

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO

FILIPPE FERNANDES CONTI

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO COMBINADO EM MODELO
EXPERIMENTAL DE DISFUNÇÕES CARDIOMETABÓLICAS ASSOCIADAS À
PRIVAÇÃO DOS HORMÔNIOS OVARIANOS**

São Paulo

2013

FILIPPE FERNANDES CONTI

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO COMBINADO EM MODELO
EXPERIMENTAL DE DISFUNÇÕES CARDIOMETABÓLICAS ASSOCIADAS À
PRIVAÇÃO DOS HORMÔNIOS OVARIANOS**

Dissertação apresentada à Universidade Nove
de Julho para a obtenção do título de Mestre
em Ciências da Reabilitação.

Orientadora: Profa. Dra. Kátia De Angelis

São Paulo

2013

Conti, Filipe Fernandes.

Efeitos do treinamento físico combinado em modelo experimental de disfunções cardiometabólicas associadas à privação dos hormônios ovarianos. /Filipe Fernandes Conti. 2013.

119f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2013.

Orientador (a): Profa. Dra. Kátia de Angelis.

1. Menopausa. 2. Síndrome metabólica. 3. Treinamento físico combinado.

I. Angelis, Kátia de. II. Título

CDU 615.8

São Paulo, 11 de dezembro de 2013.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno(a): FILIPE FERNANDES CONTI

Título da Dissertação: Efeitos do treinamento físico combinado em modelo experimental de disfunções cardiometabólicas associadas à privação dos hormônios ovarianos"

Presidente: PROFA. DRA. KATIA DE ANGELIS



Membro: PROFA. DRA. MARIA CLAUDIA COSTA IRIGOYEN



Membro: PROF. DR. DIRCEU COSTA



Dedicatória

Dedico aos meus pais, Nivaldo Vargas Conti e Roseneide Fernandes Conti.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais por todo afeto, amor, segurança, confiança e educação que me dão. Sem eles nada seria possível.

Gostaria de agradecer à minha melhor (e única) irmã (risos). Por toda “camaradagem” de todos estes anos.

Quero agradecer a minha orientadora, Profa. Dra. Kátia De Angelis, por todas as oportunidade que vem me dando durante estes anos de laboratório, pela confiança em meu trabalho, e por fazer-me crescer academicamente, sem ela muita coisa não seria possível.

Também quero agradecer a todos meus colegas e amigos do Laboratório de Fisiologia Translacional, que me ajudaram diretamente ou indiretamente com este trabalho, pois ninguém chega a algum lugar sozinho. Em especial, gostaria de agradecer as minhas amigas Janaína de Oliveira Brito, Nathalia Bernardes e Danielle da Silva Dias, que sempre estavam dispostas a me ajudar, independente do que fosse.

Quero agradecer aos meus poucos e melhores amigos, Carlos Eduardo Soares, por todo companheirismo, risadas, desabafos e confiança, Caio Martins Ferreira, por todos estes anos de amizade, conversas e caminhadas e Michelle Stoyell, pelas longas noites de conversa em portunhol, por escutar meus anseios, por seus conselhos e por fazer-me o namorado mais feliz do mundo. Sem vocês o mundo não seria tão alegre.

Gostaria de agradecer a Universidade Nove de Julho pela bolsa de estudos e a FAPESP (Processo: 2011/15828-9) pelo apoio financeiro.

Por fim, gostaria de agradecer a esta força maior que rege o universo.

RESUMO

Após o advento da menopausa observa-se aumento da incidência de hipertensão, resistência à insulina, diabetes tipo 2 e de morbi-mortalidade. Por outro lado, o treinamento físico aeróbio tem sido recomendado como uma importante terapia para a prevenção e o tratamento de disfunções cardiometabólicas, em função dos reconhecidos benefícios dessa abordagem em diferentes populações. Mais recentemente, o treinamento físico resistido vem sendo recomendado em complemento ao aeróbio (treinamento combinado) nas diretrizes de tratamento de doenças cardiovasculares e metabólicas, no entanto, pouco se sabe sobre os benefícios fisiológicos dessa abordagem. Além disto, os mecanismos envolvidos nos eventuais benefícios do treinamento físico dinâmico combinado foram muito pouco estudados após a privação dos hormônios ovarianos, principalmente em presença de disfunções cardiometabólicas. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do treinamento físico dinâmico combinado em ratas ooforectomizadas hipertensas submetidas à sobrecarga de frutose. Foram utilizadas ratas Wistar controles (CS) e ratas espontaneamente hipertensas (SHR): submetidas (HOS) ou não (HS) à privação dos hormônios ovarianos e ooforectomizadas submetidas à sobrecarga crônica de frutose sedentárias (HOFS) ou ao treinamento físico combinado (HOFTc). Inicialmente foi padronizado um teste de carga máxima e um protocolo de treinamento resistido em escada para ratos. O treinamento físico combinado foi realizado em esteira e escada adaptadas para ratos em dias alternados. Parâmetros de função cardiovascular, de regulação autonômica cardiovascular, metabólicos e de capacidade física e sua relação com alterações em parâmetros de estresse oxidativo e de inflamação foram avaliados no tecido cardíaco. Foi observado que a associação (hipertensão+ooforectomia) induziu aumento da pressão arterial (PA) (HOS: 164 ± 5 vs. HS: 146 ± 6 mmHg) e peso corporal em relação as ratas hipertensas. Já a associação de fatores de risco (hipertensão+ooforectomia+frutose) induziu aumento adicional PA (HOFS: 174 ± 4 mmHg), aumento da frequência cardíaca (HOFS: 403 ± 12 vs. HOS: 348 ± 16 bpm) e dos níveis de triglicérides sanguíneos (HOFS: 160 ± 8 vs. HOS: $125 \pm 6,4$ mg/dl), prejuízo na sensibilidade à insulina e na modulação autonômica cardiovascular, além de prejuízos no perfil de estresse oxidativo (razão redox da glutathiona: HOFS: $8,94 \pm 0,8$ vs. HOS: $13,00 \pm 1,4$) e inflamatório (TNF- α : HOFS: $65,8 \pm 9,9$ vs. HOS: $31,7 \pm 8,6$ pg/mg de proteína) desses animais. Por outro lado, o treinamento físico combinado foi capaz de reduzir a PA (HOFTc: 158 ± 4 mmHg), promover bradicardia de repouso (HOFTc: 303 ± 5 bpm), normalizar os níveis de triglicérides (HOFTc: $137 \pm 4,7$ mg/dL), a sensibilidade à insulina, modulação autonômica vascular, reduzir o dano a membrana celular, aumentar a defesa antioxidante e o balanço redox da glutathiona (HOFTc: $11,94 \pm 1,1$), além de reduzir o TNF- α (HOFTc: $33,1 \pm 4,9$ mg/dL) e aumentar IL-10. Dessa forma, os resultados do presente estudo demonstram que a associação de fatores de risco promoveu prejuízos adicionais em parâmetros metabólicos, cardiovasculares, autonômicos, de estresse oxidativo e inflamatórios, de metabolização e que o treinamento físico combinado foi eficaz em atenuar e/ou normalizar tais disfunções.

Palavras-chave: Menopausa, síndrome metabólica, treinamento físico combinado, modulação autonômica, biomarcadores.

Abstract

After the menopause there is an increased in the incidence of hypertension, insulin resistance, type 2 diabetes and morbidity. In other hand, aerobic exercise training has been recommended as an important therapy for the prevention and treatment of cardiometabolic disorders. Recently, resistance exercise training has been recommended as a complement to aerobic (combined training) for the treatment of cardiovascular and metabolic diseases. However, the physiological effects of this approach is not well understood. Moreover, the mechanisms involved in the possible benefits of combined exercise training have been few studied after ovarian hormone deprivation, especially in the presence of cardiometabolic disorders. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of exercise training combined in hypertensive ovariectomized rats submitted to fructose overload. Wistar rats and spontaneously hypertensive rats (SHR) were divided in: control (C), hypertensive (HS), hypertensive ovariectomized (HOS) and hypertensive ovariectomized submitted to fructose overload sedentary (HOFS) and trained (HOFT). Initially, the maximum load test and resistance training protocol in ladder adapted to rats were standardized. The combined exercise training was performed on a treadmill and ladder adapted to rats in alternated days. Cardiovascular function, autonomic cardiovascular modulation, metabolic and physical capacity were evaluated, as well as the relationship of these variables with cardiac oxidative stress and inflammation. The association of hypertension and ovariectomy induced increase in arterial pressure (AP) (HOS: 164 ± 5 vs. HS: 146 ± 6 mmHg) and body weight in relation to hypertensive rats. The association of risk factors (hypertension + ovariectomy + fructose) induced an additional increase in the AP (HOFS: 174 ± 4 mmHg), increased heart rate (HOFS: 403 ± 12 vs. HOS: 348 ± 16 bpm) and blood triglycerides (HOFS: 160 ± 8 vs. HOS: 125 ± 6.4 mg/dl), induced an impairment in the insulin sensitivity and cardiovascular autonomic modulation, oxidative stress (redox ratio of glutathione: HOFS: 8.94 ± 0.8 vs. HOS: 13.00 ± 1.4) and inflammation (TNF- α : HOFS: 65.8 ± 9.9 vs. HOS: 31.7 ± 8.6 pg/mg protein) of these animals. Moreover, the combined exercise training was able to reduce the AP (HOFTc: 158 ± 4 mmHg) and heart rate (HOFTc: 303 ± 5 bp), to normalize the triglyceride levels (HOFTc: 137 ± 4.7 mg/dL), insulin sensitivity, vascular autonomic modulation. Moreover training reduced cardiac lipoperoxidation and increased antioxidant defense and redox balance of glutathione (HOFTc: 11.94 ± 1.1) and reduced the TNF- α (HOFTc: 33.1 ± 4.9 mg/dL) and increased the IL-10. The results of this study demonstrate that the association of risk factors promoted additional impairment in metabolic, cardiovascular, autonomic, inflammatory and oxidative stress parameters; and the combined exercise training was effective in reduce and/or normalize these dysfunctions.

Keywords: Menopause, metabolic syndrome, combined exercise training, autonomic modulation, biomarkers.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E QUADROS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1. CONTEXTUALIZAÇÃO.....	155
1.1. Climatério, doença cardiovascular e disfunção metabólica.....	155
1.2. Mecanismos envolvidos nas disfunções cardiometabólicas do climatério.....	19
1.3. Treinamento físico e manejo de risco após a menopausa.....	22
2. OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo Geral.....	28
2.2 Objetivos Específicos.....	28
3.1. Amostra.....	30
3.2. Sequência Experimental.....	31
3.3. Procedimentos.....	31
Sobrecarga de Frutose.....	31
Ooforectomia Bilateral.....	32
Teste de Esforço Máximo em Esteira.....	32
Determinação da Carga Máxima em Escada.....	32
Treinamento Físico Dinâmico Combinado.....	33
Identificação da Fase do Ciclo Estral.....	35
Canulação.....	35
Registro de Pressão Arterial.....	35
Avaliação da Sensibilidade dos Pressorreceptores.....	36
Avaliação da Modulação Autonômica Cardiovascular.....	36
Medida da Glicemia e dos Triglicerídeos Sanguíneos.....	37
Teste de Resistência à Insulina.....	37
Sacrifício dos Animais.....	38
Preparação dos Tecidos.....	38
Dosagem de Proteínas.....	38
Medida de Lipoperoxidação.....	38
Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico.....	39
Dosagem de Proteínas Carboniladas.....	39
Catalase.....	400

Superóxido Dismutase	400
Glutathione Peroxidase	411
Balço Redox: Razão GSH/GSSG.....	411
Nitritos e Nitratos.....	422
Marcadores Inflamatórios	422
3.4 Análise Estatística	433
4. RESULTADOS.....	444
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	844
6. REFERÊNCIAS.....	89
7. ANEXOS	1166

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Table 1. Metabolic evaluations: hypertensive (H), hypertensive OVX (HO) and hypertensive OVX undergoing fructose overload (FHO).....	62
Table 2. Hemodynamic and autonomic evaluation in studied groups: hypertensive (H), hypertensive OVX (HO) and hypertensive OVX undergoing fructose overload (FHO).....	63
Table 3. Inflammatory markers in studied groups: hypertensive (H), hypertensive OVX (HO) and hypertensive OVX undergoing fructose overload (FHO).....	64
Table 4. Oxidative stress evaluations in studied groups: hypertensive (H), hypertensive OVX (HO) and hypertensive OVX undergoing fructose overload (FHO).....	65
Tabela 1. Capacidade física e avaliações metabólicas nos grupos estudados: C: grupo controle; FHO: grupo ooforectomizado hipertenso submetido ao consumo de frutose; FHOT: grupo ooforectomizado hipertenso submetido ao consumo de frutose e ao treinamento físico combinado.....	79
Tabela 2. Estresse oxidativo nos grupos estudados: C: grupo controle; FHO: grupo ooforectomizado hipertenso submetido ao consumo de frutose; FHOT: grupo ooforectomizado hipertenso submetido ao consumo de frutose e ao treinamento físico combinado.....	80
Quadro 1. Resumo da prescrição do treinamento físico aeróbio dinâmico em esteira (à esquerda) e da prescrição do treinamento físico resistido dinâmico na escada (à direita).....	33

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Negative Pearson correlation ($r = -0.6$, $P = 0.05$) obtained between adipose tissue and cardiac levels of IL-10 for studied groups: hypertensive (H), hypertensive OVX (HO) and hypertensive OVX undergoing fructose overload (FHO)..... 66

Figura 1. A) Pressão Arterial Média; B) Frequência Cardíaca; C) Banda de Baixa Frequência da Pressão Arterial Sistólica; D) Variância da Pressão Arterial Sistólica nos grupos estudados. C: grupo controle; FHO: grupo ooforectomizado hipertenso submetido ao consumo de frutose; FHOT: grupo ooforectomizado hipertenso submetido ao consumo de frutose e ao treinamento físico combinado..... 82

Figura 2. A) Glutationa Reduzida/Glutationa Oxidada (GSH/GSSG); B) Interleucina-10 (IL-10); C) Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α); D) Razão NOx nos grupos estudados. C: grupo controle; FHO: grupo ooforectomizado hipertenso submetido ao consumo de frutose; FHOT: grupo ooforectomizado hipertenso submetido ao consumo de frutose e ao treinamento físico combinado..... 83

LISTA DE ABREVIATURAS

AF-IP: Banda de Alta frequencia do Intervalo de Pulso

BF-IP: Banda de Baixa Frequencia do Intervalo de Pulso

BF-PAS: Banda Baixa Frequencia da Pressão Arterial Sistólica

C: Normotenso

CAT: Catalase

DCV: Doença Cardiovascular

DM: Diabetes Mellitus

DNPH: Dinitrofenil Hidrazina

FC: Frequência Cardíaca

GPx: Glutathione Peroxidase

GSH/GSSG: Balanço Redox

GSH: Glutathione reduzida

GSSG: Glutathione oxidada

H: Hipertenso

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio

HF: Alta frequência

HFO: Hipertenso Ooforectomizado Tratado com Frutose

HOFTc: Hipertenso Ooforectomizado Tratado com Frutose e Submetido ao Treinamento Físico Combinado

HO: Hipertenso Ooforectomizado

HS: Hipertenso Sedentário

IL-18: Interleucina 18

IL-6: Interleucina6

IP: Intervalo de Pulso

KCL: Cloreto de Potássio

LF: Baixa frequência

LM: Limiar Lactato

MFEL: Máxima Fase Estável de Lactato

NO: Óxido Nítrico

PA: Pressão Arterial

PAD: Pressão Arterial Diastólica

PAM: Pressão Arterial Média

PAS: Pressão Arterial Sistólica

PCR: proteína C reativa

PMSF: Fluoreto de Fenil Metil Sulfonila

QL: Quimiluminescência

RMSSD: Raiz Quadrada da Média da Soma dos Quadrados das Diferenças entre Intervalos Adjacentes (Atividade Parassimpática)

SHR: Ratos Espontaneamente Hipertensos

SM: Síndrome Metabólica

SOD: Superóxido Dismutase

TBA: ácido Tiobarbitúrico

TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

t-BOOH: Hidroperóxido de Tert-Butil

TCA: Ácido Tricloroacético

TNF α : Fator de Necrose Tumoral

VAR-IP: Variabilidade do Intervalo de Pulso

VFC: Variabilidade da Frequência Cardíaca

VO₂ máx: Consumo Máximo de Oxigênio

VPA: Variabilidade da Pressão Arterial

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1. Climatério, doença cardiovascular e disfunção metabólica

As doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade no sexo feminino em vários países, incluindo o Brasil (Castanho et al., 2001; NAHAS, 2001; Bouchard, 2003), e a sua incidência aumenta significativamente em mulheres após a menopausa (Sowers& La Pietra, 1995; Rossi et al., 2002; Mosca et al., 2007). Ainda que não estejam bem estabelecidos os mecanismos pelos quais a mulher apresenta aumento na prevalência de doenças cardíacas durante o climatério, tem sido sugerido que o estrogênio promova essa cardioproteção nas mulheres antes da menopausa, reduzindo a incidência de doenças cardiovasculares em relação ao sexo masculino (Miller, 1999).

Além disto, o risco aumentado de eventos cardiovasculares após o advento da menopausa tem sido associado a alterações metabólicas e cardiovasculares que podem também estar relacionadas à disfunção autonômica (Sinagra& Conti, 2007). Neste sentido, a avaliação da sensibilidade dos pressorreceptores (barorreflexo) e a análise das variabilidades da frequência cardíaca (VFC) e da pressão arterial são excelentes medidas de função autonômica (De Angelis et al., 2004; Goldstein et al., 2002). Os pressorreceptores arteriais são mecanorreceptores sensíveis às deformações da parede vascular responsáveis pelo controle da pressão arterial (PA) em curto prazo, ou seja, momento a momento (Irigoyen et al., 2003). Além do controle reflexo da atividade autonômica, os pressorreceptores também exercem controle tônico sobre a atividade simpática (inibição) e parassimpática (estimulação). Assim, o comprometimento da função dos pressorreceptores pode atuar como elemento permissivo ao estabelecimento de alterações

primárias de outros mecanismos de controle da função cardiovascular, por não modular a atividade simpática e parassimpática adequadamente (Irigoyen et al., 1995).

O estudo da VFC reflete a interação de diversos fatores que, em sua maioria, envolvem uma influência do sistema nervoso autônomo sobre o sistema cardiovascular (Joaquim et al., 2005). Hoje se sabe que irregularidades nas variabilidades da frequência cardíaca (FC) e da pressão arterial (PA) significam algum tipo de anormalidade, e que a diminuição da variabilidade da FC é um mau prognóstico (Ribeiro & Moraes, 2005). De fato, estudos experimentais e clínicos vêm demonstrando que a disautonomia (disfunções no sistema nervoso autônomo) está presente em uma série de patologias, tais como a hipertensão arterial, a insuficiência cardíaca, o diabetes e outras alterações metabólicas (Goldstein et al., 2002; De Angelis et al., 2004). Dessa forma, intervenções no sentido de detectar, prevenir e/ou atenuar a disfunção autonômica cardiovascular tem sido vistas como importantes estratégias no manejo das doenças cardiovasculares (La Rovere et al., 1998, Task Force, 1996).

De fato, a menopausa e o envelhecimento alteram o controle autonômico cardiovascular, observando-se que o balanço simpato-vagal cardíaco, que era menor em mulheres que em homens adultos, se torna semelhante entre os sexos na faixa etária de 50-60 anos, a qual coincide com o período de menopausa (Kuo et al., 1999). Um estudo demonstrou que 24% das mulheres com mais de 40 anos de idade apresentam uma marcante diminuição na sensibilidade barorreflexa em relação a mulheres jovens (Laitinen et al., 1998). Vale lembrar que a sensibilidade barorreflexa e a variabilidade da frequência cardíaca quando reduzidos tem sido associados a maior morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares tanto em populações saudáveis (Dekker et al., 1997; Tsuji et al., 1994) quanto em pacientes após um evento coronariano agudo (La Rovere et al., 1998).

Em paralelo aos dados clínicos publicados, nosso grupo evidenciou, em um modelo experimental de menopausa, que ratas fêmeas submetidas à privação dos hormônios ovarianos (ooforectomia) apresentavam aumento da PA, redução da sensibilidade barorreflexa e do tônus vagal e aumento do tônus simpático cardíaco (Flues et al., 2010). No entanto, observamos que a privação dos hormônios ovarianos em ratas Wistar aumenta a PA média para valores em torno de 120 mmHg (Irigoyen et al., 2005; Sousa et al., 2007; Flues et al., 2010), não caracterizando um quadro de hipertensão estabelecida como observa-se em muitas mulheres menopausadas. De fato, a PA é mais elevada em homens até a faixa etária de 50-60 anos do que em mulheres (Stamler et al., 1976; August & Oparil, 1999). Após esta fase, a PA (particularmente a sistólica) aumenta nas mulheres e a hipertensão torna-se mais prevalente (Stamler et al., 1976) ou pelo menos igualmente prevalente em homens e mulheres. Neste estudo adicionamos ao modelo de privação dos hormônios ovarianos um fator de risco cardiovascular muito comum em mulheres no climatério, a hipertensão estabelecida (Mosca et al., 2007), através do uso de ratas espontaneamente hipertensas (SHR). Nos ratos SHR, assim como na hipertensão essencial humana, o aumento da pressão arterial se dá de forma progressiva (Pravenec et al., 2004; Gouveia et al., 2000).

Além disto, seria interessante que o modelo experimental utilizado para estudar alterações no sexo feminino após a menopausa, fosse associado, além de hipertensão a disfunções metabólicas, uma vez que estudos demonstram que as alterações crônicas, como a hipertensão, o diabetes, a resistência à insulina, a hiperinsulinemia, as doenças coronarianas e as alterações no perfil lipídico são comuns em mulheres após a menopausa, caracterizando um quadro de síndrome metabólica (Sowers & La Pietra et al., 1995; Lopes et al., 2005; I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica, 2005).

Interessantemente, alguns estudos têm demonstrado que acompanhando a prevalência de obesidade e de sobrepeso tem ocorrido um aumento do consumo de frutose, utilizada principalmente em alimentos industrializados, pela população em geral (Basciano et al., 2005; Bray et al., 2004; Bray, 2008). O consumo de frutose leva à dislipidemia e à resistência à insulina em humanos (Havel et al., 2005, Elliot et al., 2002; Bray et al., 2004; Basciano et al., 2005), além aumentar o peso corporal, os níveis de triglicerídeos e PA em ratos (Elliot et al., 2002; Brito et al., 2008). Estudos experimentais em animais machos submetidos à sobrecarga de frutose na ração ou na água de beber verificaram aumento dos triglicerídeos e da insulina plasmática, elevação discreta da PA e resistência à insulina, alterações essas compatíveis com um quadro inicial de desenvolvimento de síndrome metabólica (Suzuki et al., 1997; Farah et al., 2006; Cunha et al., 2006; Teff et al., 2004; Elliot et al., 2002). Um estudo realizado por nosso grupo em camundongos machos submetidos à sobrecarga de frutose demonstrou intolerância à glicose, além de correlação entre disfunções renais e as alterações cardiovasculares e autonômicas (Cunha et al., 2007). Em fêmeas submetidas ao consumo crônico de frutose com ou sem privação dos hormônios ovarianos, verificamos resistência à insulina, aumento da PA e redução do tônus vagal (Brito et al., 2008; Sanches et al., 2012).

