicio; VV - Densidad de Volumen; Lv - densidad de longitud; QA - densidad numérica por área de unidad; mi - miocitos; tc - tejido conectivo; Ca - capilares. ^a $P < 0,05$ vs. N, ^b vs. JC e N y ^c vs. JC.

El ejercicio físico aumentó significativamente o Vv[mi] en las ratas adultas mayores, y resultó también en la disminución de la fibrosis miocárdica: Vv[tc] fue más del 25% menor en los animales sometidos al entrenamiento físico (Tabla 2). Sin embargo, se mantuvo el incremento del Área[mi] producido por el envejecimiento. No hubo diferencia entre los grupos N y E en lo que respecta al Área[mi]. El ejercicio físico aparentemente también mejoró la vascularización miocárdica en el grupo de animales E; el Lv[ca] fue mayor en ratas adultas mayores del grupo E que en ratas del grupo N ($P < 0,05$).

Discusión

El diseño de los cambios en la estructura y función del corazón en virtud del envejecimiento –así como de los factores que pueden contribuir para revertir dichos cambios– se vuelve cada vez más importante, si se considera que más del 50% de la mortalidad y gran parte de las hospitalizaciones de adultos mayores son consecuencia de enfermedades cardiovasculares²¹. Por tanto, resulta fundamental el aislamiento e identificación de los efectos de envejecimiento, con la finalidad de distinguirlos de aquellos relacionados a alteraciones patológicas.

Hay una creencia general de que, a medida que envejece, el corazón sufre un determinado grado de hipertrofia^{9,17,21}. Sin embargo, basado en los resultados corrientes, el peso del VI no aumentó de manera consistente con la edad, estándar que se observa no sólo en los resultados presentes, sino también

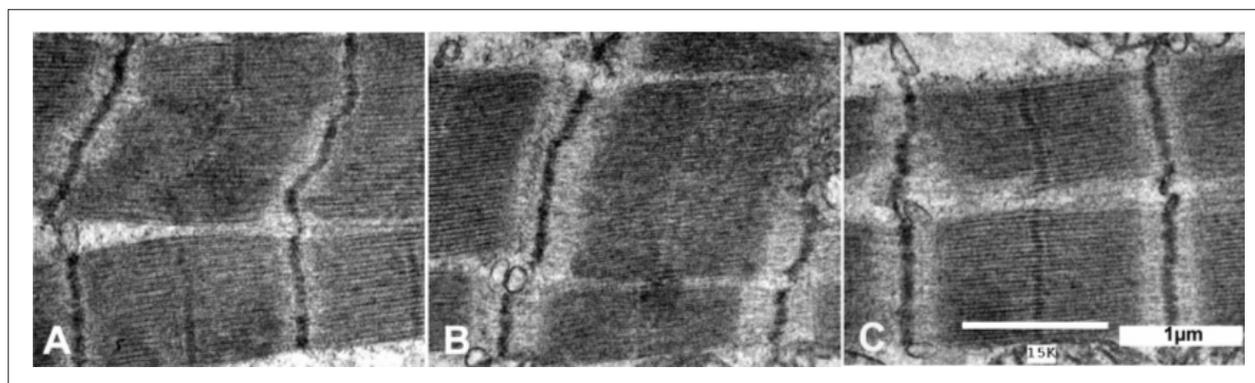


Figura 2 - Cortes ultrafinos de bloques de tejido de músculo papilar, embebidos en Epon, de ratas pertenecientes a los grupos JC (paineles A), N (paineles B) y E (paineles C). Observe que las fibras musculares muestran sarcómeros con la misma longitud, aproximadamente, en los tres grupos. Barra: 1 μ m.

en los estudios de otros autores^{7,22,23}.

Este estudio verificó que alteraciones morfocuantitativas acompañaron el envejecimiento del músculo papilar del ventrículo izquierdo (VI), gran parte de las cuales atenuadas por el ejercicio físico. Los resultados cuantitativos demuestran la ocurrencia de una pérdida significativa de miocitos con el avance del proceso envejecimiento en el músculo papilar del VI en las ratas del grupo N. En este grupo se observó una reducción del 20% en la densidad numérica de los miocitos. Esos resultados son similares a los hallazgos obtenidos por otros autores, que evidenciaron una reducción en el número total de miocitos en los ventrículos de ratas de 4 para 12 meses⁷ y de 4 para 15 meses⁹. De acuerdo con Anversa et al.²⁴, un fenómeno comparable también ocurre en el corazón humano^{12,25,26}. Es posible, entonces, que la hipertrofia de los miocitos que ocurrió en el corazón adulto mayor haya sido capaz de compensar la pérdida de esas células musculares.

Los resultados del presente trabajo confirman hallazgos previos, que revelan que la disminución del número de miocitos con el avance de la edad se asocia a un aumento del tejido intersticial^{9,10}. También se observó la acumulación de colágeno en el corazón humano^{11,12}. Sigue todavía desconocido el mecanismo responsable de la pérdida de miocitos con áreas de fibrosis intersticial y de sustitución en el miocardio⁷. La isquemia es una posibilidad probable^{7,26}. Sin embargo, en el presente estudio, el conteo de los perfiles capilares no reveló disminución en su densidad numérica en las ratas adultas mayores del grupo N. Bajo isquemia, el tejido miocárdico responde de distintas maneras: remodelado²⁷, pérdida de miocito en virtud de la apoptosis y necrosis²⁸⁻³¹, y también fibrosis reparadora^{32,33}. De acuerdo con otros autores³⁴ es probable que la pérdida de miocitos sea resultado principalmente de la apoptosis –muerte celular genéticamente programada. Es también posible que dichas alteraciones en el músculo papilar relacionadas a la edad sean responsables no sólo por la deficiencia de rigidez en el músculo papilar, como también por la complacencia del VI en edad avanzada³⁵.

Anteriormente, otros estudios utilizaron las alteraciones en el área transversal de miocitos¹⁷ para caracterizar hipertrofia inducida por el envejecimiento en términos de organización celular. Sin embargo, el estudio de Anversa et al.⁷ demostró que la hiperplasia celular de los miocitos también participa

de la respuesta hipertrófica del miocardio durante a senescencia⁷.

Se espera que la pérdida continua de miocitos en los ventrículos provoque una carga mayor en los miocitos restantes, carga ésta que puede funcionar como un estímulo mecánico crónico para el crecimiento celular^{7,11,12,24,36}.

El ejercicio aeróbico durante la fase de envejecimiento no sólo mejoró con la vascularización miocárdica sino también normalizó la fibrosis miocárdica. Lo que se espera es que la mayor concentración de perfiles capilares produzca, por un lado, un incremento de la superficie luminal del endotelio accesible para intercambio de oxígeno en el tejido; y, por otro, una disminución de la distancia máxima de difusión para el transporte de oxígeno hacia los miocitos⁷.

Conclusión

En conclusión, el presente estudio suministra informaciones morfocuantitativas, que demuestran que la práctica diaria de ejercicios físicos moderados durante la fase de envejecimiento impide algunas alteraciones letales relacionadas a la edad en el músculo papilar, tales como la pérdida de miocitos, el aumento en el tejido intersticial, y una disminución de la densidad numérica de los perfiles capilares.

Potencial Conflicto de Intereses

Declaro no haber conflicto de intereses pertinentes.

Fuentes de Financiación

El presente estudio no tuvo fuentes de financiación externas.

Vinculación Académica

Este artículo forma parte de tesis de Maestría de Laura Beatriz Mesiano Maifrino; Rubens Correa Araújo; Cristiane Castro Faccini, Edson Aparecido Liberti, Eliane Florêncio Gama; Antonio Augusto Coppi Maciel Ribeiro y Romeu Rodrigues de Souza por la Universidad de São Judas Tadeu, Universidad de São Paulo e Instituto Dante Pazzanese de Cardiología.