Vale lembrar ainda que no climatério observa-se redução da massa óssea, da força muscular e da capacidade de exercício físico, além de aumento do peso corporal associado, muitas vezes, a maior prevalência de diabetes e dislipidemia e síndrome metabólica nessa população (Sowers & La Pietra et al., 1995; Lopes et al., 2005). Segundo Vittinghoff e colaboradores (2003), 11 fatores de risco têm importância para evento cardiovascular em mulheres pós-menopausa, entre eles: a redução dos níveis de atividade física, a resistência à insulina e o diabetes, os níveis de PA, o perfil lipídico e a obesidade. Assim, tem-se somado

evidências de alterações cardiometabólicas em mulheres menopausadas, confirmando que a idade e o gênero têm uma significativa importância na incidência de risco cardiovascular. Apesar destas evidências, ainda não está claro na literatura o papel da disautonomia cardiovascular na associação de fatores de risco em mulheres após a menopausa.

1.2. Mecanismos envolvidos nas disfunções cardiometabólicas do climatério

Um número crescente de evidências sugere que a produção aumentada de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido e o radical hidroxila, participam criticamente da patogênese das doenças coronarianas, hipertensão, aterosclerose e síndrome metabólica (Dantas et al., 2000; Belló-Klein et al., 2001). De fato, pacientes com hipertensão, hipercolesterolemia, diabetes, fumantes, e até mesmo no processo fisiológico do envelhecimento, demonstraram relação entre disfunções no endotélio vascular e aumento do **estresse oxidativo** (Berry et al., 2001; Cai & Harrison, 2000; Orien et al., 1999). Neste sentido, vale lembrar que quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e das defesas antioxidantes, ao ponto de deter a produção pró-oxidante, temos um quadro de estresse oxidativo (Nordmann, 1994). Além disto, estudos relataram que a resistência à insulina e a hiperinsulinemia aumentam a peroxidação lipídica e diminuem os antioxidantes no plasma, sugerindo que os dois estejam interligados (Mizuno et al., 2004; Xu et al., 1999). O aumento do estresse oxidativo foi ainda relacionado com a hiperinsulinemia e com reduzida concentração da catalase (CAT) em animais (Xu et al., 1999). Essas e outras evidências têm levado muitos investigadores a sugerir que o aumento excessivo de espécies reativas de oxigênio pode ser considerado um mecanismo envolvido no desenvolvimento de resistência à insulina, diabetes e doença cardiovascular.

Vale lembrar que o óxido nítrico (NO) pode ser destruído pelo radical superóxido (Rubanyi&Vanhoute, 1993; Gryglewski et al., 1986) e pode ser protegido por mecanismos antioxidantes como a enzima superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) e pelos sistemas não enzimáticos, que podem ser medidos pela determinação da capacidade antioxidante total (TRAP) (Dormandy, 1978; Sies, 1986). Sugere-se ainda que a **redução da biodisponibilidade de NO** e/ou o aumento do ânion superóxido em situações de estresse exerça função em alterações dos pressorreceptores (Chowdhary et al., 2000; De Angelis et al., 1999; Li et al., 1996; Shultz&Ustinova, 1998).

Em relação ao sexo feminino, vale destacar que a cardioproteção que a mulher apresenta em relação ao homem até o climatério, e quem tem sido relacionada aos maiores níveis de estrogênio circulantes, pode ser mediada, ao menos em parte, pelo fato desse hormônio estar associado ao aumento da síntese de NO. De fato o estrogênio tem sido relacionado com várias ações cardioprotetoras como, por exemplo, vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, antioxidativa e crescimento de células do músculo liso vascular (Moncada et al. 1991; Dubey, 1994; Dubey et al., 1995). Em nosso grupo, evidenciamos aumento do estresse oxidativo após a ooforectomia, caracterizada por aumento da lipoperoxidação de membrana e redução das enzimas CAT e SOD em tecido cardíaco (Rolim et al., 2007). No entanto, parâmetros de estresse oxidativo ainda não foram bem estudados na associação de fatores de risco em modelos experimentais, principalmente em ratas ooforectomizadas.

Além disto, é plausível que exista uma associação entre moléculas bioativas liberadas a partir de tecido adiposo e o estresse oxidativo, sendo que essa associação parece responsável, pelo menos em parte, devido ao desenvolvimento de resistência à insulina e disfunção endotelial. De fato, o sistema imunológico tem sido alvo de grande interesse nos últimos anos no

desenvolvimento e prognóstico da doença arterial coronariana (Janszky et al., 2004). Além disso, o **aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias** tais como: proteína C reativa (PCR), interleucina6 (IL-6) (Ridker et al., 2000b) e fator de necrose tumoral (TNF alfa) (Ridker et al., 2000a) estão associadas ao maior risco cardiovascular e ao aumento da morbidade e mortalidade entre a população em geral (Ridker et al., 2000c; Pradhan et al., 2002).

Correlação negativa entre adiponectina e resistência à insulina, bem como correlação positiva entre leptina plasmática e resistência à insulina já foram observadas (Tapsellet al., 2004). Além disto, níveis séricos elevados de interleucina 18 (IL-18) foram observados em pacientes com síndrome metabólica, mostrando também que essa citocina estava associada com obesidade e resistência à insulina, independente da SM (Florezet al., 2006; Yamaguchi et al., 2006 e Hung et al., 2005). De fato, estudos sugerem que a inflamação decorrente do sistema imunológico é uma característica de doenças cardiometabólicas (Koh et al., 2005; Nakagawa et al., 2004). Um estudo experimental de Glushakova e colaboradores (2008) evidenciou alteração em marcadores inflamatórios nos rins de animais submetidos a uma dieta rica em frutose. Além disso, foi observado aumento da resistência à insulina acompanhado de aumento nos níveis de PCR, interleucinas 1 e 6, bem como desregulação de adipocitocinas e leptina em ratos alimentados com uma dieta rica em frutose (Armutcu et al., 2005). Existem dados que indicam ainda que os níveis elevados de PCR tenham sido associados ao desenvolvimento da SM em mulheres (Pischonnet al., 2005; Qi et al., 2008).

Interessantemente, em indivíduos idosos ou com maior risco de insuficiência cardíaca crônica foram observados níveis elevados de PCR, TNF alfa e IL-6 (Stracket al., 1997; Aguirre et al., 2000) associados à redução da variabilidade da FC (Bossenmaier et al., 2000). No estudo de Janszky et al. (2004) os autores demonstraram uma forte correlação dos níveis de PCR e IL-6 com

a variabilidade da FC em mulheres com doença coronariana. No entanto, poucos estudos avaliaram a associação de marcadores inflamatórios e disfunções cardiometabólicas no sexo feminino, principalmente após a privação dos hormônios ovarianos.

Apesar de estudos já terem evidenciado prejuízo fisiológico decorrente da hipertensão em animais SHR, bem como em animais submetidos ao consumo de frutose, não se conhecem as alterações metabólicas, cardiovasculares e autonômicas decorrentes da associação desses dois modelos, principalmente no sexo feminino após a privação dos hormônios ovarianos. Além disto, os possíveis mecanismos envolvidos nessas alterações foram muito pouco estudados. Assim, acreditamos que alterações no estresse oxidativo, na biodisponibilidade do óxido nítrico e em marcadores inflamatórios poderiam estar envolvidas nessas disfunções. Neste sentido, neste estudo buscamos compreender a relação entre alguns marcadores inflamatórios, de estresse oxidativo e de metabolização de biodisponibilidade de óxido nítrico com as disfunções metabólicas, cardiovasculares e autonômicas em modelos experimentais de privação dos hormônios ovarianos associado a fatores de risco comuns na mulher após a menopausa. Assim, testamos a hipótese que alterações no controle autonômico cardiovascular estão relacionadas ao aumento de estresse oxidativo e de marcadores inflamatórios, além de redução de óxido nítrico em ratas hipertensas submetidas à sobrecarga de frutose.

1.3. Treinamento físico e manejo de risco após a menopausa

Os efeitos benéficos do treinamento físico têm sido demonstrados na prevenção e tratamento da hipertensão, na resistência à insulina, no diabetes, na dislipidemia, na obesidade e na síndrome metabólica (NCEP, 2001; Tuomilehto et al., 2001; Ross et al., 1999; Hagberg et al., 2000; Guimarães & Ciolac, 2004; Pedersen & Saltin, 2006). De fato, uma revisão sistemática de estudos randomizados e controlados em mulheres na menopausa mostrou os benefícios do

exercício no peso corporal, na massa óssea, na força e na resistência muscular, na flexibilidade, no consumo de oxigênio, na pressão arterial e no controle metabólico (Asikainen et al., 2004).

Estudos evidenciam que mulheres na menopausa são mais sedentárias. Neste sentido a adoção de um estilo de vida ativo tem sido preconizado em mulheres principalmente após a menopausa (Mosca et al., 2007). Foi observado, em mulheres menopausadas, melhora na modulação autonômica (Jurca et al., 2004), da sensibilidade barorreflexa e da variabilidade da frequência cardíaca pós treinamento físico aeróbio dinâmico (Davy et al., 1996). Recentemente foi realizado um estudo com homens e mulheres portadores de SM que mostrou que após um período de seis meses de treinamento físico aeróbio associado à dieta ocorreu a diminuição do índice de massa corporal, dos níveis de triglicerídeos, de colesterol, de glicose sanguínea, de pressão arterial sistólica e diastólica (Dragusha et al., 2010). Já em pacientes com predisposição à síndrome metabólica, foi observado que o treinamento físico aeróbio aumentou a adiponectina sérica (Ring-Dimitrou et al., 2006).

Experimentalmente, machos e fêmeas SHR apresentam melhora cardiovascular e autonômica após o treinamento físico (Silva et al., 1997; Coimbra et al., 2008; Sanches et al., 2012). Em nosso grupo, demonstramos que o treinamento físico aeróbio dinâmico em um modelo experimental de menopausa em ratas induziu redução do peso corporal, bradicardia de repouso, normalização dos valores de PA e melhora da sensibilidade dos pressorreceptores (Irigoyen et al., 2005). Benefícios cardiovasculares e autonômicos foram também observados por nosso grupo em ratas diabéticas ooforectomizadas (Souza et al., 2007), dislipidêmicas ooforectomizadas (Heeren et al., 2009), bem como na associação de treinamento físico e reposição hormonal (Flues et al., 2010). Além disto, evidenciamos em animais submetidos a treinamento físico redução do estresse oxidativo e aumento das enzimas antioxidantes que foram correlacionados com melhora em

parâmetros cardiovasculares e autonômicos inclusive em machos SHR e em ratas ooforectomizadas (De Angelis et al., 1997; Rabelo et al., 2001; Irigoyen et al., 2005; Bertagnoli et al., 2006).

Estudos também demonstram benefícios na ação inflamatória associada ao treinamento físico como em indivíduos saudáveis (Petersen & Fisher, 2007; Flynn et al., 2007) e em idosos (Bruunsgaard et al., 2003). Já em pacientes com predisposição à síndrome metabólica, foi observado que o treinamento físico aeróbio aumentou a adiponectina sérica (Ring-Dimitrou et al., 2006). Verificamos ainda em um estudo piloto que ratas submetidas ao consumo crônico de frutose apresentavam redução dos níveis plasmáticos de leptina e aumento dos níveis de adiponectina pós treinamento físico aeróbio de 8 semanas (Brito et al., 2010).

Como pode ser observado, somam-se evidências dos benefícios induzidos pelo exercício físico aeróbio dinâmico, apesar dos efeitos na associação de fatores de risco no sexo feminino ainda não terem sido bem estudado. Além disto, até pouco tempo atrás apenas os exercícios aeróbios eram recomendados, enquanto os exercícios resistidos eram ignorados quando a preocupação estava voltada para o sistema cardiovascular. Devido a esse fato, por muitos anos, pouquíssimos estudos foram realizados para avaliar os efeitos do exercício resistido - no qual a contração muscular é realizada contra uma força que se opõe ao movimento (Fleck & Kraemer, 1999) - para a função cardiovascular. Neste sentido, alguns benefícios também podem ser observados após o treinamento físico resistido como diminuição do peso corporal (Hauser et al., 2004), controle do perfil metabólico (Prado & Dantas, 2002), controle da pressão arterial (Mediano et al., 2005), como também, manutenção ou diminuição da pressão arterial diastólica dependendo da população estudada (Forjaz et al., 2003).

Acredita-se que em pacientes hipertensos a utilização do treinamento resistido é um importante complemento ao treinamento aeróbio devido aos seus benefícios osteomusculares (Cardoso Jr et al., 2010). Em sujeitos com diabetes do tipo II, o treinamento resistido melhorou os níveis de colesterol, triglicérides e diminuiu a pressão arterial sistólica em um período de 8 semanas (Arora et al., 2009). No entanto, em marcadores hematológicos tais como: número de plaquetas, leucócitos, neutrófilos, e monócitos, no peso corporal, em níveis de insulina e glicose plasmáticos tanto em homens quanto em mulheres saudáveis não foram observadas alterações significantes após um programa de treinamento resistido de 6 meses de duração (Bobeuf et al., 2009). Uma meta-análise concluiu que o treinamento resistido tem um importante papel no controle de fatores de risco, como obesidade, hemoglobina glicada e pressão arterial sistólica, devendo ser indicado no manejo do diabetes e da SM (Strasser et al., 2010).

Vale lembrar que após a menopausa, a mulher apresenta redução na capacidade de exercício, na força muscular e na massa óssea, bem como aumento do peso corporal e da prevalência de DM, de osteoporose e de doenças cardiovasculares (Sowers & La Pietra, 1995). Nesse contexto, o treinamento resistido em associação ao aeróbio poderia promover melhoras na força e resistência muscular e na capacidade funcional, contribuindo para a saúde geral e qualidade de vida (Fleck & Kraemer, 1999, Pollock et al., 2000; ACSM, 2003), podendo também reduzir fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares quando associado ao aeróbio (Willians et al., 2007), como a resistência à insulina e a obesidade, muito comuns em pacientes diabéticos do tipo 2 (Pollock et al., 2000). Recentemente, em mulheres na pós menopausa, submetidas ao treinamento resistido observou-se diminuição da porcentagem de gordura corporal e aumento da massa muscular e da força (Orsatti et al., 2010).

Atualmente, o Colégio Americano de Ciências do Esporte recomenda a realização de exercícios resistidos em complemento aos aeróbios dinâmicos para indivíduos com hipertensão arterial, doença vascular periférica, DM tipo 2, obesidade e outras condições comórbidas (ACSM, 2003). Neste sentido, a literatura internacional tem adotado com frequência os termos *treinamento combinado* ou *concorrente* para se referir aos programas que combinam treinamento aeróbio dinâmico com treinamento resistido num mesmo período de tempo (Maiorana et al., 2002; Paulo et al., 2005).

Hickson e colaboradores (1988) demonstraram que o treinamento físico combinado permitiu aos sujeitos suportar por mais tempo uma atividade aeróbia no cicloergômetro sem o aumento concomitante do consumo máximo de oxigênio ($VO_{2máx}$), sugerindo que um aumento na força dos membros inferiores poderia aumentar o tempo para atingir a exaustão. Esses resultados indicam que os fatores limitantes do desempenho da resistência aeróbia podem ser mais fortemente relacionados com fatores periféricos e neurais do que com fatores centrais como o $VO_{2máx}$. Todavia, uma questão que surge é como deve ser realizada a combinação dos treinamentos resistido e aeróbio. Sale e colaboradores (1990) mostraram que o treinamento combinado no mesmo dia pode causar prejuízo no desenvolvimento da força, concluindo que os treinamentos (resistido e aeróbio) devem ser realizados em dias alternados para obtenção de melhores resultados.

Ao analisar os efeitos do treinamento físico combinado em indivíduos diabéticos tipo 2, Maiorana e colaboradores (2002) observaram redução da FC submáxima de exercício, do limiar ventilatório, do percentual de gordura corporal, da relação cintura-quadril, da glicemia de jejum e da hemoglobina glicada, aumento da força muscular, da massa magra e do $VO_{2máx}$, melhora da capacidade funcional e do controle glicêmico após 8 semanas de treinamento. Carrier (2008)

compararam os efeitos do treinamento físico aeróbio, resistido ou combinado, e demonstraram que o controle glicêmico (redução da hemoglobina glicada) foi melhor nos indivíduos diabéticos Tipo 2 submetidos ao treinamento físico combinado em relação aos outros treinamentos (aeróbio ou resistido). Todavia tais estudos, além de não avaliar especificamente mulheres no climatério, não estudaram as alterações cardiovasculares e autonômicas, bem como os mecanismos envolvidos nos benefícios desta prática.

Vale destacar que não existem testes de carga máxima ou protocolos de treinamento resistido ou combinado bem definidos para ratos, principalmente em condições de limitações fisiológicas. Dessa forma, neste estudo buscamos a padronização de um teste de carga máxima e de um protocolo de treinamento resistido em ratas menopausadas, para que pudéssemos avaliar os efeitos do treinamento combinado no modelo de menopausa e síndrome metabólica. Adicionalmente, o presente trabalho teve por objetivo testar a hipótese que o treinamento físico combinado induziria benefícios metabólicos, cardiovasculares, autonômicos e na capacidade física adicionais, relacionados à redução de parâmetros de estresse oxidativo e inflamatórios em ratas ooforectomizadas hipertensas submetidas à sobrecarga de frutose.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar os efeitos do treinamento físico dinâmico combinado em parâmetros cardiovasculares, de regulação autonômica cardiovascular, metabólicos e de capacidade física, e sua relação com alterações em parâmetros de estresse oxidativo, de metabolização de óxido nítrico e de inflamação, em ratas ooforectomizadas hipertensas submetidas à sobrecarga de frutose.

2.2 Objetivos Específicos

O presente estudo teve como objetivos específicos:

1) Verificar os efeitos do consumo crônico de frutose em ratas ooforectomizadas espontaneamente hipertensas em parâmetros:

- de função cardiovascular (PA e FC);
- de regulação autonômica cardiovascular (variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial);
- metabólicos (peso corporal e do tecido adiposo, glicemia e triglicerídeos sanguíneos, tolerância à insulina);
- de estresse oxidativo (lipoperoxidação por quimiluninescência, balanço redox pela razão glutathiona oxidada/reduzida, proteínas carboniladas, catalase, glutathiona peroxidase, superóxido dismutase);
- e de inflamação (TNF alfa, IL-6 e IL-10).

(Artigo 1)

2) a) padronizar um teste de carga máxima em escada adaptada para ratos, para a prescrição do treinamento físico resistido; b) prescrever um treinamento físico resistido de intensidade moderada baseado no teste de carga máxima; e c) verificar os efeitos do treinamento físico resistido em um modelo experimental de menopausa e diabetes.

(Artigo 2)

3) Avaliar os efeitos do treinamento físico combinado em ratas ooforectomizadas hipertensas submetidas à sobrecarga de frutose em parâmetros:

- de função cardiovascular (PA e FC);
- de regulação autonômica cardiovascular (variabilidade pressão arterial e sensibilidade dos pressorreceptores);
- metabólicos (peso corporal e do tecido adiposo, glicemia e triglicerídeos sanguíneos, tolerância à insulina);
- de capacidade física (teste máximo de corrida em esteira e teste de carga máxima em escada);
- de estresse oxidativo (lipoperoxidação por quimilunescência, balanço redox pela razão glutathiona oxidada/reduzida, proteínas carboniladas, catalase, glutathiona peroxidase, superóxido dismutase);
- de metabolização de óxido nítrico (concentração de nitritos e nitratos plasmáticos);
- e de inflamação (TNF alfa, IL-6 e IL-10).

(Artigo 3)

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostra- Para responder os objetivos específicos 1 e 3 foram utilizados ratos Wistar fêmeas (200-250g) provenientes do biotério da Universidade Nove de Julho e SHR fêmeas (200-250g) proveniente do Biotério da Universidade Federal de São Paulo. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Nove de Julho (An002/2012). Os animais foram mantidos agrupados, em ambiente com temperatura controlada (22° - 24° C) e com luz controlada em ciclo de 12 horas (claro:escuro). Água e comida foram oferecidas de modo irrestrito.

As ratas foram divididas nos seguintes grupos:

Normotenso (C): animais Wistar que foram acompanhados durante 18 semanas (n=8).

Hipertenso (H): animais (SHR) foram acompanhados durante 18 semanas (n=8).

Hipertenso ooforectomizado (HO): animais (SHR) foram submetidos à retirada bilateral dos ovários na 9ª semana de protocolo e acompanhados por mais 9 semanas (n=8).

Hipertenso ooforectomizado tratado com frutose (HFO): animais (SHR) foram submetidos à sobrecarga de frutose (10%) durante 18 semanas e à retirada bilateral dos ovários na 9ª semana (n=8).

Hipertenso ooforectomizado tratado com frutose e submetido ao treinamento físico combinado (HOFTc): animais (SHR) submetidos à sobrecarga de frutose (10%) durante 18 semanas e à retirada bilateral dos ovários na 9ª semana, sendo submetidos ao treinamento físico combinado em esteira ergométrica rolante (Imbramed TK-01) e escada em dias alternados a partir da 10ª semana de protocolo (n=8).

3.2. Sequência Experimental

Os grupos experimentais seguiram a sequência experimental descrita no quadro abaixo.

	1º dia	6º –8º dias	34-36º dias	61-63º dias	64º – 65º dias	A partir do 66º dia
Sobrecarga de frutose*	X	X	X	X	X	
Ooforectomia	X					
Teste de esforço máximo em esteira		X	X	X		
Teste de carga máxima em escada		X	X	X		
Treinamento físico combinado		X	X	X		
Registro da PA e FC					X	
Avaliação da Sensibilidade dos pressoreceptores					X	
Análise dos dados hemodinâmicos						X
Avaliações metabólicas	X	X	X	X		
Avaliações bioquímicas						X

*desde o desmame conforme explicação que constam o item “Sobrecarga de frutose”

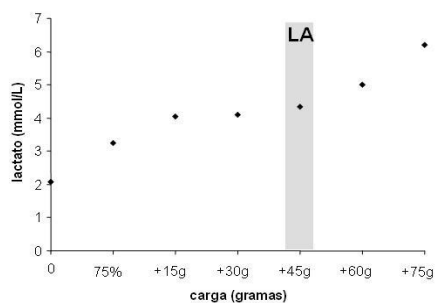
3.3. Procedimentos

Sobrecarga de Frutose-A frutose foi ministrada na água de beber (D-frutose, 100g/L) (Suzuki et al., 1997, Brito et al., 2008), com controle de consumo semanal. O tratamento foi

iniciado após o desmame e seguiu até o final do protocolo, uma vez que estudos prévios de nosso grupo evidenciaram que é necessário em torno de 9 semanas para indução de alterações cardiometabólicas decorrentes da sobrecarga de frutose em fêmeas.

Ooforectomia Bilateral- Após indução da disfunção cardiometabólica (pela sobrecarga de frutose), as ratas dos grupos ooforectomizados foram anestesiadas com cloridrato de cetamina (50mg/Kg, Ketalar) e cloridrato de xilazina (12mg/Kg, Rompum) e colocadas em decúbito dorsal para que se realizasse uma pequena incisão (1cm) em paralelo com a linha do corpo na pele e na musculatura no terço inferior na região abdominal. Os ovários foram localizados e foi realizada a ligadura dos ovidutos, incluindo os vasos sanguíneos. Os ovidutos foram seccionados e os ovários removidos. A musculatura e a pele foram suturadas e uma dose de antibiótico foi administrada (Benzetacil, 40 000 U/Kg, i.m) (Latouret al., 2001, Irigoyen et al., 2005; Flues et al., 2010).

Teste de Esforço Máximo em Esteira- O teste de esforço constitui em um protocolo escalonado com incrementos de velocidade de 0,3 km/h a cada 3 minutos, até que fosse atingida a velocidade máxima suportada pelos animais. O critério utilizado para a determinação da exaustão do animal e interrupção do teste foi o momento em que o rato não foi mais capaz de correr mediante o incremento de velocidade da esteira (Brooks & White, 1978). Vale ressaltar, que em um estudo do nosso grupo, demonstramos relação entre velocidade atingida no teste de esforço e a medida direta do consumo de oxigênio em ratos (Rodrigues et al., 2007).



Determinação da Carga Máxima em Escada- O teste de carga máxima foi realizado em uma escada adaptada para ratos com aproximadamente 54 degraus verticais de 0,5cm.

Durante o período de adaptação, os animais foram colocados nos degraus inferiores e adaptados ao ato de escalar. Nenhuma recompensa ou alimento foi oferecido, tampouco foram utilizados incentivos como estimulação elétrica para que os animais executassem o exercício. O único incentivo para a subida, se necessário, foi um toque da mão na base da cauda do animal. No topo da escada, os animais encontraram uma gaiola (20 x 20 x 20 cm) onde descansaram por 120 segundos. Este procedimento foi repetido até que os animais subissem a escada voluntariamente 3 vezes consecutivas. Considerando a ergômetro-dependência das concentrações de lactato sanguíneo na MFEL, sendo em corrida na esteira 4,0 mmol/L (Manchado et al., 2005) e na natação 5,5 mmol/L (Gobatto et al., 2001), a determinação da concentração de lactato foi determinada durante o teste resistido em escada. Em nosso laboratório, a figura da página 31 ilustra a média da concentração de lactato em ratas ooforectomizadas submetidas ao teste de carga máxima na escada (LA: limiar lactato). Para determinação da carga máxima, os animais realizaram no máximo 8 escaladas com cargas progressivas. Na escalada inicial foi aplicado 75% do peso corporal do animal. Após completar o carregamento dessa carga com sucesso, um peso adicional de 50 gramas foi adicionado ao aparato. Esse procedimento foi sucessivamente repetido até que a carga alcançasse um peso que não permitia que o rato escalasse (adaptado de Sanches et al., 2013).

Treinamento Físico Dinâmico Combinado- O treinamento físico combinado teve duração de 8 semanas e consistiu na realização de sessões alternadas de exercício aeróbio (esteira rolante) e resistido (escada). A opção por realizar as sessões em dias alternados justifica-se pela tentativa de equalização do volume, e devido a estudos (Sale et al., 1990) alertarem que o treinamento combinado realizado no mesmo dia pode causar prejuízo no desenvolvimento da força muscular. O treinamento físico aeróbio foi de intensidade moderada (40-60% da

velocidade máxima alcançada no teste de esforço) e realizado em esteira ergométrica com velocidade e carga progressiva durante 8 semanas conforme descrito resumidamente no Quadro 1 (Irigoyen et al., 2005, Flues et al., 2010). O treinamento resistido em escada e o número de escaladas (repetições) foi aumentado progressivamente ao longo das 8 semanas, de acordo com o aumento do peso fixado à cauda do animal com fita adesiva. O mesmo consiste em 2 sessões de 6 escaladas a 40% da carga máxima na 1ª semana; sendo aumentado para 8 escaladas a 40% da carga máxima na 2ª semana. Na 3ª semana, o treinamento consiste em 2 sessões de 6 escaladas a 50% da carga máxima, sendo aumentado para 8 escaladas na 4ª semana. Ao final da 4ª semana se realiza um novo teste de esforço, o qual permite os reajustes das cargas para as semanas subsequentes (5ª a 8ª), sendo a intensidade destas semanas entre 50-60% da carga máxima (adaptado de Sanches et al., 2013) (Quadro 1). Considerando que os efeitos do treinamento resistido não estão tão esclarecidos como os do aeróbio, a intensidade do treinamento poderá ser reduzida e o número de repetições aumentado conforme o protocolo proposto por Willians e colaboradores (2007) para pessoas com fatores de risco cardiovascular.

Quadro 1. Resumo da prescrição do treinamento físico aeróbio dinâmico em esteira (à esquerda) e da prescrição do treinamento físico resistido dinâmico na escada (à direita).

Semana	Duração	Intensidade	Semana	Escaladas	Intensidade
1	30 min	50%	1	15	40%
2	45 min	50%	2	15	40%
3	60 min	50-60%	3	15	50%
4	60 min	60%	4	15	50%
5	60 min	50-60%	5	20	50%
6	60 min	50-60%	6	20	50%
7	60 min	60%	7	20	60%
8	60 min	60%	8	20	60%

Identificação da Fase do Ciclo Estral - A caracterização de cada fase do ciclo foi baseada na proporção de três tipos de células na secreção vaginal: epiteliais, corneificadas e leucócitos segundo Marcondes e colaboradores (2002). A secreção vaginal foi coletada com uma pipeta plástica com 10µL de solução salina introduzida superficialmente na vagina da rata e foi colocada em uma lâmina de vidro para a observação em um microscópio ótico. Tal procedimento foi realizado nos grupos não ooforectomizados no dia das avaliações hemodinâmicas e do sacrifício dos animais, a fim de garantir que tais procedimentos fossem realizados nas fases não ovulatórias do ciclo estral das ratas.

Canulação- Após 18 semanas de protocolo, as ratas foram anestesiadas (i.p.) com cloridrato de cetamina (50mg/Kg, Ketalar, Parke-Davis) e cloridrato de xilazina (12mg/Kg, Rompum, Bayer) e colocadas em decúbito dorsal para que realizasse uma pequena incisão na região do pescoço para implantação de uma cânula na artéria carótida em direção ao ventrículo esquerdo, para registro direto da PA e na veia jugular para administração das drogas. Após a correta e firme implantação das cânulas na artéria carótida e veia jugular, as extremidades mais calibrosas das cânulas foram passadas subcutaneamente, exteriorizadas no dorso da região cervical e fixadas com fio de algodão na pele. As cânulas foram confeccionadas com tubos de Policloreto de Vinila (Abbott) equivalente ao polietileno PE10 e PE50. Estes foram soldados por aquecimento e logo após, as cânulas foram preenchidas com solução fisiológica e mantidas ocluídas com pinos de aço inoxidável (De Angelis et al.,1999; De Angelis et al., 2000).

Registro de Pressão Arterial- No dia seguinte à canulação, com o animal acordado, a cânula arterial foi conectada a uma extensão de 20 cm (PE-50), permitindo livre movimentação do animal pela caixa, durante todo o período do experimento. Esta extensão foi conectada a um transdutor eletromagnético (BloodPressure XDRCR, Kent[®]Scientific, Litchfield, CT, EUA) que,

por sua vez, esteve conectado a um pré-amplificador (Stemtech BPMT-2, QuintronInstrument[©] Inc, Milwaukee, EUA). Sinais de PA foram gravados durante um período de 30 minutos em um microcomputador equipado com um sistema de aquisição de dados (CODAS, 1Kz, DataqInstruments, Akron, OH, EUA), permitindo análise dos pulsos de pressão, batimento-a-batimento, com uma frequência de amostragem de 2000 Hz por canal, para estudo dos valores de PA sistólica (PAS), PA diastólica (PAD), PA média (PAM) e FC. Os valores de FC foram derivados do sinal pulsátil da PA (De Angelis et al., 1997; De Angelis et al., 1999; De Angelis et al., 2000; Irigoyen et al., 2005; Souza et al., 2007).

Avaliação da Sensibilidade dos Pressorreceptores- Após o registro da PA e da FC, uma extensão de aproximadamente 20 cm (PE10) foi conectada na cânula venosa para posterior injeção de drogas vasoativas. Após os animais terem permanecido em condições de repouso por 15 minutos, a sensibilidade dos pressorreceptores foi testada através da infusão de fenilefrina e de nitroprussiato de sódio. Fenilefrina e nitroprussiato foram infundidos randomicamente entre os animais, iniciando-se a sessão com um ou outro fármaco.

Para análise da sensibilidade dos pressorreceptores, o pico máximo ou mínimo da PAM foi comparado aos valores de PAM do período controle. Da mesma forma, a variação máxima da FC foi comparada com os valores de FC do período controle, imediatamente antes da injeção das drogas, para posterior quantificação das respostas. A sensibilidade barorreflexa foi avaliada pelo índice calculado por meio da divisão da variação da FC pela variação da PAM (De Angelis et al., 1997; De Angelis et al., 1999; Irigoyen et al., 2005).

Avaliação da Modulação Autonômica Cardiovascular- A variabilidade da FC e da PAS foi avaliada no domínio do tempo (variância) e no domínio da frequência usando a transformada rápida de *Fourier*. Neste método, séries temporais do intervalo de pulso e da PAS foram divididas

em segmentos de 350 batimentos com sobreposição de 50%. Um espectro foi obtido para cada um dos segmentos via o recurso de Levinson-Durbin, com a ordem modelo escolhido de acordo com critério do Akaike, variando entre 10 e 14. Os componentes oscilatórios dos espectros foram quantificados em 2 faixas de frequência: baixa frequência (LF) e alta frequência (HF). A potência do espectro foi calculada para cada componente reconhecível nas faixas de LF e HF integrando-se os espectros dos componentes. A potência foi expressa como a intensidade de LF e HF. Os segmentos que apresentaram oscilações muito lentas ($<0,1$ Hz), que contribuíam para mais de 70% da variabilidade total, foram considerados não estacionários e foram descartados do estudo. A sensibilidade barorreflexa espontânea foi obtida pelo índice α , método que analisa a correlação temporal e linear entre o intervalo RR e a variabilidade da PAS (Soares et al., 2004; Quagliotto et al., 2008; Mostarda et al., 2009; Heeren et al., 2010).

Medida da Glicemia e dos Triglicerídeos Sanguíneos- Os animais foram submetidos a jejum de 4 horas e, após isto foi retirada uma gota de sangue da cauda para análise da glicose plasmática pelo glicosímetro (Accucheck, Roche) e uma gota para medida dos triglicerídeos sanguíneos do aparelho Accutrend GTC, Roche.

Teste de Resistência à Insulina- No dia seguinte das avaliações hemodinâmicas os animais do foram submetidos à jejum de 2 horas, foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg), e receberam uma injeção endovenosa de insulina (0,75 U/kg peso corporal). A glicose plasmática foi medida a partir de amostras de sangue obtidas da veia caudal utilizando-se de um glicosímetro (Accucheck, Roche) nos tempos 0, 4, 8, 12 e 16 min após a injeção de insulina. Os valores de glicemia dos minutos 4 a 16 foram usados para calcular a constante de queda da glicose plasmática (Kitt) de acordo com a descrição de Bonora e colaboradores (1989).

Sacrifício dos Animais- No dia seguinte ao término das avaliações metabólicas, os animais de todos os grupos foram sacrificados por decapitação e todos os tecidos foram retirados e congelados para avaliações bioquímicas.

Estresse oxidativo e enzimas antioxidantes

Preparação dos Tecidos- Após as avaliações citadas anteriormente, os animais foram pesados e mortos através de decapitação. O tecido cardíaco foi coletado e homogeneizado durante 30 segundos em um homogeneizador Ultra-Turrax, com KCl 1,15% e fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), na concentração de 100mmol/L em isopropanol e na quantidade de 10µL/mL de KCl adicionado. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 3000rpm, em centrífuga refrigerada entre 0 e 4°C, e o sobrenadante foi congelado em freezer a -70°C para as dosagens (Llesuy et al., 1985).

Dosagem de Proteínas- As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores (1951), que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1mg/mL (Lowry et al., 1951).

Medida de Lipoperoxidação (LPO): Quimiluminescência iniciada por t-BOOH (QL)

- O método consiste em adicionar um hidroperóxido orgânico de origem sintética (o hidroperóxido de tert-butil – t-BOOH) ao homogeneizado de tecido, avaliando-se a capacidade de resposta produzida pela amostra. A quimiluminescência foi medida em um contador beta (*TriCrab 2800TR, PerkinElmer*) com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio. As determinações foram realizadas em câmara escura, em frascos de vidro mantidos na penumbra para evitar a fosforescência ativada pela luz fluorescente. O meio de reação no qual foi realizado o ensaio consiste em 3,5 mL de uma solução tampão de fosfatos 20 mmol/L, contendo

KCl 140 mmol/L (pH 7,4), à qual foi adicionado 0,5 mL de homogeneizado. Após esse momento, foi realizada uma leitura inicial, considerada como a emissão basal de luz pelo homogeneizado. O hidroperóxido de tert-butila foi usado na concentração de 400 mmol/L, dos quais foram adicionados 30 µL no meio de reação para obter-se uma concentração final de 3mmol/L. Foi medida a emissão de luz e desta foi descontada a emissão basal do homogeneizado para fins de cálculo (Gonzalez Flecha et al., 1991).

Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) - Para que ocorra a reação, adicionou-se, a 0,25mL de homogeneizado, 0,75mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10%(P/V), que tem a função de desnaturar as proteínas presentes e acidificar o meio de reação. Essa mistura foi então agitada e centrifugada durante 3 minutos a 1000g. Foi retirado 0,5mL do sobrenadante e a este foi adicionado 0,5mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% (P/V), que reagiu com os produtos da lipoperoxidação formando um composto de coloração rosada. A mistura foi incubada por 15 minutos a 100°C e em seguida foi resfriada no gelo. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância a 535nm em espectrofotômetro (*Biospectro*) (Buege & Aust, 1978).

Dosagem de Proteínas Carboniladas (Dano a proteínas) - O ensaio para detecção das carbonilas é uma das técnicas utilizadas para a determinação de proteínas modificadas oxidativamente (Reznick&Packer, 1994). A técnica se baseia na reação das proteínas oxidadas do plasma sangüíneo com 2,4 dinitrofenil hidrazina (DNPH) em meio ácido, seguido de sucessivas lavagens com ácidos e solventes orgânicos e incubação final com guanidina. Desta forma, a absorbância das carbonilas foi medida em um espectrofotômetro a 360nm, num meio de reação contendo os seguintes reagentes: guanidina (6M) em ácido clorídrico (HCl) (2,5M) pH= 2,5; 2,4 DNPH em HCl (2,5M); ácido tricloroacético (TCA) 20%; TCA 10%; etanol - acetato de etila 1:1

(V/V). Paralelamente foi realizada a curva padrão de proteína, com albumina, com a absorbância lida em 280nm no espectrofotômetro.

Catalase (CAT)- A taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio é diretamente proporcional à atividade da CAT. Desta forma, o consumo de H_2O_2 pode ser utilizado como uma medida de atividade da enzima CAT. O ensaio consiste em medir a diminuição da absorbância a 240nm, comprimento de onda onde há a maior absorção pelo peróxido de hidrogênio, utilizando-se cubetas de quartzo. Para a realização das medidas foi usada uma solução tampão constituída de fosfatos a 50 mmol/L em pH 7,4. Foram adicionados 9 μ L deste tampão e 10 μ L de amostra de tecido na cubeta do espectrofotômetro, sendo esta mistura descontada contra um branco de tampão fosfato. A seguir foram adicionados 35 μ L de peróxido de hidrogênio (0,3 mol/L) e foi monitorada a diminuição da absorbância no espectrofotômetro (Boveris& Chance, 1973).

Superóxido Dismutase (SOD)- A técnica utilizada está baseada na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. Uma vez que não se consegue determinar a concentração da enzima nem sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo, se utiliza a quantificação em unidades relativas. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do detector. A oxidação do pirogalol leva à formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a 420 nm durante 2 minutos. A atividade da SOD é determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado. No meio de reação, foram utilizados 20 μ L de homogeneizado, 973 μ L de tampão Tris-Fosfato a 50 mmol/L (pH 8,2), 8 μ L de pirogalol a 24 mmol/L, 4 μ L de CAT a 30 μ mol/L. Esta curva obtida foi utilizada como branco. Foi também feita uma curva padrão utilizando três

concentrações distintas de SOD (0,25U, 0,5U e 1U), através da qual foi obtida a equação da reta para realização dos cálculos.

Glutathione Peroxidase (GPx) - Como a GPx catalisa a reação de hidroperóxidos com glutathione reduzida (GSH) para formar glutathione oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido, a atividade da enzima pode ser determinada medindo-se o consumo de NADPH na reação de redução acoplada à reação da GPx. A atividade da GPx foi medida em um espectrofotômetro, sendo monitorada a diminuição de absorvância do NADPH a 340 nm. Na cubeta do espectrofotômetro, foram adicionados 330 µL de tampão, 50 µL do homogeneizado (amostra), 500 µL de NADPH, 10 µL de azida sódica, 50 µL de GSH e 10 µL de GR. Foi registrada a absorvância por um período de aproximadamente 2 minutos, para obtenção da linha de base. Após esse momento, foram adicionados 50 µL de hidroperóxido de tert-butila, e a diminuição da absorvância devida ao consumo de NADPH foi monitorada por mais 3 minutos (Flohé&Gunzler, 1984).

Balanco Redox: Razão GSH/GSSG. Foi adicionado à amostra de tecido ácido perclórico (2N), a qual foi colocada em *ependorf*, homogeneizada e centrifugada.

Glutathione Oxidada: Separa-se 100ul do sobrenadante, ao qual se adiciona 25 ul de NEM e neutraliza-se a amostra com MOPS 0,3 MKOH 2M, pH=7,4. Após uma hora, extrai-se uma alíquota de 25 ul, adiciona-se 175 ul H₂O, 700 ul NADPH (10mM), 100 ul DTNB (ácido ditionitrobenzóico, 6mM), zera o espectro e adiciona-se glutathioneredutase (10U/ml). A leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro 414 nm(Tietze, 1969).

Glutathione Total: A glutathione total mede a reação de óxido redução entre GSH e GSSG. Separa-se 100ul do sobrenadante e neutraliza-se a amostra com MOPS 0,3 MKOH 2M, pH=7,4.

No momento do ensaio, extrai-se uma alíquota de 25 μ l, adiciona-se 175 μ l H_2O , 700 μ l NADPH (10mM), 100 μ l DTNB (6mM), zera o espectro e adiciona-se glutathionaredutase (10U/ml). A leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro 414 nm (Beutler et al., 1963).

A GSH foi calculada a partir da subtração da glutathiona total pela GSSG, e em seguida foi calculada a razão GSH/GSSG no tecido cardíaco.

Nitritos e Nitratos - Os níveis de nitritos e nitratos no plasma foram medidos pela reação das amostras com o reagente de Griess microplacas (96 poços) em aparelho leitor de ELISA. Alíquotas de 50 μ L de homogeneizado de tecido foram incubadas com cofatores enzimáticos e nitrato redutase (3U/ml) por uma 30 minutos para conversão de nitrato em nitrito em temperatura ambiente. O total de nitrito tecidual foi então analisado pela reação das amostras com 50 μ l de reagente de Griess. O total de nitrito tecidual foi estimado a partir de uma curva padrão de absorbância em 592 nm (Granger et al., 1999). Foi calculado o Nox, índice da produção de óxido nítrico (Nox) através da razão total de nitratos por nitritos como descrito por Miranda e colaboradores (2001).

Marcadores Inflamatórios- As dosagens de interleucinas 6 e 10 e TNF alfa em plasma foram realizadas em microplacas (96 poços) sensibilizadas com o anticorpo para a proteína de interesse, aderido esta à parede dos poços da placa por um substrato imunoabsorvente. Foi feito o bloqueio prévio de ligações inespecíficas e posterior incubação das amostras experimentais, contendo a proteína (antígeno) a ser dosada. Foi feita a incubação com anticorpo ligado a enzima marcada com peroxidase, e posterior reação com cromógeno. Na mesma placa, foi feita a curva-padrão, que foi usada para o cálculo da quantidade de proteína por poço. A absorbância foi medida em aparelho leitor de ELISA. Foram usados kits específicos para ratos: *TNF alfa*, *IL-6* e

IL-10 (RayBiotech). O ensaio para dosagem usou as concentrações na curva-padrão específicas para cada substância. Ressalta-se que todas as medidas de tubos brancos da reação, curva-padrão, controles de qualidade do kit e amostras experimentais foram dosados em duplicata.

3.4 Análise Estatística

Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. O teste de Levene foi utilizado para verificar a homogeneidade da amostra. O teste de análise de variância (ANOVA) foi devidamente aplicado para análise dos dados. Teste de correlação de Pearson foi aplicado para testar associação entre as variáveis. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

Os resultados são apresentados sob forma de 3 artigos científicos:

- Artigo 1. Cardiovascular autonomic dysfunction and oxidative stress induced by fructose overload in an experimental model of hypertension and menopause.
- Artigo 2. Standardization of resistance exercise training: Effects in diabetic ovariectomized rats
- Artigo 3. Treinamento físico combinado melhora perfil inflamatório e de estresse oxidativo em ratas ooforectomizadas com síndrome metabólica: papel do sistema nervoso autônomo.

Artigo 1 - Submetido para a revista *Plos One* - Qualis: A1 (Educação Física)

**CARDIOVASCULAR AUTONOMIC DYSFUNCTION AND OXIDATIVE STRESS
INDUCED BY FRUCTOSE OVERLOAD IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF
HYPERTENSION AND MENOPAUSE**

O objetivo deste artigo foi verificar os efeitos do consumo crônico de frutose em ratas ooforectomizadas espontaneamente hipertensas em parâmetros de função cardiovascular, de regulação autonômica cardiovascular, metabólicos, de estresse oxidativo e de inflamação.

<https://blu171.mail.live.com/mail/PrintMessages.aspx?cpids=a663ffbd-591a-11e3-b61c-00215ad7ea36,m&isSafe=true&FolderID=66666666-6666-6666-6666-66...> 1/1

Cardiovascular autonomic dysfunction and oxidative stress induced by fructose overload in an experimental model of hypertension and menopause.

Filipe Fernandes Conti¹; Janaina de Oliveira Brito¹; Nathalia Bernardes²; Danielle da Silva Dias¹; Iris Callado Sanches¹; Christiane Malfitano¹; Maria-Claudia Irigoyen²; Kátia De Angelis¹

¹ Laboratory of Translational Physiology, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, SP, Brasil.