Referencias

- Gwathmey JK, Slawsky CL, Perrault G, Briggs M, Morgan JP, Wei JY. Effect of exercise conditioning on excitation-contraction coupling in aged rats. *J Appl Physiol.* 1990; 69 (4): 1366-71.
- Thomas DP, McCormick RJ, Zimmerman SD, Vadlamudi RK, Gosselin LE. Aging- and training-induced alterations in collagen characteristics of rat left ventricle and papillary muscle. *J Appl Physiol.* 1992; 263 (3 Pt 2): H778-83.
- Taffet GE, Michael LA, Tate CA. Exercise training improves lusitropy by isoproterenol in papillary muscles from aged rats. *J Appl Physiol.* 1996; 81 (4): 1488-94.
- Berdajs D, Lajos P, Turina MI. A new classification of the mitral papillary muscle. *Med Sci Monit.* 2005; 11 (1): BR18-21.
- Li XX, Lincoln T, Mendelowitz WC, Grossman W, Wei JY. Age-related differences in effect of exercise training on cardiac muscle function in rats. *Am J Physiol.* 1986; 251: H12-H18.
- Klausner SC, Schwartz AB. The aging heart. *Clin Geriatr Med.* 1985 1(1): 119-41.
- Anversa P, Sonnenblick EH. Ischemic cardiomyopathy: pathophysiologic mechanisms. *Prog Cardiovasc Dis.* 1990; 33 (1): 49-70.
- Cafagna D, Ponte E. Morphological and functional aspects of the cardiovascular system related to aging: does "aging heart" exist? *Minerva Med.* 1997; 88 (12): 491-500.
- Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Apfel MI. Stereology of the myocardium in young and aged rats. *Arq Bras Cardiol.* 1998; 70 (2): 105-9.
- Roffe C. Ageing of the heart. *BJ Biomed Sci.* 1998; 55 (2): 136-48.
- Debessa CRC, Maifrino LBM, De Souza RR. Age related changes of the collagen network of the human heart. *Mech Ageing Dev.* 2001; 122 (10): 1049-58.
- De Souza RR. Aging of myocardial collagen. *Biogerontol.* 2002; 3: 325-35.
- Lakatta EG. Age-associated cardiovascular changes in health: impact on cardiovascular disease in older persons. *Heart Fail Rev.* 2002; 7 (1): 29-49.
- Douglas PS, O'Toole M. Aging and physical activity determine cardiac structure and function in the older athlete. *J Appl Physiol.* 1992; 72 (5): 1969-73.
- Gates PE, Tanaka H, Graves J, Seals DR. Left ventricular structure and diastolic function with human ageing: relation to habitual exercise and arterial stiffness. *Eur Heart J.* 2003; 24 (24): 2213-20.
- Maifrino LBM., Liberti EA, Castelucci P, De Souza RR. NADPH- diaphorase positive cardiac neurons in the atria of mice: a morphoquantitative study. *BMC Neurosci.* 2006; 2: 7-10.
- Rosa EF, Silva AC, Ihara SSM, Mora OA, Aboulafia J, Nouailhetas VLA. Habitual exercise program protects murine intestinal, skeletal and cardiac muscles against aging. *J Appl Physiol.* 2005; 99: 1569-75.
- Gerrity RG, Cliff WJ. The aortic tunica intima in young and aging rats. *Exp Mol Path.* 1972; 16 (3): 382-402.
- Watson ML. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Bioph and Biochem Cytol.* 1958; 4 (4): 475-8.
- Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol.* 1963; 17: 208-12.
- Lakatta EG, Yin FC. Myocardial aging: functional alterations and related cellular mechanisms. *Am J Physiol.* 1982; 242 (6): H927-41.
- Capasso JM, Malhotra A, Remily RM, Scheuer J, Sonnenblick EH. Effects of age on mechanical and electrical performance of rat myocardium. *Am J Physiol.* 1983; 245 (1): H72-81.
- Capasso JM, Malhotra A, Scheuer J, Sonnenblick EH. Myocardial biochemical, contractile, and electrical performance after imposition of hypertension in young and old rats. *Circ Res.* 1986; 58 (4): 445-60.
- Anversa P, Hiler B, Ricci R, Guideri G, Olivetti G. Myocyte cell loss and myocyte hypertrophy in the aging rat heart. *J Am Coll Cardiol.* 1996; 8 (6): 1441-8.
- Unverferth DV, Baker PB, Arn AR, Magorien RD, Fetters J, Leier CV. Aging of the human myocardium: a histologic study based upon endomyocardial biopsy. *Gerontol.* 1986; 32 (5): 241-51.
- Anversa P, Leri A, Li B, Liu Y, Di Somma S, Kajstura J. Ischemic cardiomyopathy and the cellular renin-angiotensin system. *J Heart Lung Transp.* 2000; 19 (8 Suppl): S1-11.
- Anversa P, Zhang X, Li P, Olivetti G, Cheng W, Reiss K, et al. Ventricular remodeling in global ischemia. *Cardioscience.* 1995; 6 (2): 89-100.
- Anversa P, Cheng W, Liu Y, Leri A, Redaelli G, Kajstura J. Apoptosis and myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 1998; 93 (Suppl. 3): 8-12.
- Díez J, Fortuño MA, Ravassa S. Apoptosis in hypertensive heart disease. *Curr Opin Cardiol.* 1998; 13 (5): 317-25.
- Mandarim-de-Lacerda CA, Pereira LMM. Numerical density of cardiomyocytes in chronic nitric oxide synthesis inhibition. *Pathobiol.* 2000; 68: 36-42.
- Mani K, Kitsis RN. Myocyte apoptosis: programming ventricular remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 41(5): 761-4.
- Weber KT, Brilla CG, Campbell SE, Reddy HK. Myocardial fibrosis and the concepts of cardioprotection and cardioreparation. *J Hypertens Suppl.* 1992; 10 (5): S87-94.
- Weber KT, Brilla CG, Janicki JS. Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors. *Cardiovasc Res.* 1993; 27 (3): 341-8.
- Brömme HJ, Holtz J. Apoptosis in the heart: when and why? *Mol Cell Biochem.* 1996; 163-164: 261-75.
- Rozenberg S, Tavernier B, Riou B, Swynghedauw B, Page CL, Boucher F, et al. Severe impairment of ventricular compliance accounts for advanced age-associated hemodynamic dysfunction in rats. *Exp Gerontol.* 2006; 41 (3): 289-95.
- Yin FC, Spurgeon HA, Rakusan K, Weisfeldt ML, Lakatta EG. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *Am J Physiol.* 1982; 243 (6): H941-7.