² Hypertension Unit, Heart Institute (InCor), School of Medicine, University of Sao Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Running title

Cardiometabolic dysfunctions in OVX rats

Correspondence author:

Kátia De Angelis

Laboratory of Translational Physiology, Universidade Nove de Julho

Rua Vergueiro, 235/249 – Liberdade – Sao Paulo – SP - Brasil

ZIP Code - 01504-001

Fone: 55 11 3385 9067

E-mail: prof.kangelis@uninove.br

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the effects of fructose overload on cardiovascular autonomic modulation, inflammation and cardiac oxidative stress in an experimental model of hypertension and menopause. Female SHR rats were divided into (n=8/group): hypertensive (H), hypertensive ovariectomized (HO) and hypertensive ovariectomized submitted to fructose overload (100g/L in drinking water) (FHO). Arterial pressure (AP) signals were directly recorded. Cardiac autonomic modulation was evaluated by spectral analysis. Oxidative stress was evaluated in cardiac tissue. AP was higher in the FHO group when compared to the other groups. Fructose overload induced an increase in body and fat weight, triglyceride concentration and a reduction in insulin sensitivity. IL-10 was reduced in the FHO group when compared to the H group. TNF- α was higher in the FHO in comparison to all other groups. Lipoperoxidation was higher and glutathione redox balance was reduced in the FHO group when compared to other groups, an indication of increased oxidative stress. A negative correlation was found between IL-10 and adipose tissue. In conclusion, fructose overload induced an impairment in cardiac autonomic modulation associated with inflammation and oxidative stress in hypertensive rats undergoing ovarian hormone deprivation.

Key words: menopause, metabolic syndrome, heart rate variability, blood pressure variability, inflammation, oxidative stress.

INTRODUCTION

Metabolic syndrome is characterized by the association of 3 or more risk factors, including: abdominal obesity associated with an excess of abdominal fat, insulin resistance, type 2 diabetes, dyslipidemia and hypertension. Changes in dietary habits are among the leading contributors to the growing worldwide prevalence of metabolic syndrome, obesity, and type 2 diabetes. These changes are characterized by increased intake of simple sugars, particularly fructose, commonly used in the food industry and sugar-sweetened drinks [1]. Indeed, several studies have pointed to the adverse cardiac and metabolic effects of a high fructose diet in animal models. Fructose-fed rats and mice show moderate hypertension and glucose intolerance, associated with increased levels of plasma insulin, cholesterol and triglycerides [2,3,4,5]. Our group has demonstrated that only eight weeks consumption of fructose was sufficient to induce prominent metabolic and cardiovascular changes associated with autonomic dysfunctions in mice and rats [2,5,6]. Recently, we have demonstrated that increased sympathetic modulation for vessels and heart preceded the development of metabolic dysfunction in fructose fed mice [4].

However, it should be stressed that the prevalence of hypertension and metabolic dysfunctions sharply increases after menopause. The association between autonomic dysfunction and cardiovascular diseases strengthens evidence that alterations in the sympathovagal control increase cardiovascular risk after menopause [7]. Moreover, seems to be an association between oxidative stress inflammation, and both would play a role in the development of several cardiovascular diseases [8]. However, the role of the oxidative stress and inflammation on cardio-metabolic dysfunction after ovarian hormone deprivation is not well understood. Thus, our study was designed to evaluate the hypothesis that in this context, fructose overload may promote additional injuries on cardiovascular autonomic modulation, inflammation and oxidative

stress in hypertensive rats undergoing ovarian hormone deprivation. In this study, we assessed the effects of fructose overload on cardiovascular autonomic modulation, inflammation and oxidative stress in an experimental model of hypertension and menopause.

METHODS

21 day old female SHR rats were obtained from the Animals Facilities of the Institute of Cardiology of Rio Grande do Sul. The rats were randomly divided into hypertensive (H; n = 8), hypertensive OVX (HO; n = 8) and hypertensive OVX undergoing fructose overload (FHO; n = 8). All surgical procedures and protocols were approved by the ethics committee of Universidade Nove de Julho (Protocol AN002/12) and were conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, issued by the National Institutes of Health.

Fructose overload

FHO rats received D-fructose (100 g/L) in the drinking water for 19 weeks. H and HO animals received standard laboratory chow and water ad libitum. The consumption of chow and water (with or without fructose) were measured weekly.

Ovariectomy

After 10 weeks of fructose overload, the animals were anesthetized (80 mg/kg ketamine and 12 mg/kg xylazine), and the oviduct was sectioned and the ovary removed as described in detail elsewhere [9,10,11]. Data from our laboratory have demonstrated that estrogen concentration, measured through immunoassay, was 39 ± 7 pg/mL in healthy female rats. However, in the present study, estrogen concentration was not detectable in ovariectomized studied groups, thus confirming ovarian hormone deprivation [10].

Metabolic evaluations

At the end of protocol (19 weeks of fructose overload), blood glucose and triglyceride concentrations were measured (Accucheck and Accutrend, Roche) after 4-hour fasting. For insulin tolerance test, the animals fasted for 2 hours and were then anesthetized with sodium thiopental (40 mg/kg body weight, IP). A drop of blood was collected from the tail for blood glucose level measurement at baseline and 4, 8, 12, and 16 minutes after insulin injection (0.75 U/kg). The constant rate for blood glucose disappearance (KITT) was calculated using the $0.693/t_{1/2}$ formula. Blood glucose $t_{1/2}$ was calculated from the slope of the least squares analysis of blood glucose concentrations during the linear phase of decline [6,12].

Cardiovascular measurements

After metabolic evaluations, rats were anesthetized with ketamine (80 mg/kg) and xylazine (12 mg/kg), and two polyethylene-tipped Tygon cannulas filled with heparinized saline were implanted into the carotid artery and jugular vein for direct measurements of AP and drug administration, respectively. During the experiment, rats received food and water ad libitum; the rats were conscious in their cages and were allowed to move freely during the hemodynamic experiments. The arterial cannula was connected to a transducer (BloodPressure XDCR, Kent Scientific), and blood pressure signals were recorded for a 30-minute period using a microcomputer equipped with an analog-to-digital converter (CODAS, 2Kz, DATAQ Instruments). The recorded data were analyzed on a beat-to-beat basis to quantify changes in systolic (SAP), diastolic (DAP), and mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) [5,9,10].

Autonomic measurements

Time-domain analysis consisted of calculating mean pulse interval (PI) and SAP, with PI variability and SAP variability measured from its respective time series (three time series of 5

min for each animal). For frequency domain analysis, the same time series of PI and SAP were cubic splineY interpolated (250 Hz) and cubic splineY decimated to be equally spaced in time after linear trend removal; power spectral density was obtained through the fast Fourier transformation. Spectral power for low-frequency (LF; 0.20-0.75 Hz) and high-frequency (HF;0.75-4.0 Hz) bands was calculated by power spectrum density integration within each frequency bandwidth, using a customized routine (MATLAB 6.0, Mathworks) [13].

Inflammatory markers

IL-6, IL-10 and TNF- α levels were determined using a commercially available ELISA kit (R&D Systems Inc.), in accordance with the manufacturer's instructions. ELISA was performed in 96-well polystyrene microplates with a specific monoclonal antibody coating. Absorbance was measured at 540 nm in a microplate reader.

Oxidative stress profile

One day after hemodynamic evaluations the animals were killed by decapitation and the heart (ventricles) was immediately removed, rinsed in saline, and trimmed to remove fat tissue and visible connective tissue. The tissue was cut into small pieces, placed in ice-cold buffer, and homogenized in an ultra-Turrax blender with 1 g tissue per 5 mL 150 mM KCl and 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4. The homogenate was centrifuged at 600 g for 10 min at -26C.

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS): For the TBARS assay, trichloroacetic acid (10%, w/v) was added to the homogenate to precipitate proteins and to acidify the samples [14]. This mixture was then centrifuged (10000g, 3 min), the protein-free sample was extracted, and thiobarbituric acid (0.67%, w/v) was added to the reaction medium. The tubes were placed in a water bath (100°C) for 15 min. The absorbencies were measured at 535 nm using a spectrophotometer. The results are expressed as nanomoles per milligram of protein.

Chemiluminescence (CL): [Tissue] membrane lipoperoxidation was evaluated by chemiluminescence. The chemiluminescence assay was carried out with an LKB Rack Beta liquid scintillation spectrometer 1215 (LKB Producer AB, USA) in the out-of-coincidence mode at room temperature (25°C to 27°C). The supernatants were diluted in 140 mM KCl and 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, and added to glass tubes, which were placed in scintillation vials; 3 mM tert-butylhydroperoxide was added, and chemiluminescence was determined up to the maximal level of emission [9,15].

Antioxidant enzyme activities: The quantification of superoxide dismutase (SOD) activity, expressed as U/mg protein, was based on the inhibition of the reaction between $O_2^{\cdot-}$ and pyrogallol [16]. Catalase (CAT) activity was determined by measuring the decrease in H_2O_2 absorbance at 240 nm. CAT concentration was expressed as $\mu\text{mol } H_2O_2$ reduced/min/mg protein [17]. Glutathione peroxidase (GPx) activity was expressed as nmol peroxide/hydroperoxide reduced/min/mg protein and was based on the consumption of NADPH at 480 nm [18].

Glutathione and GSSG concentration: To determine glutathione oxidized (GSSG) and total glutathione concentration (GSH), tissue was homogenized in 2 M perchloric acid and centrifuged at 1000 *g* for 10 min, and 2 M KOH was added to the supernatant. The reaction medium contained 100 mM phosphate buffer (pH 7.2), 2 mM NADPH, 0.2 U/mL glutathione reductase and 70 μM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). To determine the GSSG concentration, the supernatant was neutralized with 2 M KOH and inhibited by the addition of 5 μM N-ethylmaleimide. Absorbance was read at 420 nm [19]. GSH values were determined from the total and GSSG concentration.

Statistical analysis

Data are expressed as mean $\pm$ SEM. The Levene Test was used to evaluate data homogeneity. A one-way analysis of variance followed by the Student-Newman-Keuls test was used to compare groups. Pearson correlation analysis was used to identify an association between variables. Significance level was established at $P\leq 0.05$.

RESULTS

Body weight and adipose tissue weight were higher in FHO group when compared to other groups. Glycemia was similar between groups. Triglyceride was increased in the FHO group when compared to all other groups. Insulin sensitive was lower in FHO group when compared to the H group (Table 1).

Resting tachycardia was observed in the FOH group when compared to the other groups. DAP and MAP were higher in HO group when compared to the H group and the FHO group had an additional increase in SAP, DAP and MAP (Table 2).

Standard deviation (SD) and total variance VAR of PI were lower in FHO groups when compared to the HO group. Total variance (VAR) of SAP was increased in the HO group in relation to the H group. VAR and LF band of SAP were higher in the FHO group when compared to all other studied groups (Table 2).

TNF α was higher in the FHO when compared to all other groups and IL-10 was lower in FHO when compared to the H group. Negative correlation was observed between adiposity tissue and IL-10 among hypertensive groups ($r = -0.6$) (Table 3 and Figure 1).

TBARS was enhanced in both HO and FHO groups in relation to H group; and additional increase in TBARS was observed in FHO rats as compared to HO rats. Moreover, CL was higher

in FHO when compared to all other groups. Hormone deprivation promoted an increase in CAT activity and fructose overload promoted an additional increase in this parameter. We did not observe any difference in SOD activity between groups. GPx was lower in HO group when compared to the H group and the fructose overload promoted an additional increase in this parameter (Table 4).

DISCUSSION

In the present study, it was observed that ovarian hormone deprivation and fructose overload led to impairments in cardiovascular autonomic modulation, and worsened both *oxidative stress and inflammation parameters*.

Ovarian hormone deprivation induced an increase in AP and promoted an increase in vascular sympathetic modulation in SHR rats in the present study. Previous studies from our group have also demonstrated that ovarian hormone deprivation induces BP increase and led to impaired baroreflex sensitivity in healthy Wistar rats [9,10]. In addition, it should be noted that in the first decades of life, women have a greater cardioprotection when compared to men, as evidenced by increased vagal modulation and lower sympathetic modulation. However, approximately between the fifth and sixth decade of life this greater cardioprotection disappears [7], a period that coincides with the advent of menopause, thus demonstrating the importance of ovarian hormones in cardiovascular control.

Experimentally, fructose overload in drinking water or chow has been used to study metabolic syndrome and promote similar metabolic and autonomic derangements [2,3,5,20,21]. Indeed, in present study, fructose overload promoted an additional impairment of metabolic, autonomic, oxidative stress and inflammatory parameters in hypertensive ovariectomized rats. In

fact, the sum of risk factors (hypertension + ovariectomy + fructose overload) promoted an increase in body weight, adipose tissue and triglyceride concentrations as well as impaired insulin sensitivity in FHO rats. It has been demonstrated that the exposure of the liver to large quantities of fructose promotes rapid stimulation of lipogenesis, which contributes to triglyceride accumulation, leading to fewer insulin receptors and, consequently, reducing insulin sensitivity [22].

Moreover, the sum of risk factors promoted an increase in the heart rate, an additional increase in BP, impairment in heart rate variability and systolic arterial pressure variability. Several studies have found an increase in BP after fructose overload [5,21,23]. In the present study, we observed that both DAP and MAP were higher in HO group when compared to the H group and FHO group had an additional increased in SAP, DAP and MAP. One possible explication for this increased BP would be the impairment of cardiovascular autonomic modulation.

Heart rate variability has considerable as a tool to to assess the role of autonomic nervous system fluctuations in normal healthy individuals and in patients with various cardiovascular and non-cardiovascular disorders [24]. Reduction in HRV has been associated with negative outcomes [25]. In the present study, fructose overload promoted a reduction in HRV as well as an increase in sympathetic activity as demonstrated by the increase in VAR-SAP and LF-SAP. Moreover, previous studies from our group have shown that fructose overload also promotes an increase in sympathetic tonus, a decrease in vagal tonus and a reduction in baroreflex sensitive [5].

Regarding inflammation makers, we observed that in this study $\text{TNF-}\alpha$ was higher in FHO when compared to other groups and fructose overload promoted a reduction in IL-10. We

also found a negative correlation between adipose tissue and IL-10. In fact, adipose tissue is an active endocrine and paracrine organ that releases a large number of cytokines and bioactive mediators, such as leptin, interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) [26,27]. These substances negatively influence glucose and lipid homeostasis, blood pressure, coagulation, fibrinolysis and inflammation, which may lead to endothelial dysfunction and atherosclerosis [26,27].

Moreover, a decreased antioxidant capacity together with increased lipid peroxidation has been reported in patients with fatty liver, visceral obesity, and metabolic syndrome. There seems to be a correlation between the amount of visceral fat and systemic oxidative markers, indicating that visceral fat is an independent regulator of oxidative changes [28]. Regarding antioxidant enzymes, hormone deprivation promoted an increase in CAT concentration and a decrease in GPx activity in the HO group when compared to the H group. Ruiz et al. have shown that 17 β -estradiol has intrinsic antioxidant properties, and the lack of it would then result in enhanced CAT activity, probably due to an increased concentration of hydrogen peroxide [29]. Our results are in agreement with Barp et al., [30] who have likewise demonstrated an increased cardiac CAT activity in ovariectomized rats. Moreover, the increase in CAT in the HO group (vs. H) may be also associated with the observed decrease in GPx in this group, since these enzymes compete for the same substrate (hydrogen peroxide). Importantly, lipoperoxidation (TBARS) was increased in SHR ovariectomized rats when compared to intact SHR rats, suggesting increased oxidative stress. A previous study from our group has demonstrated a positive correlation between systolic AP and lipoperoxidation, thus reinforcing the role of oxidative stress in AP changes during female hormone deprivation [9]. However, it should be stressed that, despite favorable changes in antioxidant enzymes in fructose fed group observed in the present

work, lipoperoxidation was markedly increased in the fructose group (TBARS and CL) while glutathione redox balance was reduced, thus demonstrating an imbalance between pro-oxidant and antioxidant forces. This would point to increased oxidative stress in rats undergoing association of risk factors.

In conclusion, fructose overload induced impairment of cardiovascular autonomic modulation associated with increased oxidative stress and inflammatory parameter in hypertensive ovariectomized rats. These data reinforce the role of autonomic changes in immune function modulation [4,26,27,31], by inducing the release of bioactive molecules which are involved in the increased oxidative stress and development of cardiometabolic changes after menopause.

REFERENCES

- [1] Laville M and Nazare JA. (2009) Diabetes, insulin resistance and sugars. *Obesity Reviews* 10(1): 24–33.
- [2] Farah V, Elased KM, Chen Y, et al. (2006) Nocturnal hypertension in mice consuming a high fructose diet. *Auton Neurosci* 130(1-2): 41-50.
- [3] Kamide K, Rakugi H, Higaki J, et al. (2002) The renin-angiotensin and adrenergic nervous system in cardiac hypertrophy in fructose-fed rats. *Am J Hypertens* 15: 66-67.
- [4] De Angelis K, Senador DD, Mostarda C, et al. (2012) Sympathetic overactivity precedes metabolic dysfunction in a fructose model of glucose intolerance in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 15;302(8) :R950-957.
- [5] Sanches IC, Brito JO, Candido GO, et al. (2012) Cardiometabolic benefits of exercise training in an experimental model of metabolic syndrome and menopause. *Menopause* 19(5): 562-568.

- [6] Brito JO, Ponciano K, Figueroa D, et al. (2008) Parasympathetic dysfunction is associated with insulin resistance in fructose-fed female rats. *Braz J Med Biol Res* 41: 804-808.
- [7] Kuo TBJ, Lin T, Yang CCH, Li CL, et al. (1999) Effect of aging on gender differences in neural control of heart rate. *Am J Physiol* 46: H2233-H2239.
- [8] Hulsmans M, Van Dooren E, and Holvoet P. (2012) Mitochondrial reactive oxygen species and risk of atherosclerosis. *Curre Ather Repor* 14(3): 264–276.
- [9] Irigoyen MC, Paulini J, Flores LJF, et al. (2005) Exercise training improves baroreflex sensitivity associated with oxidative stress reduction in ovariectomized rats. *Hypertension* 46: 998-1003.
- [10] Flues K, Paulini J, Brito S, et al. (2010) Exercise training associated with estrogen therapy induced cardiovascular benefits after ovarian hormones deprivation. *Maturitas* 65: 267-271.
- [11] Souza SBC, Flues K, Paulini J, et al. (2007) Role of exercise training in cardiovascular autonomic dysfunction and mortality in diabetic ovariectomized rats. *Hypertension* 50: 786-791.
- [12] Bonora E, Moghetti P, Zancanaro C, et al. (1989) Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab* 68: 374-378.
- [13] Soares PP, Da No´brega AC, Ushizima MR, Irigoyen MC. (2004) Cholinergic stimulation with pyridostigmine increases heart rate variability and baroreflex sensitivity in rats. *Auton Neurosci* 30: 24-31.
- [14] Buege JA, Aust SD. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52: 302-10.
- [15] Gonzalez FB, Llesuy S, Boveris A. (1991) Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: An assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med* 10: 93-100.

- [16] Marklund SL. (1985) Superoxide dismutase isoenzymes in tissues and plasma from New Zealand black mice, nude mice and normal BALB/c mice. *Mutat Res* 148: 129-34.
- [17] Aebi H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105: 121-6.
- [18] Flohe L, Gunzler WA. (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105: 114-121.
- [19] Anderson ME. (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol* 13: 548-55.
- [20] Mostarda C, Moraes-Silva IC, Salemi VMC, et al. (2012) Exercise training prevents diastolic dysfunction induced by metabolic syndrome in rats. *Clinics* 67(7): 815-820.
- [21] Renna NF, Lembo C, Diez E, et al. (2013) Role of renin-angiotensin system and oxidative stress on vascular inflammation in insulin resistance model. *International Journal of Hypertension*, doi:10.1155/2013/420979.
- [22] Murakami T, Shimomura Y, Fujitsuka N, et al. (1997) Enlargement of glycogen store in rat liver and muscle by fructose-diet intake and exercise training. *J Appl Physiol* 82: 772-775.
- [23] Vazquez-Prieto MA, Lanzi CR, Lembo C, et al. (2011) Garlic and onion attenuates vascular Inflammation and oxidative stress in fructose-fed rats. *Journal of Nutrition and Metabolism*, doi:10.1155/2011/475216.
- [24] Task force of the European society of cardiology and the north American society of pacing and eletrophysiology: Heart rate variability: Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use (1996) *Circulation* 93: 1043-1065.
- [25] Ribeiro JP, Moraes Filho RS. Variabilidade da Frequência Cardíaca como Instrumento de Investigação do Sistema Nervoso Autônomo. *Revista Brasileira de Hipertensão* 2005; 12:4-20.

- [26] Lau DCW, Dhillon B, Yan H, et al. (2005) Szmitko PE, Verma S. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H2031–H2041.
- [27] Van Gaal LF, Mertens IL and De Block DE. (2006) Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 444(7121): 875-880.
- [28] Grattagliano I, Palmieri VO, Portincasa P, et al. (2008) Oxidative stress-induced risk factors associated with the metabolic syndrome: a unifying hypothesis. *Journal of Nutritional Biochemistry* 19(8): 491–504
- [29] Ruiz-Larrea MB, Martin C, Martinez R, et al. (2000) Antioxidant activities of estrogens against aqueous and lipophilic radicals; differences between phenol and catechol estrogens. *Chem Phys Lipids* 105(2):179–188.
- [30] Barp J, Sartório CL, Campos C, et al. (2012). Influence of ovariectomy on cardiac oxidative stress in a renovascular hypertension model. *Can J Physiol Pharmacol* 90: 1229-1234.
- [31] Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, et al. (2000) Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405 (6785): 458–462.

Figure caption

Figure 1. Negative Pearson correlation ($r = -0.6$, $P = 0.05$) obtained between adipose tissue and cardiac levels of IL-10 for studied groups.

TABLE 1. Metabolic evaluations in studied groups

	H	HO	HFO
Body weight (g)	197±2	264±3†	261± 2†#
Adipose Tissue (g)	1.91±0.16	2.96±0.45	5.25±0.39†¥
Glucose (mg/dL)	83±5.0	84±2.0	92±2.1
Triglyceride (mg/dL)	132±4.0	125±6.4	160±8.0†¥
KITT (%/min)	4.15±0.26	4.69±0.33	3.4±0.28†

Data are reported as mean± SEM. †P<0.05 vs. H; ¥ P<0.05 vs HO. KITT: constant rate for blood glucose disappearance.

TABLE 2. Hemodynamic and autonomic evaluation in studied groups

	H	HO	FHO
SAP (mmHg)	174±5	183±6	206±4†¥
DAP (mmHg)	121±7	144±5†	153±2†¥
MAP (mmHg)	146±6	164±5†	174±4†¥
HR (bpm)	352±13	348±16	403±12†¥
HRV			
SD (ms)	6.62±0.61	8.63±1.00	5.43±0.96¥
VAR (ms²)	53.97±7.98	63.64±10.34	30.84 ±6.81¥
LF (ms²)	3.18±0.55	3.94±0.97	0.90±0.12¥
HF (ms²)	5.97±1.41	9.22±2.03	2.77±0.18
BPV			
VAR (mmHg²)	31.08±2.66	51.94±6.94†	77.79±11.87†¥
LF (mmHg²)	5.06±0.91	5.07±0.52	10.62±2.33†¥

Data are reported as mean± SEM. †P<0.05 vs. H; ¥ P<0.05 vs. HO. SAP: systolic arterial pressure; DAP: diastolic arterial pressure; MAP: mean arterial pressure; HR: heart rate; Heart rate (HRV) and systolic blood pressure (BPV) variability computed from 0.20 to 3 Hz (total power). SD: standard deviation; VAR: total variance; LF: low-frequency band (0.20-0.75 Hz); HF: high-frequency band (HF: 0.75-3 Hz).

TABLE 3. Inflammatory markers in studied groups

	H	HO	FHO
TNF α (pg/mg protein)	32.9 $\pm$ 7.5	31.7 $\pm$ 8.6	65.8 $\pm$ 9.9¥†
IL-6 (pg/mg protein)	379 $\pm$ 27	368 $\pm$ 26	401 $\pm$ 35
IL-10 (pg/mg protein)	37.1 $\pm$ 9.0	29.6 $\pm$ 3.4	16.2 $\pm$ 2.5†

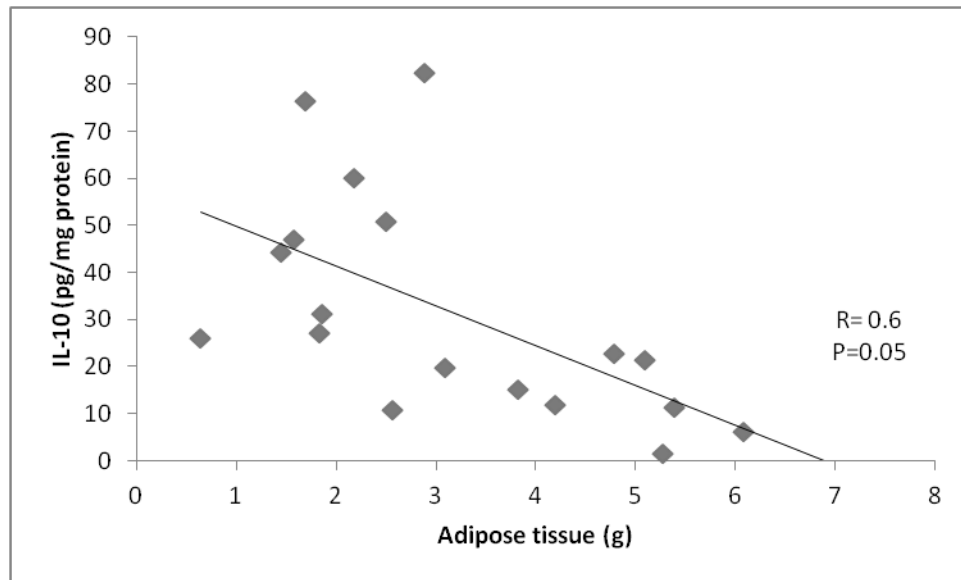
Data are reported as mean $\pm$ SEM. †P<0.05 vs. H; ¥ P<0.05 vs. HO.

TABLE 4. Oxidative stress evaluations in studied groups

	HS	HO	FHO
TBARS ($\mu\text{mol/mg protein}$)	4.95 $\pm$ 0.89	8.27 $\pm$ 0.98 [†]	12.03 $\pm$ 0.93 ^{†¥}
CL (cps/mg protein)	6661 $\pm$ 566	6514 $\pm$ 547	15043 $\pm$ 1333 ^{†¥}
CAT (nmol/mg protein)	0.29 $\pm$ 0.04	0.47 $\pm$ 0.05 [†]	0.63 $\pm$ 0.05 ^{†¥}
SOD (USOD/mg protein)	11.47 $\pm$ 0.37	11.17 $\pm$ 0.41	13.05 $\pm$ 0.86
GPx (nmol/min/mg protein)	54.78 $\pm$ 3.10	38.55 $\pm$ 1.67 [†]	63.39 $\pm$ 5.52 [¥]
GSH/GSSG (nmol/min/mg protein)	11.07 $\pm$ 0.7	13.00 $\pm$ 1.4	8.94 $\pm$ 0.8 [¥]

Data are reported as mean $\pm$ SEM. [†]P<0.05 vs. H; [¥] P<0.05 vs. HO.

Figure 1



Artigo 2 - Publicado no *International Journal Sports of Medicine* - Qualis: A1 (Educação Física)

STANDARDIZATION OF RESISTANCE EXERCISE TRAINING: EFFECTS IN DIABETIC OVARECTOMIZED RATS

Os objetivos deste artigo foram: 1) padronizar um teste de carga máxima em escada adaptada para ratos, para a prescrição do treinamento físico resistido; 2) prescrever um treinamento físico resistido de intensidade moderada baseado no teste de carga máxima; e 3) verificar os efeitos do treinamento físico resistido em um modelo experimental de menopausa e diabetes.

Vale ressaltar que apesar do presente estudo fazer uso de um modelo experimental de síndrome metabólica e menopausa, este artigo foi de extrema importância para realização do presente estudo. Por meio deste estudo prévio foi possível realizar a prescrição do treinamento físico resistido, o qual foi realizado em associação ao treinamento físico aeróbio no grupo hipertenso ooforectomizado tratado com frutose e submetido ao treinamento físico combinado (HOFTc).

Standardization of Resistance Exercise Training: Effects in Diabetic Ovariectomized Rats

Authors

I. C. Sanches¹, F. F. Conti¹, M. Sartori², M. C. Irigoyen², K. De Angelis¹

Affiliations

¹ Laboratory of Translational Physiology, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, Brazil² Hypertension Unit, Heart Institute (InCor), School of Medicine, University of São Paulo, Brazil

Key words

- ▣ resistance exercise training
- ▣ maximal load test
- ▣ rat
- ▣ menopause
- ▣ diabetes
- ▣ ladder

Abstract

This study was carried out with a 3-fold aim: 1) to standardize a maximal load test (MLT) on ladders for prescription of resistance exercise training (RET) in rats, 2) to prescribe moderate-intensity RET based on this MLT and 3) to test the effect of this RET in diabetic ovariectomized rats. Female Wistar rats were divided into control (C), diabetic ovariectomized sedentary (DOS) and trained (DOT) groups. The MLT was standardized with increased load applied to the rat tail for each climb, and blood lactate was measured to identify lactate threshold in C rats. MLT was applied in the 1st, 4th and 8th week of the pro-

tol. After 8 weeks of RET, the arterial pressure was directly recorded. DOS group reduced performance in MLT, body weight, left ventricular, plantar and soleus muscles mass (vs. C). DOT rats showed an improvement in MLT associated with plantar muscle mass increased (vs. C and DOS), with attenuation of hypotension and bradycardia (vs. DOS). In conclusion, the results provide a useful method for determining the maximal load and applying RET in rats. Moreover, this study showed that moderate intensity RET improves hemodynamic status in diabetic ovariectomized rats, thereby reinforcing the role of RET in diabetes management.

Introduction

Over the last decades, the numerous beneficial effects of aerobic exercise training have been extensively investigated with respect to various biological parameters. Accordingly, our group has focused on elucidating the gender-specific effects of aerobic exercise training on cardiovascular and autonomic control, as in healthy females [39] or in ovariectomized rats [13,17]. Since the risk of diabetes mellitus (DM) increases significantly after menopause [37], and DM increases the risk of cardiovascular disease in pre- and postmenopausal women [22,23,44], we investigated the effect of aerobic exercise training in ovariectomized rats with streptozotocin-induced diabetes [43] and in fructose-fed ovariectomized rats [38], showing beneficial effects on cardiovascular autonomic control. However, these effects were attributed to dynamic aerobic exercise training on a treadmill. It is indeed well-established that exercise training induces cardiovascular and metabolic changes that are dependent on exercise type, intensity and duration as well as on physiological or pathophysiological conditions [5,7,8,33,41,

42,49]. Moreover, despite the many experimental and clinical findings reporting the benefits of aerobic exercise training in the management of cardio metabolic dysfunctions in some diseases (e.g. DM, hypertension and metabolic syndrome), a growing number of clinical evidence supports the importance of resistance exercise training as a part of lifestyle therapy for these conditions. In fact, several medical associations recommend resistance exercise training (40–60% maximal load) as a complement to aerobic training in the management of various diseases, including diabetes [33,40,47,48]. However, the effect of this type of training in experimental models of the diseases has been poorly studied, since the standardized resistance training protocol was applied in high intensity, which is not appropriate in the context of the management of conditions associated with increased cardio metabolic risk. Furthermore, the lack of a well-standardized maximal load test in rats impairs the accuracy in resistance exercise training prescription. Therefore, the objectives of the present study were: 1) to standardize a maximal load test on ladder for the accurate prescription of resistance exercise training in rats; 2) to prescribe a

accepted after revision
June 18, 2013

Bibliography

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1351254>
Published online: 2013
Int J Sports Med
© Georg Thieme
Verlag KG Stuttgart · New York
ISSN 0172-4622

Correspondence

Iris Callado Sanches
Laboratory of Translational
Physiology
Universidade Nove de Julho
(UNINOVE)
Rua Vergueiro
235 – Liberdade
São Paulo
Brazil 01504001
Tel.: +55/11/3385 9133
Fax: +55/11/3385 9133
icsanches@uninove.br

Sanches IC et al. Maximal Load Test & Resistance Training on Ladder for Rats ... Int J Sports Med

Electronic reprint for personal use

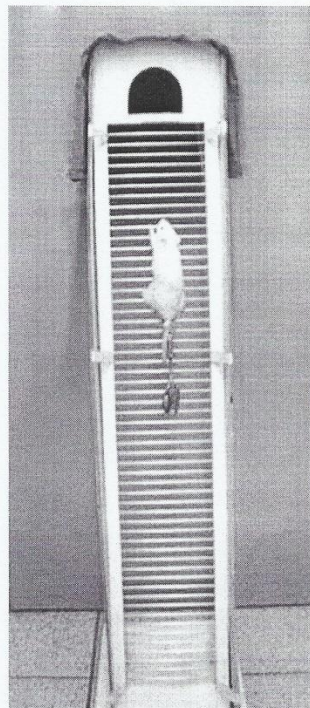


Fig. 1 Ladder adapted for rats used in this study.

moderate-intensity resistance exercise training based on this maximal load test; and 3) to test the effects of this resistance exercise training on anthropometric, metabolic and cardiovascular parameters in diabetic ovariectomized rats.

We believe that the standardization of the maximal load test on the ladder will be a great advance in this prescription of resistance exercise training for experimental models, making this approach a useful tool for studying the mechanisms underlying the benefits of resistance exercise training in many pathophysiological conditions. Given this, we hypothesized that prescription of resistance exercise training based on 40–60% of the maximal load obtained in maximal load test may promote beneficial effects in diabetic ovariectomized rats.

Methods

Experiments were performed using 24 female old Wistar rats (10 week old) obtained from the Animal Shelter of University of Sao Paulo, Brazil. The rats received standard laboratory chow (Nuvital, Colombo, Brazil) and water *ad libitum*. The animals were housed in individual cages in a temperature-controlled room (22°C) with a 12-h dark-light cycle. 3 experimental groups were used in this study: control (C, $n=8$), diabetic ovariectomized sedentary (DOS, $n=8$) and trained (DOT, $n=8$). All rats were treated similarly in terms of daily manipulation. All surgical procedures and protocols were in accordance with the Ethical Standards in Sport and Exercise Science Research [15] and the International Animal Care and Use Committee, and were

approved by University of Sao Paulo Ethical Committee (protocol number 0984/08).

Ovariectomy

At 10-weeks old, animals were anesthetized (80 mg/kg ketamine and 12 mg/kg xylazine), the oviduct was sectioned and the ovary removed as described in detail elsewhere [13, 17, 43]. Data from our laboratory have demonstrated that the estrogen concentration, measured by immunoassay, was 39 ± 7 pg/ml in healthy female rats. However, in the present study estrogen concentration was non-detectable in all ovariectomized groups, confirming ovarian hormone deprivation [13].

Diabetes

Animals were made diabetic by a single injection of STZ (50 mg/kg IV; Sigma Chemical Co) dissolved in citrate buffer (pH 4.5) after 6 h of fasting [43].

Glycemia

Blood samples (50 μ L) were collected to measure glycemia 72 h after STZ injection and at the end of the protocol with a Gluco test (Advantage, Roche Laboratories) [2, 38, 43].

Maximal load test

To standardize the maximal load test, a ladder adapted for rats was used (see Fig. 1). The ladder has 54 vertical steps with a distance of 0.5 cm between each and a small rat cage at the top, which is covered with a cloth to promote a dark environment for the animal rest between the climbs. The weights used as load were mounted with fishing weights, and were attached to the base of the rat tail. Based on our previous experience with aerobic exercise training on treadmill, the animals were gradually adapted to the act of climbing for 5 consecutive days before the actual maximal load test. The test consisted of an initial load of 75% of body weight, which was progressively increased by an additional 15% of body weight in the subsequent climbs. A drop of blood was collected from the rat tail after each load for lactate measurements (Accutrend Plus, Roche Diagnostics) to obtain the lactate threshold.

Resistance exercise training

The resistance exercise training protocol was performed over 8 weeks, 5 days a week based on the aerobic exercise training protocol employed by our group in recent years [12, 13, 17, 39, 43] and at moderate intensity (40–60% of the maximal load) as recommend for diabetic or diseased patients [40, 48].

Cardiovascular measurements

At the end of the resistance exercise training protocol, rats were anesthetized with ketamine (80 mg/kg) and xylazine (12 mg/kg), and a polyethylene-tipped Tygon cannula filled with heparinized saline was implanted into the carotid artery for direct measurements of AP. During experiments, rats received food and water *ad libitum*; they remained conscious in their cages and were allowed to move freely during the hemodynamic experiments. The arterial cannula was connected to a transducer (Blood Pressure XDCR, Kent® Scientific), and blood pressure signals were recorded for a 30-min period using a microcomputer equipped with an analog-to-digital converter (CODAS, 2Kz, DATAQ Instruments). The recorded data were analyzed on a beat-to-beat basis to quantify changes in mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) [2, 13, 17, 39, 43].

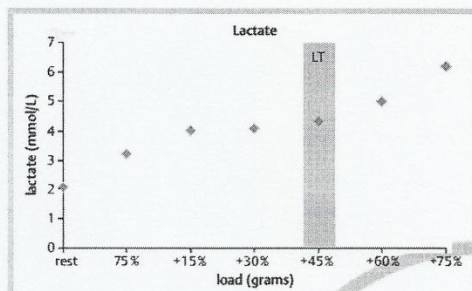


Fig. 2 Lactate concentrations after each climb in maximal load test (LT: lactate threshold).

Tissue weight

After cardiovascular measurements, the animals were killed by decapitation, and the left ventricle, soleus and plantar muscles were immediately removed and weighed.

Statistical analysis

Data are expressed as means $\pm$ SEM. The Levene Test was used to evaluate data homogeneity. One-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test were used to compare groups. Significance level was established at $p < 0.05$.

Results

Maximal Load Test

In the first climb, the applied load was 75% of animal body weight, ensuring uniformity in the overload test. After completing the first climb, a 2-min resting period preceded the next climb. For this next climb, the load was increased by another 15% of body weight. This increment was repeated successively until the animal could not complete the climb bearing the load. For determination of maximal load, it was assumed that animals should complete a maximum of 6 climbs to avoid fatigue due to excessive number of climbs.

Fig. 2 shows the blood lactate concentration during the maximal load test. The lactate concentration was almost constant in the fourth initial loads (75% of the body weight, +15%, +30%, +45% of the body weight). However, it markedly increased in the fifth load (+60% of the body weight), indicating a transition from a predominantly aerobic metabolism to a predominantly anaerobic metabolism, which is characteristic of lactate threshold (LT, gray bar in Fig. 2).

Given the body weight variations between animals or groups, the normalized maximum load was calculated using the formula:

$$\text{Normalized Maximal Load} = \left(\frac{\text{load of the last complete climb}}{\text{body weight}} \right) \times 100$$

The maximal load test was performed at the beginning (1st week), 4th week and at the end (8th week) of protocol in all groups, for load adjustment and assessing the effect of exercise training. In the 1st week, the maximal load in control rats was $128 \pm 5.9\%$ of the body weight. The maximal load progressively increased in the 4th and 8th week ($181 \pm 3.7\%$ and $203 \pm 11.4\%$ of the body weight, respectively) in C rats. Importantly, to maintain

the standard of 6 climbs for maximal load, load increment was adjusted in the maximal load test performed on the 4th and 8th weeks of the protocol, with +25% and +40% of the body weight increments between climbs, respectively.

Resistance exercise training prescription

The prescription of resistance exercise training was performed using the normalized value of maximal load for each rat, and was adjusted weekly, according to body weight of the animal.

The resistance exercise training protocol was performed over 8 weeks, 5 days a week, at moderate intensity (40–60% of the normalized maximal load), with 15 climbs per session and a 1-min time interval between climbs.

After the intermediate test (4th week), prescription was adjusted according to the new values obtained in the maximal load test. The number of climbs and the percentage of intensities for each day of the training protocol are described in Table 1.

Effects of resistance exercise training in diabetic ovariectomized rats

At the end of the protocol, the diabetic rats (DOS and DOT) presented reduced body weight when compared to the control group (C). All STZ-injected rats presented severe hyperglycemia compared to controls. Diabetic ovariectomized rats had higher glycemia at the end of the protocol compared to their initial values (Table 2).

The maximal load in absolute and normalized values was also reduced in DOS as compared to C rats (Table 2, Fig. 3), accompanied by reduced left ventricular (14%), plantar (36%) and soleus muscles (11%) mass (Fig. 4).

Animals subjected to exercise training (DOT) had an increase in the maximal load compared to sedentary groups (C and DOS) in the 4th week of training and at the end of resistance exercise training protocol (Table 2; Fig. 3). Although there were no significant changes in body weight, left ventricular and soleus mass and glycemia, resistance exercise training increased plantar muscle mass when compared to the other studied groups (41% vs. C and 77% vs. DOS) (Fig. 4).

As can be seen in Fig. 5, the DOS group presented lower MAP and HR than the C group. The resistance exercise training applied to diabetic ovariectomized rats attenuated these changes (Fig. 5).

Discussion

The effects of aerobic exercise training have been extensively investigated in various physiological (aging, menopause) and pathological conditions (diabetes, hypertension). In recent years, however, the scientific community has turned its attention to the effects of resistance exercise training, as this is an affordable, easily accessible type of training, particularly for people attending gyms or a community-based health exercise program. Unlike aerobic exercise training, the prescription of resistance exercise training takes into account the modulation of several parameters such as number of repetitions, the amount of sets, the load intensity, and time interval between series [24]. The possible combinations of these variables alter the acute and chronic physiological effects of resistance exercise, and this fact makes it more difficult to use this type of exercise for people at risk. However, international guidelines have suggested resistance exercise training as an important non-pharmacological measure for

Table 1 Prescription details of the resistance exercise training.

1 st week			2 nd week			3 rd week			4 th week			5 th week			6 th week			7 th week			8 th week		
Number of climbs*	% of maximal intensity	Number of climbs*	Number of climbs*	% of maximal intensity	Number of climbs*	Number of climbs*	% of maximal intensity	Number of climbs*	Number of climbs*	% of maximal intensity	Number of climbs*	Number of climbs*	% of maximal intensity	Number of climbs*	Number of climbs*	% of maximal intensity	Number of climbs*	Number of climbs*	% of maximal intensity	Number of climbs*	Number of climbs*	% of maximal intensity	
2	0	1	0	0	2	2	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	2	2	0	1	1	0	
3	20%	1	20%	1	1	1	20%	1	1	20%	1	1	20%	1	1	30%	2	2	40%	2	2	40%	
2	30%	4	30%	2	2	2	30%	1	1	30%	2	2	30%	2	2	40%	3	3	50%	4	4	50%	
2	40%	3	40%	2	2	2	40%	2	2	40%	2	2	40%	2	2	50%	3	3	60%	5	5	60%	
2	30%	4	30%	2	2	1	50%	2	2	50%	2	3	50%	2	3	60%	3	3	50%	2	2	50%	
2	20%	1	20%	2	2	2	40%	2	2	40%	2	2	40%	3	3	50%	1	1	40%	1	1	40%	
2	0	1	0	0	2	2	30%	2	2	30%	2	2	30%	1	1	40%	1	1	0	1	1	0	
					2	2	20%	1	1	20%	1	1	20%	1	1	30%							

* 1 min time interval between climbs

Table 2 Body weight, glycemia and maximal load represented by percentage of body weight in control (C), diabetic ovariectomized sedentary (DOS) and trained (DOT) groups.

Groups	C	DOS	DOT
Measurements			
body weight (grams)			
initial	218 ± 4	218 ± 5	220 ± 3
final	260 ± 10†	215 ± 6*	212 ± 3*
glycemia (mg/dL)			
initial	89 ± 2	412 ± 26*	428 ± 27*
final	102 ± 5	484 ± 15*†	469 ± 24*†
maximal load (% of body weight)			
initial (1 st week)	128 ± 6	125 ± 4	133 ± 2
intermediate (4 th week)	181 ± 4†	164 ± 5*†	191 ± 7*#†
final (8 th week)	203 ± 11††	179 ± 11*††	288 ± 8*#††

Data are reported as mean ± SEM. *p < 0.05 vs. C, #p < 0.05 vs. DOS, †p < 0.05 vs. initial values in the same group, ††p < 0.05 vs. intermediate values in the same group

preventing or attenuating various risk factors for cardiovascular and metabolic diseases [33,47,48].

In this sense, basic research seeks to elucidate the mechanisms underlying the effects of resistance training on cardiometabolic risk factors, especially in situations where the study thereof would be not feasible in humans for ethical or practical reasons. In fact, the number of studies investigating the effects of this modality in experimental models has steadily risen in recent years [1,26,31,32]. However, training prescription usually has been not based on individual parameters of exercise capacity, but on older protocols that calculate the training load based on the percentage of body weight of the animal studied. This study thus aimed to standardize a maximal test load on ladder to rats and, based on values obtained in this test, to prescribe and test a protocol of resistance exercise training for diabetic ovariectomized rats.

Our group has extensively investigated the effects of aerobic exercise training in rat and mice models of disease and has demonstrated the correlation between maximal oxygen consumption ($\dot{V}O_{2max}$) and the maximal intensity of running in the treadmill test, which we have been using to prescribe treadmill running exercise protocols [36]. With this in mind, we developed a maximal load test that follows the same principles of the maximal treadmill test. The maximum load test begins with a climb with a load of 75% of rat body weight, ensuring that the intensity of exercise is the same for all animals. After a rest period of 2 min, we increase the intensity of the test by adding a load weight to the rat tail (+15% of the body weight). Importantly, the test should not exceed 6 climbs, since an excessive number of climbs may lead to animal fatigue.

In this respect, it is worth stressing that depending on age, weight, pathology associated, or overall fitness of the animal, the load increment should probably be adjusted to ensure that no more than a 6-load increase is performed. In line with this, and to maintain the standard of 6 climbs for maximal load, the load increment in our study was adjusted for the maximal load test performed at the 4th and 8th weeks of the protocol in all experimental groups, with increments between climbs of +25% and +40% of the body weight, respectively. This adjustment was probably necessary due to the growth of animals and, consequently, the gain of muscle mass that resulted in a natural increase in muscle strength. Likewise, aging induces a reduction in strength [30], and a pilot study (data not shown) undertaken by our group has demonstrated that aged female rats were unable to perform the climbs with the +15% of body weight increment (proposed in the initial maximum load

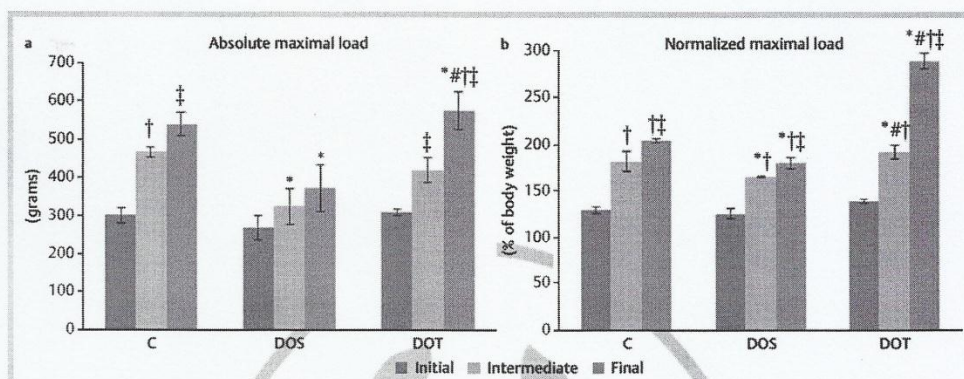


Fig. 3 Maximal load expressed in a absolute and b normalized values in control (C), diabetic ovariectomized sedentary (DOS) and trained (DOT) groups. * $p < 0.05$ vs. C, # $p < 0.05$ vs. DOS, † $p < 0.05$ vs. initial values in the same group, ‡ $p < 0.05$ vs. intermediate values in the same group.

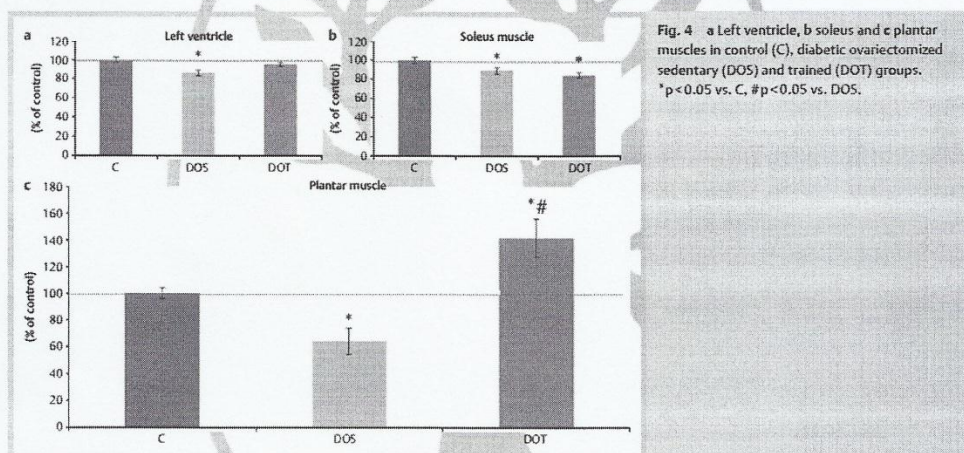


Fig. 4 a Left ventricle, b soleus and c plantar muscles in control (C), diabetic ovariectomized sedentary (DOS) and trained (DOT) groups. * $p < 0.05$ vs. C, # $p < 0.05$ vs. DOS.

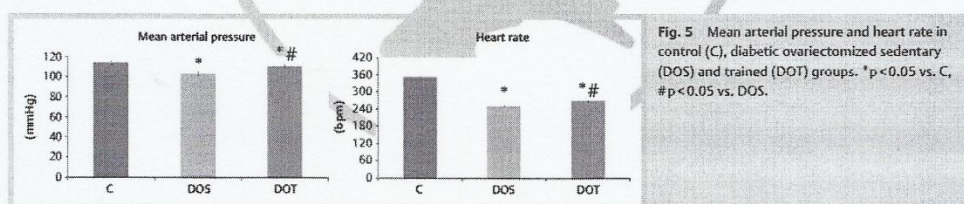


Fig. 5 Mean arterial pressure and heart rate in control (C), diabetic ovariectomized sedentary (DOS) and trained (DOT) groups. * $p < 0.05$ vs. C, # $p < 0.05$ vs. DOS.

test in this study), making it necessary to limit this increment to +10% of the body weight.

In the present study, we were able to demonstrate that the animals performing the standardized and applied maximal load test achieved loads above the LT, demonstrating a reduced maximal load in diabetic sedentary ovariectomized rats and an increase in this parameter after resistance training as previous observed in clinical study in type 2 diabetic patients [16].

Resistance exercise training prescription was based on the intensity between 40–60% obtained in the maximal load test. Considering that the effects of resistance training are not as well understood as those of the aerobic training, and that the animals used in this study had a number of diabetes-related complications, the intensity of exercise training was calculated according to the intensity proposed by Williams et al. [48] for people with cardiovascular risk factors (60% of maximal load).

Training & Testing

Many experiments were designed to assess the beneficial or detrimental impact of aerobic exercise in animals with certain primary disease conditions, such as hypertension, heart failure, obesity, diabetes and neuromuscular disease [5,8,9,12,13,17,25,32,38,41,43,50]. In this regard, the choice of the resistance exercise training protocol on ladder in the present study was based on animal welfare advantages, avoiding discomfort, distress and pain as approved by animal welfare committees/guidelines [15,25,50]. Specifically, this is a voluntary exercise protocol, with no aversive (electrical) stimuli to maintain performance, no restraint and no use of food or water as motivators. Importantly, using water or food as motivators and imposing restriction paradigms in association with exercise can exacerbate physiological impairments. For example, diabetic animals may become dehydrated if water availability is restricted during exercise [25]. Additionally, appropriate attention to adaptation of the animal to the training situation was applied during the adaptation, maximal test and training periods, to allow gradual conditioning of the animal to develop stamina and to facilitate close observation of the animal during the exercise period. Over an 8-week period, the animals performed 15 climbs per day (5 days per week), with 1 min rest between each climb. At the end of fourth week of training, the maximal load test was repeated so that adjustments in training intensity were performed. At the end of the protocol, the maximal load test was performed again to compare the performance between the groups. The trained diabetic ovariectomized animals (DOT) actually had a higher maximal load capacity than the sedentary (C and DOS), thus showing the effect of the resistance exercise training protocol prescribed and confirming the effectiveness of the utilization of the maximal load test for prescription. Additionally, the moderate-intensity resistance exercise training protocol used in the present study induced an attenuation of diabetic myopathy, as demonstrated by an increase in the plantar muscle mass in trained STZ-rats (89% vs. DOS and 41% vs. C). This change may be muscle-fiber type specific, since this improvement was only observed in plantar muscle (predominance of type II fibers) and not in soleus muscle (predominance of type I fibers) in our study [14].

It is important to emphasize that diabetes mellitus is one of the most critical world health problems, since sufferers are particularly prone to cardiovascular diseases [19,35,46]. Cardiovascular autonomic neuropathy is a frequent complication of diabetes mellitus and it is associated with high morbidity and mortality in symptomatic patients [10,20]. This condition affects the autonomic modulation of the sinus node, thus reducing heart rate variability [11].

Experimental diabetes induced by streptozotocin (STZ) is characterized by degenerative changes in autonomic neurons, observed from 3 days [29] to several weeks after STZ administration in rats [6]. STZ destroys pancreatic β cells, resulting in diabetic syndrome in animals, hyperglycemia, hypoinsulinemia, glycosuria and weight loss [3,8,21,45]. In the present study glycemia remained unaltered after resistance training, probably because our diabetes model is more closely linked to type I diabetes, in which no changes were observed after training in experimental or clinical studies [8,34,43].

Moreover, the STZ-diabetic rat showed hypotension and bradycardia [8,18]. The mechanisms underlying these alterations are yet to be fully understood. Some investigators have associated hypotension and bradycardia with reductions in intrinsic heart rate, in vagal tone and in cardiovascular reflex control [4,8,27,28].

In the present study, the diabetic ovariectomized rats showed reduced body weight, hypotension and bradycardia. However, the major finding of this investigation is that prescription of moderate intensity resistance exercise training based on the maximal load test improves diabetes-induced hemodynamic dysfunction. The resistance exercise training attenuated the changes in arterial pressure after ovarian hormone deprivation in diabetic rats. In a previous study conducted by our group, the hypotension presented by sedentary diabetic rats was not observed in aerobically trained diabetic animals (11 weeks of training on a treadmill) [8]. This improvement could be related to an increase in cardiac output in diabetic rats [8,9] due to attenuation of bradycardia or cardiac dysfunction [8,43].

While reduced heart rate in sedentary diabetic rats has been attributed to changes in the sinoatrial node [4,8,28,43], functional changes in the cholinergic mechanism cannot be ruled out as a causal factor. In the present study, we observed an increase in resting heart rate in trained diabetic ovariectomized rats. Similarly, in male STZ-induced diabetes rats or in diabetic ovariectomized rats, aerobic exercise training also induced an increase in resting bradycardia, and this effect most likely resulted from a training-induced increase in intrinsic heart rate [8,43].

Finally, it is important to remember that most guidelines recommend using resistance training to complement aerobic training due to its recognized osteomuscular effects. In this sense, the present resistance exercise training protocol described in this paper can be applied to elucidate the effects of resistance training in different models of disease, allowing us to understand the mechanism involved in its risk/benefits at moderate intensity, as used in the present work and recommended by guidelines, or in other intensities of training (based on the standardized maximal load test). This in turn would contribute to clarifying the postulated risk/benefit associated with this type of training.

Conclusion

▼

The results of the present study may provide a useful method for determining the maximal load in rats and applying resistance training in rats. We believe that these 2 tools can be used for different experimental approaches, enabling accurate prescription of resistance exercise training, helping to clarify the adaptive mechanisms of this type of training in experimental models. This study showed that resistance exercise training may delay and attenuate the hemodynamic dysfunction observed in diabetic ovariectomized rats, and should be considered in the prevention and treatment of this disease.

However, a fuller understanding of the mechanisms underlying training-induced improvements in hemodynamic parameters (arterial pressure and heart rate) in streptozotocin-diabetic ovariectomized rats requires further research.

Acknowledgements

▼

This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PROSUP) and São Paulo Research Foundation (FAPESP: 2012/20141-5, 2007/57595-5, 2007/52419-4) and CNPq (563961/2010-4, 479766/2011-8). K. De Angelis and M. C. Irigoyen are the recipients of CNPq-BPQ fellowships.

Conflict of interest: The authors declare that there are no conflicts of interest, financial or otherwise.

References

- Barauna VG, Rosa KT, Irigoyen MC, Oliveira EM. Effects of resistance training on ventricular function and hypertrophy in a rat model. *Clin Med Res* 2007; 2: 114–120
- Brito JO, Ponciano K, Figueroa D, Bernardes N, Sanches IC, Irigoyen MC, De Angelis K. Parasympathetic dysfunction is associated with insulin resistance in fructose-fed female rats. *Braz J Med Biol Res* 2008; 41: 804–808
- Cohen AJ, McCarthy DM, Rossetti RR. Renin secretion by the spontaneously diabetic rat. *Diabetes* 1986; 35: 341–346
- Dall'Ago P, Fernandes TG, Machado UF, Belló AA, Irigoyen MC. Baroreflex and chemoreflex dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Braz J Med Biol Res* 1997; 30: 119–124
- De Angelis Lobo D'Avila K, Gadonski G, Fang J, Dall'Ago P, Albuquerque VL, Peixoto LR, Fernandes TG, Irigoyen MC. Exercise reverses peripheral insulin resistance in trained L-NAME-hypertensive rats. *Hypertension* 1999; 34: 768–772
- De Angelis K, Schaan BD, Maeda CY, Dall'Ago P, Wichi RB, Irigoyen MC. Cardiovascular control in experimental diabetes. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35: 1091–1100
- De Angelis KL, Oliveira AR, Werner A, Bock P, Bello-Klein A, Fernandes TG, Belló AA, Irigoyen MC. Exercise training in aging: hemodynamic, metabolic, and oxidative stress evaluations. *Hypertension* 1997; 30: 767–771
- De Angelis KLD, Oliveira AR, Dall'Ago P, Peixoto LRA, Gadonski G, Fernandes TG, Irigoyen MC. Effects of exercise training in autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33: 635–641
- De Bileux PM, Barbee RW, McDonough KH, Shepherd RE. Exercise training improves cardiac performance in diabetic rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993; 203: 209–213
- Ewing D, Campbell I, Clarke B. The natural history of diabetic autonomic neuropathy. *Q J Med* 1980; 49: 95–108
- Fazan R, Ballojo G, Salgado MC, Moraes M, Salgado HC. Heart rate variability and baroreceptor function in chronic diabetic rats. *Hypertension* 1997; 30: 632–635
- Flores LJ, Figueroa D, Sanches IC, Jorge L, Irigoyen MC, Rodrigues B, De Angelis K. Effects of exercise training on autonomic dysfunction management in an experimental model of menopause and myocardial infarction. *Menopause* 2010; 17: 712–717
- Flues K, Paulini J, Brito S, Sanches IC, Consolim-Colombo F, Irigoyen MC, De Angelis K. Exercise training associated with estrogen therapy induced cardiovascular benefits after ovarian hormones deprivation. *Maturitas* 2010; 65: 267–271
- Fry AC. The role of resistance exercise intensity on muscle fibre adaptations. *Sports Med* 2004; 34: 663–679
- Harriss DJ, Atkinson G. Update – ethical standards in sport and exercise science research. *Int J Sports Med* 2011; 32: 819–821
- Ibañez F, Izquierdo M, Argüelles I, Forga L, Larrión JL, García-Unciti M, Idoate F, Gorostiza EM. Twice-weekly progressive resistance training decreases abdominal fat and improves insulin sensitivity in older men with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2005; 28: 662–667
- Irigoyen MC, Paulini J, Flores LJF, Flues K, Bertagnoli M, Moreira ED, Consolim-Colombo F, Belló-Klein A, De Angelis K. Exercise training improves baroreflex sensitivity associated with oxidative stress reduction in ovariectomized rats. *Hypertension* 2005; 46: 998–1003
- Jackson CV, Carrier GO. Influence of short-term experimental diabetes on blood pressure and heart rate in response to norepinephrine and angiotensin II in the conscious rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 1983; 5: 260–265
- Jarret RJ. Cardiovascular disease and hypertension in diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 1989; 5: 547–558
- Jermendy G. Clinical consequences of cardiovascular autonomic neuropathy in diabetic patients. *Acta Diabetol* 2003; 40: S370–S374
- Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 1969; 48: 2129–2139
- Kannel WB. Metabolic risk factors for coronary heart disease in women: perspectives from the Framingham study. *Am Heart J* 1987; 114: 413–429
- Kaseta JR, Skafar DF, Ram JL, Jacober SJ, Sowers JR. Cardiovascular disease in the diabetic woman. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1835–1838
- Kraemer WJ, Rasmussen NA. Fundamentals of resistance training: progression and exercise prescription. *Med Sci Sports Exerc* 2004; 36: 674–688
- Kregel KC, Allen DL, Booth FW, Flesher MR, Henriksen EJ, Musch TI, O'Leary DS, Parks CM, Poole DC, Raanan AW, Sheriff DD, Sturek MS, Toth LA. Resource book for the design of animal exercise protocols. American Physiological Society 2006
- Krisan AD, Collins DE, Crain AM, Kwong CC, Singh MK, Bernard JR, Yaspelkis BB III. Resistance training enhances components of the insulin signaling cascade in normal and high-fat-fed rodents skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2004; 96: 1691–1700
- Maeda CY, Fernandes TG, Lulhier F, Irigoyen MC. Streptozotocin diabetes modifies arterial pressure and baroreflex sensitivity in rats. *Braz J Med Biol Res* 1995; 28: 497–501
- Maeda CY, Fernandes TG, Timm HB, Irigoyen MC. Autonomic dysfunction in short-term experimental diabetes. *Hypertension* 1995; 26: 1000–1004
- Monckton G, Pehowich E. Autonomic neuropathy in the streptozotocin diabetic rat. *Can J Neurol Sci* 1980; 7: 135–142
- Narici MV, Maffulli N. Sarcopenia: characteristics, mechanisms and functional significance. *Br Med Bull* 2010; 95: 139–159
- Nilsson MI, Greene NP, Dobson JP, Wiggs MP, Gasier HG, Macias BR, Shimkus KL, Fluckey JD. Insulin resistance syndrome blunts the mitochondrial anabolic response following resistance exercise. *Am J Physiol* 2010; 299: E466–E474
- Pereira GB, Prestes J, Leite RD, Magosso RF, Peixoto FS, Marqueti RdeC, Shigemoto GE, Selstrev-de-Araújo HS, Baldissera V, Perez SE. Effects of ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in rat calcaneal tendon. *Connect Tissue Res* 2010; 51: 459–466
- Pollock ML, Franklin BA, Balady GJ, Chaitman BI, Fleg JL, Limacher M, Piña IL, Stein RA, Williams M, Bazzarre T. Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease. *Circulation* 2000; 101: 828–833
- Ramallo AC, Lima ML, Nunes F, Cambui Z, Barbosa C, Andrade A, Viana A, Martins M, Abrantes V, Aragão C, Temístocles M. The effect of resistance versus aerobic training on metabolic control in patients with type-1 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2006; 72: 271–276
- Resnick HE, Howard BV. Diabetes and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 2002; 53: 245–267
- Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda CT, Heeren MV, Irigoyen MC, De Angelis K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol* 2007; 6: 38
- Samsioe G. Cardiovascular disease in postmenopausal women. *Maturitas* 1998; 30: 11–18
- Sanches IC, Brito JO, Candido GO, Dias DS, Jorge L, Irigoyen MC, De Angelis K. Cardiometabolic benefits of exercise training in an experimental model of metabolic syndrome and menopause. *Menopause* 2012; 19: 562–568
- Sanches IC, Sartori M, Jorge L, Irigoyen MC, De Angelis K. Tonic and reflex cardiovascular autonomic control in trained-female rats. *Braz J Med Biol Res* 2009; 42: 942–948
- Signal RJ, Kenny CP, Wasserman DH, Castaneda-Sceppa C. Physical activity/exercise and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: 2518–2539
- Silva GJ, Brum PC, Negrão CE, Krieger EM. Acute and chronic effects of exercise on baroreflexes in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1997; 30: 714–719
- Silveira LCR, Tezini GCSV, Schujmann DS, Porto JM, Rossi BRO, Souza HCD. Comparison of the effects of aerobic and resistance training on cardiac autonomic adaptations in ovariectomized rats. *Auton Neurosci* 2011; 162: 35–42
- Souza SBC, Flues K, Paulini J, Mostarda C, Rodrigues B, Souza LE, Irigoyen MC, De Angelis K. Role of exercise training in cardiovascular autonomic dysfunction and mortality in diabetic ovariectomized rats. *Hypertension* 2007; 50: 786–791
- Sowers J. Diabetes mellitus and cardiovascular disease in women. *Arch Intern Med* 1998; 158: 617–621
- Tomlinson KG, Gardiner SM, Hobden RA, Bennett T. Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. *Pharmacol Rev* 1992; 44: 103–150
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27: 1047–1053
- Williams AD, Almond J, Ahuja KD, Beard DC, Robertson IK, Ball MJ. Cardiovascular and metabolic effects of community based resistance training in an older population. *J Sci Med Sport* 2011; 14: 331–337
- Williams MA, Haskell WL, Ades PA, Amsterdam EA, Bittner V, Franklin BA, Gulanick M, Laing ST, Stewart KJ. Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease: 2007 update. *Circulation* 2007; 116: 572–584
- Wise FM, Patrick JM. Resistance exercise in cardiac rehabilitation. *Clin Rehabil* 2011; 25: 1059–1065
- Yeates J, Everitt S, Innes JF, Day MJ. Ethical and evidential considerations on the use of novel therapies in veterinary practice. *J Small Anim Pract* 2013; 54: 119–123

Artigo 3 - Em preparação para submissão para a revista *Obesity* - Qualis: A1 (Educação Física)

Título: Treinamento físico combinado melhora perfil inflamatório e de estresse oxidativo em ratas ooforectomizadas com síndrome metabólica: papel do sistema nervoso autônomo.

O objetivo deste artigo foi avaliar os efeitos do treinamento físico combinado em ratas ooforectomizadas hipertensas submetidas à sobrecarga de frutose em parâmetros de função cardiovascular, de regulação autonômica cardiovascular, metabólicos, de capacidade física, de estresse oxidativo, de metabolização de óxido nítrico e de inflamação.

Resultados

Como pode ser observado na Tabela 1, o grupo que realizou o treinamento físico combinado apresentou maior capacidade funcional quando comparado ao grupo controle (C). Além disso, os animais hipertensos (grupos FHO e FHOT) apresentaram maiores valores no teste de carga máxima (TCM) em relação ao grupo controle (C), sendo que os animais treinados (FHOT) foram capazes de atingir maior valor no TCM quando comparado ao grupo FHO. A glicemia sanguínea foi maior nos animais ooforectomizados submetidos à sobrecarga de frutose (grupos FHO e FHOT) em relação ao grupo controle. Os níveis de triglicérides sanguíneos foram maiores no grupo FHO em relação ao grupo C, porém o treinamento físico foi eficaz em normalizar tal parâmetro. A sensibilidade a insulina foi menor no grupo FHO e o treinamento físico foi capaz de aumentar este parâmetro.

O consumo crônico de frutose promoveu taquicardia de repouso no grupo sedentário (FHO), no entanto, o grupo submetido ao treinamento físico combinado apresentou bradicardia de repouso. A pressão arterial sistólica (PAS), diastólica e média foram maiores no grupo FHO (206 ± 4 , 153 ± 2 e 174 ± 4 mmHg, respectivamente) em relação ao grupo C (128 ± 2 , 95 ± 2 e 108 ± 1 mmHg, respectivamente). Contudo, o grupo que realizou o treinamento físico combinado (FHOTc) apresentou redução da PAS (188 ± 5 mmHg), da PAD (134 ± 4 mmHg), assim como da PAM (158 ± 4 mmHg) quando comparado ao grupo FHO. O grupo sedentário submetido a sobrecarga de frutose (FHO) apresentou maior valor da banda de baixa frequência da pressão arterial sistólica (BF-PAS), que é um representante da modulação simpática vascular, em relação ao grupo controle (C), e o treinamento físico combinado foi capaz de normalizar este parâmetro (Figura 1). Além disso, a variância da pressão arterial sistólica também se apresentou maior no FHO ($77,8 \pm 11,9$ mmHg²) em relação ao grupo C ($24,8 \pm 1,4$ mmHg²). Porém, o treinamento

físico combinado também foi eficaz em normalizar esta variável (FHOT: $30,3 \pm 3,8$ mmHg²). A sensibilidade barorreflexa estava reduzida nos animais hipertensos (grupos FHO e FHOT) em relação ao grupo controle (C).

Não foi observada diferença significativa entre os grupos para IL-6. Contudo, o grupo FHO ($65,8 \pm 9,9$ pg/mg de proteína) apresentou maior valor de TNF- α em relação ao grupo C ($23,6 \pm 4,3$ pg/mg de proteína) e o treinamento físico combinado ($33,1 \pm 4,9$ pg/mg de proteína) normalizou tal parâmetro. Já com relação a IL-10, o grupo FHO ($16,2 \pm 2,5$ pg/mg de proteína) apresentou menor valor quando comparado ao grupo C ($32,5 \pm 4,0$ pg/mg de proteína). O razão nitrato/nitrato, NOx, também apresentou-se reduzido no grupo FHO ($0,32 \pm 0,20$) em relação ao grupo C ($1,10 \pm 0,15$). Não foi observada diferença entre o grupo C e o grupo FHOT para o NOx (Figura 2).

Com relação as medidas de estresse oxidativo, o grupo submetido ao consumo crônico de frutose apresentou maior dano à membrana celular, evidenciado pela técnica de quimiluminescência, em relação ao grupo controle (C). Por outro lado, o treinamento físico combinado foi eficaz em reverter tal prejuízo. Ambos grupos hipertensos apresentaram maior dano à proteína medida pela técnica de carbonilas quando comparados ao grupo C. Já, em relação as enzimas antioxidantes, o grupo FHO apresentou menor concentração da catalase (CAT) quando comparado ao grupo C e o treinamento físico foi capaz de aumentar estes valores. A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi maior no grupo que realizou o treinamento físico combinado em relação a ambos grupos sedentários. A atividade da glutathione peroxidase (GPx) apresentou-se maior nos grupos hipertensos quando comparado ao grupo C. A GPx foi ainda maior no grupo que realizou o treinamento físico combinado em relação ao grupo FHO (Tabela 2). Já com relação a razão GSH/GSSG, que representa o balanço redox da glutathione, o grupo

treinado (FHOT: $11,94 \pm 1,1$) apresentou maior valor quando comparado ao grupo FHO ($8,24 \pm 0,6$) (Figura 2).

TABELAS

TABELA 1. Capacidade física e avaliações metabólicas nos grupos estudados

	C	FHO	FHOT
Teste Máximo Aeróbio (min)	18±1,5	19±1,0	22±0,3†
Teste Máximo Resistido (g)	204±11	467±19†	523±11†¥
Tecido Adiposo (g)	5,22±0,33	5,25±0,39	3,59±0,05†¥
Glicemia (mg/dL)	75±1,2	92±2,1†	98±2,1†¥
Triglicérides (mg/dL)	125±7,7	160±8,0†	137±4,7¥
KITT (%/min)	4,42±0,29	3,4±0,28†	4,69±0,34¥

Os dados são apresentados em média±erro padrão da média. C: grupo controle; FHO: grupo ooforectomizado hipertenso submetido ao consumo de frutose; FHOT: grupo ooforectomizado hipertenso submetido ao consumo de frutose e ao treinamento físico combinado. KITT: constante de decaimento da glicose plasmática durante o teste de tolerância à insulina. †p<0,05 vs. C; ¥ p<0,05 vs. FHO.

TABELA 2. Estresse oxidativo nos grupos estudados.

	C	FHO	FHOT
Quimiluminescência (cps/mg proteína)	2666±358	15043±1333†	1184±357¥
Carbonilas (nmol/mg proteína)	3,00±0,23	5,22±0,67†	6,03±0,44†
Catalase (nmol/mg proteína)	0,84±0,04	0,63±0,05†	0,78±0,05¥
Superóxido dismutase (USOD/mg proteína)	16,21±1,1	13,05±0,86	26,82±1,96†¥
Glutationa peroxidase (nmol/min/mg proteína)	41,84±4,36	76,23±9,20†	92,00±7,11†¥

Os dados são apresentados em média±erro padrão da média. C: grupo controle; FHO: grupo ooforectomizado hipertenso submetido ao consumo de frutose; FHOT: grupo ooforectomizado hipertenso submetido ao consumo de frutose e ao treinamento físico combinado. † p<0,05 vs. C; ¥ p<0,05 vs. FHO

Figura 1

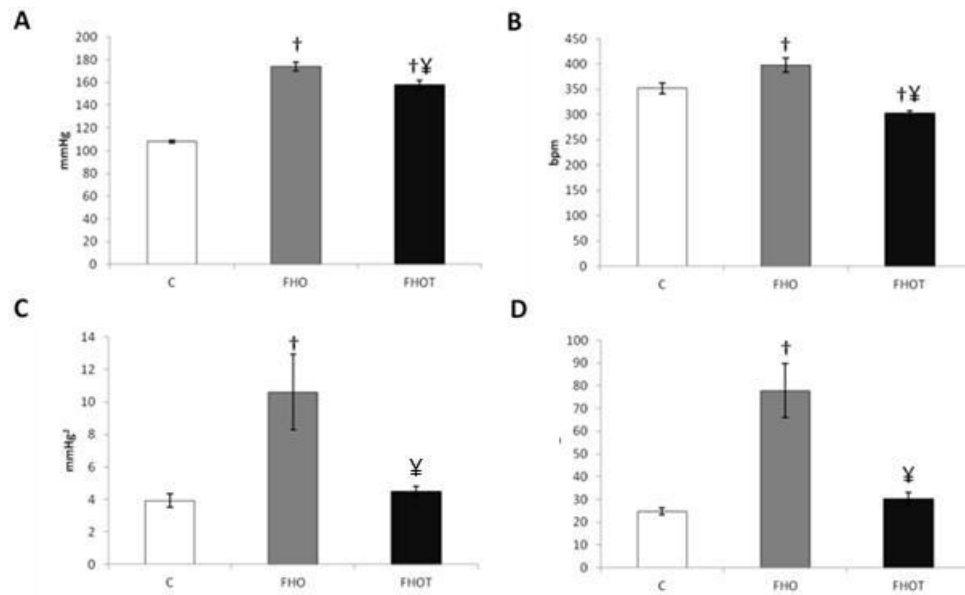


Figura 1. A) Pressão Arterial Média; B) Frequência Cardíaca; C) Banda de Baixa Frequência da Pressão Arterial Sistólica; D) Variância da Pressão Arterial Sistólica nos grupos estudados. C: grupo controle; FHO: grupo ooforectomizado hipertenso submetido ao consumo de frutose; FHOT: grupo ooforectomizado hipertenso submetido ao consumo de frutose e ao treinamento físico combinado. † $p < 0,05$ vs. C; ¥ $p < 0,05$ vs. FHO.

Figura 2

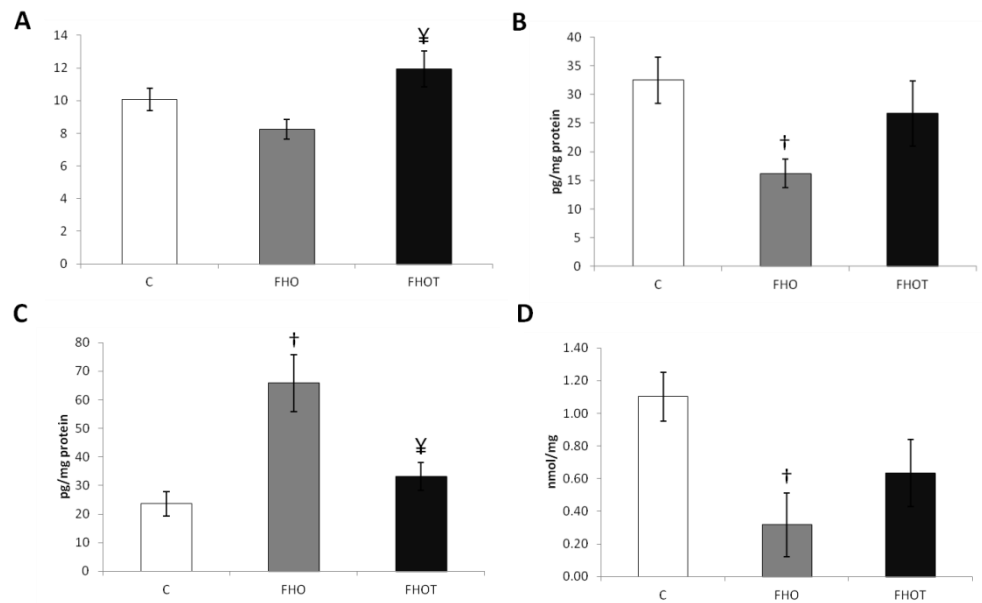


Figura 2. A) Glutathione Reduzida/Glutathione Oxidada (GSH/GSSG); B) Interleucina-10 (IL-10); C) Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α); D) Razão NOx nos grupos estudados. C: grupo controle; FHO: grupo ooforectomizado hipertenso submetido ao consumo de frutose; FHOT: grupo ooforectomizado hipertenso submetido ao consumo de frutose e ao treinamento físico combinado. † $p < 0,05$ vs. C; ¥ $p < 0,05$ vs. FHO.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os objetivos do presente estudo foram avaliar os efeitos do consumo crônico de frutose em ratas hipertensas submetidas a privação do hormônio ovarianos; padronizar um teste de carga máxima em escada adaptada para ratos e prescrever um treinamento físico, de intensidade moderada, baseado neste teste; e verificar os efeitos do treinamento físico combinado (aeróbico + resistido) neste modelo experimental.

Os resultados deste estudo demonstraram que a hipertensão isolada promoveu redução do peso corporal, aumento da PA e prejuízo na sensibilidade barorreflexa. Vale ressaltar que tais achados já vêm sendo descrito na literatura e, de fato, este modelo experimental de hipertensão é considerado o melhor para estudar a hipertensão primária ou essencial observadas em humanos (Amaral and Michelini, 2011). O aumento da PA neste modelo está associado a hiperatividade simpática, prejuízo na sensibilidade barorreflexa (Silva et al., 1997; Gava et al., 1995) e atividade do sistema renina angiotensina (Sartori-Valinotti et al., 2008).

De fato, os animais hipertensos apresentaram um prejuízo na sensibilidade dos pressorreceptores. Vale lembrar que os pressorreceptores arteriais são mecanorreceptores sensíveis às deformações da parede vascular responsáveis pelo controle da PA em curto prazo, ou seja, momento a momento (Irigoyen et al., 2003). Além do controle reflexo da atividade autonômica, os pressorreceptores também exercem controle tônico sobre a atividade simpática (inibição) e parassimpática (estimulação). Assim, o comprometimento da função dos pressorreceptores pode atuar como elemento permissivo ao estabelecimento de alterações primárias de outros mecanismos de controle da função cardiovascular, por não modular a atividade simpática e parassimpática adequadamente (Irigoyen et al., 1995).

Somando a isso, a privação dos hormônios ovarianos em ratas SHR, além de induzir um aumento do peso corporal e da PA, promoveu prejuízo na sensibilidade barorreflexa, tanto para respostas bradicáricas, quanto para as respostas taquicárdicas e prejuízo da modulação autonômica cardiovascular (evidenciado por aumento da VAR-PAS). Estudos prévios do nosso grupo também demonstraram que a privação dos hormônios ovarianos induziu aumento de peso e da PA, além de prejuízo na sensibilidade barorreflexa em ratas Wistar saudáveis (Irigoyen et al., 2005; Flues et al., 2010). Vale ressaltar que nas primeiras décadas de vida a mulher apresenta uma maior cardioproteção quando comparado aos homens, evidenciada por uma maior modulação vagal e menor modulação simpática, no entanto, aproximadamente, entre a quinta e sexta década de vida esta maior cardioproteção desaparece (Kuo et al. 1999), período este que coincide com o advento da menopausa, demonstrando, assim, a importância dos hormônios ovarianos no controle cardiovascular.

Já a somatória de fatores de risco (hipertensão + ooforectomia + sobregarga de frutose) promoveu prejuízo adicional não somente na glicemia e na PA, como também nas concentrações sanguíneas de triglicerídeos, na sensibilidade à insulina, na FC, em parâmetros da variabilidade da FC (RMSSD, BF-IP e AF-IP) e da PAS (VAR-PAS e BF-PAS). É importante lembrar que o estudo da variabilidade da frequência cardíaca (FC) e da pressão arterial sistólica (PAS), uma forma de avaliar o controle autonômico, reflete a interação de diversos fatores que, em sua maioria, envolvem uma influência do sistema nervoso autônomo sobre o aparelho cardiovascular (Joaquim et al, 2005). Hoje se sabe que irregularidades nas variabilidades da FC e da PA significam algum tipo de anormalidade, e que a diminuição da variabilidade da FC é um mau prognóstico (Ribeiro & Moraes, 2005). De fato, estudos experimentais e clínicos vêm demonstrando que a disautonomia (disfunções no sistema nervoso autônomo) está presente em

uma série de patologias, tais como a hipertensão arterial, a insuficiência cardíaca, o diabetes mellitus e outras alterações metabólicas (De Angelis et al., 2004b). Somando a isso, estudo recente do nosso grupo, demonstrou que a somatória de fatores de risco (hipertensão + ooforectomia + sobregarga de frutose) induziu prejuízos autonômicos e metabólicos (Sanches et al. 2012), corroborando, assim, com os dados do presente estudo.

Além disso, a somatória de fatores de risco promoveu aumento da lipoperoxidação de membrana e da carbonila (dano a proteína), além de promover redução da catalase associada com aumento da GPx, no entanto, vale lembrar que ambas enzimas competem pelo mesmo substrato (peróxido de hidrogênio), o que torna esperado este resultado. Somando a isso, associação de fatores de risco promoveu prejuízo do índice NOx, sugerindo diminuição da produção e consequentemente da biodisponibilidade de óxido nítrico, o que pode estar associado a maior lipoperoxidação de membrana.

Com relação aos marcadores inflamatórios, a associação de fatores de risco levou a um aumento do TNF- α e redução da IL-10. Corroborando com os dados do presente estudo, Renna et al. (2013) evidenciaram que o consumo crônico de frutose em ratos machos SHR induziu dano à membrana celular e aumentou o TNF-alfa.

No presente estudo, a padronização do teste de carga máxima possibilitou a avaliação da capacidade física (força) dos animais, bem como serviu de base para a prescrição e ajuste de carga no treinamento combinado.

Neste aspecto vale destacar que o treinamento físico vem ganhado um papel importante na prevenção e/ou tratamentos destas disfunções. Contudo, vale lembrar que grande parte dos estudos realizaram o treinamento físico aeróbio, ficando a dúvida de quais seriam os efeitos do treinamento resistido isoladamente ou em complemento ao aeróbio frente a somatória de fatores

de risco. No entanto, diferentemente do treinamento aeróbio, a prescrição do treinamento resistido permite a modulação de vários parâmetros, como número de repetições, quantidade de séries, intensidade da carga, e tempo de intervalo entre uma série e outra (Kraemer et al., 2004). As possíveis combinações dessas variáveis alteram os efeitos fisiológicos agudos e crônicos do treinamento resistido, dificultando o uso desse tipo de exercício para populações de risco.

Entretanto, diretrizes internacionais têm sugerido cada vez mais o treinamento físico resistido em associação com o treinamento físico aeróbio, ou seja, o treinamento físico combinado como uma importante conduta não farmacológica na prevenção e/ou atenuação de vários fatores de risco para doenças metabólicas e cardiovasculares (Pollock et al., 2000; Williams et al., 2007; Williams et al., 2011).

De fato, no presente estudo o treinamento físico combinado aumentou a capacidade física destes animais (evidenciada por maior tempo de corrida na esteira e maior carga suportada na escada), promoveu redução da PA associada a redução da VAR-PAS e da BF-PAS (representantes simpático vascular), bradicardia de repouso, normalização dos níveis de triglicérides e melhora da sensibilidade à insulina. Tais benefícios promovidos pelo treinamento físico já vem sendo demonstrados pelo nosso grupo após treinamento físico aeróbio (Irigoyen et al., 2005; Flues et al., 2010; Sanches et al., 2012).

Com relação aos marcadores inflamatórios, o TNF- α , que estava aumentado no grupo HFO, apresentou-se reduzido nos animais submetidos ao treinamento físico combinado. Além disso, o treinamento físico combinado foi eficaz em aumentar os valores de IL-10, melhorando assim, pelo menos em parte, o perfil inflamatório, o que pode também estar associado a melhora da sensibilidade a insulina nos animais treinados, pois a IL-10 exerce um papel fundamental no metabolismo da glicose (Pedersen et al., 2007 e 2001). Somando a isso, também foi observado uma

melhora na metabolização do óxido nítrico, sugerindo maior biodisponibilidade de NO, o que pode ter contribuído para a redução da PA no grupo treinado.

Já em relação ao perfil oxidativo, os animais submetidos ao treinamento físico combinado apresentaram redução da lipoperoxidação de membrana, aumento das enzimas antioxidante CAT e SOD. Além disso, o balanço redox da glutathiona (GSH/GSSG) que estava reduzido no grupo hipertenso ooforectomizado submetido a sobrecarga de frutose, evidenciando maior estresse oxidativo neste grupo, apresentou-se aumentado nos animais treinados, normalizando tal parâmetro.

Em conjunto, os dados do presente estudo sugerem que a redução da modulação simpática pós treinamento físico combinado pode ter influenciado positivamente parâmetros hemodinâmicos, de inflamação e estresse oxidativo em um modelo experimental de síndrome metabólica e menopausa. De fato, existem evidências que o sistema nervoso autônomo esteja envolvido na gênese das disfunções cardiometabólicas gerando alterações no perfil inflamatório e de estresse oxidativo (Thiyagarajan et al., 2012; Pavlov & Tracey 2012; Van Gall et al., 2006).

Dessa forma, os resultados do presente estudo demonstram que a associação de fatores de risco promoveu prejuízos adicionais em parâmetros metabólicos, cardiovasculares, autonômicos, de estresse oxidativo, de inflamação e de metabolização de óxido nítrico, e que o treinamento físico combinado foi eficaz em atenuar e/ou normalizar tais disfunções. Esses dados sugerem que o treinamento físico combinado (aeróbio + resistido) pode ser utilizado como uma abordagem não-farmacológica na prevenção e/ou tratamento de fatores de riscos em mulheres pós-menopausadas e hipertensas.

6. REFERÊNCIAS

AGUIRRE, V.; UCHIDA, T.; YENUSH, L.; DAVIS, R. J.; WHITE, M. F. The c-Jun NH₂-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser307. *J. Biol. Chem*, v.75, p.9047– 9054, 2000.

AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. Diretrizes do ACSM para os testes de esforço e sua prescrição. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

ARMUTCU, F.; COSKUN, O.; GUREL, A.; KANTER, M.; CAN, M.; UCAR, F.; UNALACAK, M. Thymosin alpha 1 attenuates lipid peroxidation and improves fructose-induced steatohepatitis in rats. *Clin. Bio. Chem*, v.38: p.540-7, 2005.

ARORA, E.; SHWETA, S.; SANDHU, J.S. Effects of resistance training on metabolic profile of adults with type 2 diabetes. *Indian J Med Res*, 129, p.515-519, 2009.

ASIKAINEN, T.M.; KUKKONEN-HARJULA, K.; MIILUNPALO, S. Exercise for health for early postmenopausal women: a systematic review of randomized controlled trials. *Sports Med*, v.34, n.11, p.753-778, 2004.

AUGUST, P; OPARIL, S. Hypertension in women. *J Clin Endocrinol Metab*, 84: 1862-1866, 1999.

BASCIANO, H; FEDERICO, L; ADELI, K. Fructose, insulin resistance and metabolic dyslipidemia. *Nutri & Metab*, 5:1-14, 2005.

BASCIANO, H.; FEDERICO, L.; ADELI, K. Fructose, insulin resistance and metabolic dyslipidemia. *Nutr & Metab*, n.5, p.1-14, 2005.

BELLÓ-KLEIN, A.; BOCK, P.M.; TRAVACIO, M., SENNA, S.M.; LLESUY, S., BITTENCOURT, P.I. , IRIGOYEN, M.C.; BELLÓ, A.A.; KUMAR, D.; SINGAL, P.K. Myocardial oxidative stress and antioxidants in hypertension as a result of nitric oxide synthase inhibition. *Cardiovasc Toxicol*, v.1, n.1, p.43-50, 2001.

BERRY, C.M.J.; BROSANAN, J; FENNELL, C.A.; HAMILTON, A.F. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, n.10, p.247-255, 2001.

BERTAGNOLLI, M.; CAMPOS, C.; SCHENKEL, P.C.; DE OLIVEIRA, V.L.; DE ANGELIS, K.; BELLO-KLEIN, A.; RIGATTO, K.; IRIGOYEN, M.C. Baroreflex sensitivity improvement is associated with decreased oxidative stress in trained spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens*, v.24, n.12, p.2437-2443, 2006.

BEUTLER, E.; DURAN, O.; KELLY, B.M. Improved method for determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*, n.61, p.802-888, 1963.

BOBEUF, F.; LABONTÉ, M.; KHALIL, A.; DIONNEL, I.J. Effect of Resistance Training on Hematological Blood Markers in Older Men and Women: A Pilot Study. *Current Gerontol and Geriatr Research*, p.1-4, 2009.

BONORA, E.; MOGHETTI, P.; ZANCANARO, C.; CIGOLINI, M.; QUERENA, M.; CACCIATONI, V.; CORGNATI, A.; MUGGEO, M. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol and Metab*, n.68, p.374-378, 1989.

BOSSENMAIER, B.; STRACK, V.; STOYANOV, B.; KRUTZFELDT, J.; BECK, A.; LEHMANN, R.; KELLERER, M.; KLEIN, H.; ULLRICH, A.; LAMMERS, R.; HÄRING, H. U. Serine residues 1177/78/82 of the insulin receptor are required for substrate phosphorylation but not autophosphorylation. *Diabetes*, v.49, p.889– 895, 2000.

BOUCHARD, C. *Atividade física e obesidade*. Barueri-Sp: Editora Manole, 2003.

BOVERIS, A; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*, n.134, p.707-716, 1973.

BRAY, G.A. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Internat J Obesit*, v.32, p. S127–S131, 2008.

BRAY, G.A.; NIELSEN, S.J.; POPKIN, B.M. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr*, n.79, p.537-543, 2004.

BRITO, J. O.; PONCIANO, K.; FIGUEROA, D.; BERNARDES, N.; SANCHES, Í.C.; IRIGOYEN, M.C.; DE ANGELIS, K. Parasympathetic dysfunction is associated with insulin resistance in fructose-fed female rats. *Braz J Med Biol Res*, v.41, n.9, p.804-8, 2008.

BRITO, J. O.; SANCHES, Í.C.; PONCIANO, K.; BRITO, S.; BERNARDES, N.; IRIGOYEN, M.C.; LACCHINI, S.; DE ANGELIS, K. Perfil metabólico e modulação autonômica cardiovascular em um modelo experimental de menopausa e disfunção metabólica: papel do treinamento físico. In: XXI Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, São Paulo, 2010.

BROOKS, G.A. & WHITE, T.P. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J Appl Physiol*, v.45, n.6, p.1009-15, 1978.

BRUUNSGAARD, H.; LADELUND, S.; PEDERSEN, A.; SCROLL, M.; JORGENSEN, T.; PEDERSEN, B. Predicting death from tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in 80-year-old people. *Clin Exo Immunol*, v.132, n.1, p. 24-31, 2003.

CAI, H. & HARRISON, D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*, n.87, p.840-844, 2000.

CARDOSO JR, C.G.; GOMIDES, R.S.; QUEIROZ, A.C.C.; PINTO, L.G.; LOBO, F.S.; TINUCCI, T., MION, J.R.D.; FORJAZ, C.L.M. Acute and chronic effects of aerobic and resistance exercise on ambulatory blood pressure. *Clinics*, 65(3):317-25, 2010.

CARRIER, J. Aerobic plus resistance training was more effective than either alone for glycaemic control in type 2 diabetes *Evid. Based Nurs.*v.11; 48, 2008.

CASTANHO, V.S.; OLIVEIRA, L.S.; PINHEIRO, H.P.; OLIVEIRA, H.C.F.; FARIA, E.C. Sex differences in risk factors for coronary heart disease: a study in a Brazilian population. *BMC Public Health*, v.1, n.3, 2001.

CHOWDHARY, S.; VAILE, J.C.; FLETCHER, J.; ROSS, H.F.; COOTE, J.H.; TOWNEND, J.N. Nitric oxide and cardiac autonomic control in humans. *Hypertension*, n.36, p.264–269, 2000.

COIMBRA R, SANCHEZ LS, POTENZA JM, ROSSONI LV, AMARAL SL, MICHELINI LC. Is gender crucial for cardiovascular adjustments induced by exercise training in female spontaneously hypertensive rats? *Hypertension*. 2008 52(3):514-21.

CUNHA, T.S.; FARAH, V.A.M.; PAULINI, J.; PAZZINE, M.; ELASED, K.; MARCONDES, F.; IRIGOYEN, M.C.; DE ANGELIS, K.; MORRIS, M. Relationship between renal and cardiovascular changes in a murine model of glucose intolerance. *Regul Peptid*, v.1, n.139, s.1-3, p.1-4, 2007.

DANTAS, A.P.V.; CARVALHO, M.H.C. Efecto protector de los estrógenos em el sistema cardiovascular. Antioxidantes y calidad de vida, v.7, n.28, p.6-11, 2000.

DE ANGELIS, K.; IRIGOYEN, M.C; MORRIS, M. Diabetes and cardiovascular autonomic dysfunction: application of animal models. Auton Neurosci. 2009 28;145(1-2):3-10.

DE ANGELIS, K.; GADONSKI, G.; FANG, J.; DALL'AGO, P.; ALBUQUERQUE, V.L.; PEIXOTO, L.R.A.; FERNANDES, T.G.; IRIGOYEN, M.C. Exercise reverses peripheral insulin resistance in trained L-NAME-hypertensive rats. Hypertension, v.34, n.2, p.768-772, 1999.

DE ANGELIS, K.; OLIVEIRA, A.R.; DALL'AGO, P.; PEIXOTO, L.R.A.; GADONSKI, G.; FERNANDES, T.G.; IRIGOYEN, M.C. Effects of exercise training in autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. Braz J Med Biol Res, n.33, p.635-641, 2000.

DE ANGELIS, K.; SANTOS, M.S.B.; IRIGOYEN, M.C. Sistema nervoso autônomo e doença cardiovascular. Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul, v.3, 2004.

DE ANGELIS, K.; SCHAAN, B.D.; MAEDA, C.Y.; DALL'AGO, P.; WICHI, R.B.; IRIGOYEN, M.C. Cardiovascular control in experimental diabetes. Brazilian Journal of Medical Biological Research, v.35, n.9, p.1091-1100, 2002

DE ANGELIS, K.L.D.; OLIVEIRA, A.R.; WERNER, A.; BOCK, P.; BELLÓ-KLEIN, A.; IRIGOYEN, M.C. Exercise training in aging: hemodynamics, metabolic, and oxidative stress evaluations. *Hypertension*, v.30, n.3, p. 767-771, 1997.

DEKKER, J.M.; SCHOUTEN, E.G.; KLOOTWIJK, P. et al. Heart rate variability from short electrocardiographic recordings predicts mortality from all causes in middle-aged and elderly men. *Am J Epidemiol*, v.145, p.899–908, 1997.

DORMANDY, T.L. Free-radical oxidation and antioxidants. *Lancet*, 1:647-650, 1978.

DRAGUSHA, G.; ELEZI, A.; DRAGUSHA, S.; GORANI, D.; BEGOLLI, L.; SAIT, V. Treatment Benefits on Metabolic Syndrome with Diet and Physical Activity. *Bos J Basic Med Sci*, v.10(2), p. 169-176, 2010.

DUBEY, R.K. Vasodilator-derived nitric oxide inhibits angiotensin II and fetal calf serum-induced growth of arteriolar smooth muscle cells. *J. Pharmacol. Exp. Therap*, v.269, p. 402-408, 1994.

DUBEY, R.K.; JACKSON, E.K.; LÜSCHER, T.F. Nitric oxide inhibits angiotensin II -induced migration of rat aortic smooth muscle cell: role of cyclic-nucleotides and angiotensin 1 receptors. *J. Clin. Invest*, v.96, p.141-149, 1995.

Elevated heart rate variability in physically active postmenopausal women: a cardioprotective effect? *Am J Physiol.*; v.71, n.40, p.H455-H460, 1996.

ELLIOT, S.S.; KEIM, N.L.; STERN, J.S.; TEFF, K.; HAVEL, P.T. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutrit*, n.76, p. 911-922, 2002.

FARAH, V.; ELASED, K.; CHEN, Y.; KEY, M.; CUNHA, T.; IRIGOYEN, M.C.; MORRIS, M. Nocturnal hypertension in mice consuming a high fructose diet. *Autonomi Neuro Sci Bas and Clin*, p.1-10, 2006.

FLECK, S.J.; KRAEMER, W.J. *Fundamentos do treinamento de força*. Porto Alegre: Artes Médicas do Sul, 1999.

FLOHE, L.; GUNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, n.105, p.114-121, 1984.

FLOREZ, H.; CASTILLO-FLOREZ, S.; MENDEZ, A. et al. C-reactive protein is elevated in obese patients with the metabolic syndrome. *Diab Res Clin Pract*, v.71, n.1, p.92–100, 2006.

FLUES, K.; PAULINI, J.; BRITO, S.; SANCHES, I.C.; CONSOLIM-COLOMBO, F.; IRIGOYEN, M.C.; DE ANGELIS, K. Exercise training associated with estrogen therapy induced cardiovascular benefits after ovarian hormones deprivation. *Maturitas*, v.65, n.3, p.267-71, 2010.

FLYNN, M.G.; MCFARLIN, B.K.; MARKOFSKI, M.M. State of the art reviews: The anti-inflammatory actions of exercise training. *Am J Lifestyle Med*, v.1, n.3, p.220-35, 2007.

FORJAZ, C.L.M. Exercício físico para o paciente hipertenso: indicação ou contra-indicação. *Rev. Bras. Hipertens*, v.10, n.2, p. 119-124, 2003.

GLUSHAKOVA, O.; KOSUGI, T.; RONCAL, C.; MU, W.; HEINIG, M.; CIRILLO, P.; SANCHEZ-LOZADA, L.G.; JOHNSON, R.J.; NAKAGAWA, T. Fructose Induces the Inflammatory Molecule ICAM-1 in Endothelial Cells. *J Am Soc Nephrol*, v.19, p.1712-1720, 2008.

GOBATTO, C.A.; MELLO, M.A.R.; SIBUYA, C.Y.; AZEVEDO, J.R.M.; SANTOS, L.A.; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comparative Biochemistry Physiology. Mol & Integr Physiol*, v.130A, p.21-7, 2001.

GOLDSTEIN, D.S.; ROBERTSON, D.; ESLER, M.; STRAUS, S.E.; EISENHOFER, G. Dysautonomias: Clinical Disorders of the Autonomic Nervous System *Ann Intern Med*. 2002;137:753-763.

GONZALEZ FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radical Biol Med*, n.10, p.1093-100, 1991.

GOUVEIA, L.M.; KETTEIHUT, I.C.; FOSS, M.C. Abnormalities of glucose metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Braz J Med and Biol Res*, v.33, p.1357-1362, 2000.

GRANGER, D.L.; ANSTEY, N.M.; MILLER, W.C.; WEINBERG, J.B. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods in Enzymol*, n.301, p.58-61, 1999.

GRYGLEWSKI, R.J.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*, n.320, p.454-456, 1986.

GUIMARÃES, G.V & CIOLAC, E.G. Síndrome metabólica: abordagem do educador físico. *Rev SocCardiol de São Paulo*, v.14 , pp. 659-70, 2004.

HAGBERG, J.M.; PARK, J.J.; BROWN, M.D. The role of exercise training in the treatment of hypertension: an update. *Sports Med*, v.30, p.193-206, 2000.

HARTHMANN, A.D.; DE ANGELIS, K.; COSTA, L.P.; SENADOR, D.; SCHAAN, B.D.; KRIEGER, E.M.; IRIGOYEN, M.C. Exercise training improves arterial baro- and chemoreflex in control and diabetic rats. *AutonNeurosci*, n.133, p.115-120, 2007.

HAUSER, C.; BENETTI, M.; REBELO, F.P.V. Estratégias para o emagrecimento. *Rev. Bras. Cineantropom. Desempenho Hum*, v.6, n.1, p. 72-81, 2004.

HAVEL, P.J. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutr Rev* May v.63, n.5, p.133–57, 2005.

HEEREN, M.V.; DE SOUSA, L.E.; MOSTARDA, C.; MOREIRA, E.; MACHERT, H.; RIGATTO, K.V.; WICHI, R.B.; IRIGOYEN, M.C.; DE ANGELIS, K. Exercise improves cardiovascular control in a model of dislipidemia and menopause. *Maturitas*. 20;62(2):200-4, 2009.

HICKSON, R.C.; DVORAK, B.A.; GOROSTIAGA, E.M.; KUROWSKI, T.T.; FOSTER, C. Potential for strength and endurance training to amplify endurance performance. *J Appl Physiol*, v.65, n.5, p. 2285-2290, 1988.

HUNG, J.; MCQUILLAN, B.M.; CHAPMAN, C.M.; THOMPSON, P.L.; BEILBY, J.P. Elevated interleukin-18 levels are associated with the metabolic syndrome independent of obesity and insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.25, n.6, p.1268–73, 2005.

I DIRETRIZ BRASILEIRA DE DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA SÍNDROME METABÓLICA. *Arq Bras Cardio*, n.84, suplII, p.03-28, 2005.

IRIGOYEN, M.C.; LACCHINI, S.; DE ANGELIS, K.; MICHELINI, L.C. Fisiopatologia da Hipertensão: O que avançamos? *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*. 2003; 1: 20-45.

IRIGOYEN, M.C.; MOREIRA, E.D.; IDA, F.; PIRES, M.; CESTARI, I.A.; KRIEGER, E.M. Changes Of Renal Sympathetic Activity In Acute And Chronic Conscious Sinoaortic Denervated Rats. *Hypertension*, 26(6 Pt 2):1111-6, 1995.

IRIGOYEN, M.C.; PAULINI, J.; FLUES, K.; FLORES, L.J.F.; CONSOLIM-COLOMBO, F.M.; MOREIRA, E.D.; BELLÓ-KLEIN, A.; DE ANGELIS, K. Exercise training improves baroreflex sensitivity associated with oxidative stress reduction in ovariectomized rats. *Hypertension*, v.46, n.2, p.998-1003, 2005.

JANSZKY, M.; ERICSON, M.; LEKANDER, M.; BLOM, K.; BUHLIN, A.; GEORGIADES, S. Inflammatory markers and heart rate variability in women with coronary heart disease. *J Internal Med*, 256: 421–428, 2004.

JOAQUIM, LUIS FERNANDO; SALGADO, HELIO CESAR; FAZAN, RUBENS. Variabilidade da pressão arterial e da frequência cardíaca, e sensibilidade do barorreflexo, em animais geneticamente manipulados. *Rev Bras de Hiperten*, v. 12, p. 36-40, 2005.

JUNOD, A.; LAMBERT, A.E.; ORCIL, PICTET, R.; GONET, A.E.; REINOULD, A.E. Studies of the diabetogenic action of streptozocin. *Pro Soc Exp Biol Med*, v.126, n.1, p.201-5, 1967.

JURCA, R.; CHURCH, T.S.; MORSS, G.M.; JORDAN, A.N.; EARNEST, C.P. Eight weeks of moderate-intensity exercise training increases heart rate variability in sedentary postmenopausal women. *Am Heart J*, v.147, n.5, p.21, 2004.

KHOO, C.L.; PERERA, M. Diabetes and the menopause. *Menopause Int*, v.11, p.6-11, 2005.

KOH, K.K.; HAN, S.H.; QUON, M.J. Inflammatory markers and the metabolic syndrome: insights from therapeutic interventions. *J Am CollCardiol*, v.46, n.11, p.1978-85, 2005.

KUO, T.B.; LIN, T.; YANG, C.C.; LI, C.L.; CHEN, CF; CHOU, P. Effect of aging on gender differences in neural control of heart rate. *Am J Physiol (Heart CircPhysiol)*, v.277, n.46, p.H2233-2239, 1999.

LA ROVERE, M.T.; BIGGER, J.T. JR; MARCUS, F.I.; MORTARA, A.; SCHWARTZ, P.J. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators. *Lancet*, v.351, p.478-84, 1998.

LAITINEN, T.; HARTIKAINEN, J.; VANNINEN, E.; NISKANEN, L.; GEELLEN, G.; LANSIMIES, E. Age and gender dependency of baroreflex sensitivity in health subjects. *J Appl Physiol*, v.84, n.2, p.576-583, 1998.

LATOUR, M.G.; SHINODA, M.; LAVONE, J.M. Metabolic effects of physical training in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *Am J Physiol*, v.90, p.235-241, 2001.

LI, Z.; MAO, H.Z.; ABBOUD, F.M.; CHAPLEAU, M.W. Oxygen-derived free radicals contribute to baroreceptor dysfunction in atherosclerotic rabbits. *Circ. Res*, n.79, p.802–811, 1996.

LISSI, E.; SALIM-HANNA, M.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M.D. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic Biol Med*, v.18, n.2, p.153-8, 1995.

LLESUY, S.F.; MILEI, J.; MOLINA, H.; BOVERIS, A.; MILEI, S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori*, v.71, p.241-249, 1985.

LOPES, H. F. Hipertensão, Obesidade, Resistência À Insulina E síndrome metabólica. *Rev Bras Hipertens*, v.12, n.3, p.154-158, 2005.

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.T.; FARR, A.L. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, n.193, p.265-275, 1951.

MAEDA, C.Y.; FERNANDES, T.G.; TIMM, H.B.; IRIGOYEN, M.C. Autonomic dysfunction in short-term experimental diabetes. *Hypertension*, n.26, p.1100–1104, 1995.

MAIORANA, A.; O'DRISCOLL, G.; GOODMAN, C.; TAYLOR, R.; GREEN, D. Combined aerobic and resistance exercise improves glycemic control and fitness in type 2 diabetes. *Diab Res and Clin Pract*, v.56, p.115–123, 2002.

MANCHADO, F.B.; GOBATTO, C.A.; CONTARTEZE, R.V.L.; PAPOTI, M.; MELLO, M.A.R. Maximal lactate steady state in running rats. *Journal of Exercise Physiology online*, v.8, p.29-35, 2005.

MARCONDES, FK; BIANCHI, FJ; TANNO, AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol*, v.62, n.4a, p.609-614, 2002.

MCCORD JM, FRIDOVICH I. Superoxide dismutase. Enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969;244:6049-55.

MEDIANO, M.F.F.; PARAVIDINO, V.; SIMÃO, R.; POLITO, M.D.; PONTES, F.L. Comportamento subagudo da pressão arterial após o treinamento de força em hipertensos controlados. *Rev bras med espor*, 11(6): 337-240, 2005.

MILLER, V.M. Gender, Estrogen, and NOS.Cautions about Generalizations.*Cir Res*. v.85, p.979-981, 1999.

MIRANDA, K.M.; ESPEY, M.G.; WINK, D.A.A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite.*Nitric Oxide*, v.5, p.62-71, 2001.

MIZUNO, T.; MATSUI, H.; IMAMURA, A.; NUMAGUCHI, Y.; SAKAI, K.; MUROHARA, T. et al. Insulin resistance increases circulating malondialdehydemodified LDL and impairs endothelial function in healthy young men. *Int J Cardiol*, v.97, p.455- 61, 2004.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, v.43, p.109-142, 1991.

MOSCA, L; BANKA, CL; BENJAMIN, EJ; BERRA, K; BUSHNELL, C; DOLOR, RJ; GANIATS, TG; GOMES, AS; GORNIK HL; GRACIA C; GULATI M; HAAN CK; JUDELSON DR; KEENAN N; KELEPOURIS E; MICHOS ED; NEWBY LK; OPARIL S; OUYANG P; OZ MC; PETITTI D; PINN VW; REDBERG RF;SCOTT R; SHERIF K; SMITH SC JR; SOPKO G; STEINHORN RH; STONE NJ; TAUBERT KA; TODD BA; URBINA E; WENGER NK; EXPERT PANEL/WRITING GROUP; AMERICAN HEART ASSOCIATION; AMERICAN ACADEMY OF FAMILY PHYSICIANS; AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS; AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY FOUNDATION; SOCIETY OF THORACIC SURGEONS; AMERICAN MEDICAL WOMEN'S ASSOCIATION; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION; OFFICE OF RESEARCH ON WOMEN'S HEALTH; ASSOCIATION OF BLACK CARDIOLOGISTS; AMERICAN COLLEGE OF PHYSICIANS; WORLD HEART FEDERATION; NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE; AMERICAN COLLEGE OF NURSE PRACTITIONERS. Evidence-based guidelines for cardiovascular disease prevention in women: 2007 update. *Circulation*, 20;115(11):1481-501, 2007.

MOSTARDA, C.; ROGOW, A.; MORAES SILVA, I.C.; DE LA FUENTE, R.N.; JORGE, L.; RODRIGUES, B.; HEEREN, M.V.; CALDINI, E.G.; DE ANGELIS, K.; IRIGOYEN, M.C. Benefits of exercise training in diabetic rats persist after three weeks of detraining. *Autonomic Neuroscience: Bas and Clin*, v.145, p.11-16, 2009.

MUIR, A.; SCHATZ, D.A.; MACLAREN, N.K. The pathogenesis, prediction, and prevention of insulin-dependent diabetes mellitus. *Endocrinol Metabo Clin Nor Amer*, v.21, n.2, p.199-219, Review, 1992.

NAHAS, M.V. *Atividade física, saúde e qualidade de vida: conceitos e sugestões para um estilo de vida ativo*. Londrina, Midiograf, 2001.

NAKAGAWA, T.; TUTTLE, K.R.; SHORT, R.A.; JOHNSON, R.J. Hypothesis: Fructose induced hyperuricemia as a causal mechanism for the epidemic of the metabolic syndrome. *Nat ClinPractNephrol*, v.1, p.80–86, 2005.

NCEP- Executive summary of the third report of the national cholesterol education program expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III) *JAMA*, n.285, p.2486-2497, 2001.

NORDMANN, R. Alcohol and antioxidant systems. *Alcohol*, n.29, p.513-522, 1994.

ORIEN, N.; ZIDEK W.; TEPEL, M. Reactive oxygen species in essential hypertension and non-insulin- dependent diabetes mellitus. *Am J Hypertens*, n.12, p.1169-1174, 1999.

ORSATTI, F.L.; NAHAS, E.A.P.; NAHAS-NETO, J.; MAESTA, N.; ORSATTI, C.L.; FERNANDES, C.E. Effects of Resistance Training and Soy Isoflavone on Body Composition in Postmenopausal Women. *Obstetr and Gynecol Inter*, p.1-4, 2010.

PARENTE COSTA, L.P.; HARTHMANN, A.; ARRUDA, P.; DE ANGELIS, K.; IRIGOYEN, M.C. Treinamento físico melhora a disfunção quimiorreflexa em ratos diabéticos por estreptozotocina. *Rev Bras Educ Fís Esp*, São Paulo, v.18, n.3, p.293-301, 2004.

PAULO, A.C.; SOUZA, E.O.; LAURENTINO, G.; UGRINOWITSCH, C.; TRICOLI, V. Efeito do treinamento concorrente no desenvolvimento da força motora e da resistência aeróbia. *Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte*, v.4, n.4, p.145-154, 2005.

PAVLOV VA, TRACEY KJ. The vagus nerve and the inflammatory reflex--linking immunity and metabolism. *Nat Rev Endocrinol*. 8 (12):743-54. 2012.

PEDERSEN, B.K.; FISCHER, C.P. Beneficial health effects of exercise - the role of IL-6 as a myokine. *Trends Pharmacol Sci*; v.28, n.4, p.152-6. 2007.

PEDERSEN, B.K.; SALTIN, B. Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. *Scand J Med Sci Sports*, v.16 ,supl.1, p.3-63, 2006.

PETERSEN, A.M.W.; PEDERSEN, B.K. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol.*, 98 (4): 1154-62, 2005.

PICK, E., KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *Journal of Immunological Methods* 38 161–170, 1980.

PISCHON, T., BAMBERGER, C.M.; KRATZSCH, J., ZYRIAX, B.C.; ALGENSTAEDT, P.; BOEING, H.; WINDLER, E. Association of plasma resistin levels with coronary heart disease in women. *Obesity*, v.13, p.1764–1771, 2005.

POLLOCK, M.L.; FLANKLIN, B.A.; BALADY, G.J.; CHAITMAN, B.L.; FLEG, J.L.; FLETCHER, B.; LIMACHER, M.; PINA, I.L.; STAIN, R.A.; WILLIAMS, M.; BAZZARRE, T. Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease: benefits, rationale, safety, and prescription. *Circulation*, 101(7): 828 – 833, 2000.

PRADHAN, A.D.; MANSON, J.E.; ROSSOUW, J.E. et al. Inflammatory biomarkers, hormone replacement therapy, and incident coronary heart disease: prospective analysis from the Women's Health Initiative observational study. *JAMA*, v. 288, p. 980–7, 2002.

PRADO, E.S.; DANTAS, E.H.M. Efeitos dos exercícios físicos aeróbio e de força nas lipoproteínas HDL, LDL e Lipoproteína. *Arq Bras Cardiol*, 79(4): 429-433, 2002.

PRAVENEC, M.; et al. Genetic analysis of “metabolic syndrome” in the spontaneously hypertensive rat. *Physiology Research*, v.53(suppl 1), p.S15-S22, 2004.

QI, Q.; WANG, J.; LI, H.; YU, Z.; YE, X.; HU, F.B.; FRANCO, O, H.; PAN, A.; LIU, Y.; LIN, X. Associations of resistin with inflammatory and fibrinolytic markers, insulin resistance, and metabolic syndrome in middle-aged and older Chinese. *Eur J Endocrinol*, v.159, p.585–593, 2008.

RABELO, E.; DE ANGELIS, K.; BOCK, P.; FERNANDES, T.; CERVO, F.; BELLO-KLEIN, A.; CLAUSSEL, N.; IRIGOYEN, M.C. Baroreflex sensitivity and oxidative stress in adriamycin-induced heart failure. *Hypertension, EUA*, v.38, n.2, p.576-580, 2001.

REZNICK, A.Z. & PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol*, v.233, p.357-363, 1994.

RIBEIRO, J.P.; MORAES FILHO; R.S. Variabilidade da Frequência Cardíaca como Instrumento de Investigação do Sistema Nervoso Autônomo. *Rev Bra Hiperten*, v. 12, p. 14-20, 2005.

RIDKER, P.M.; HENNEKENS, C.H.; BURING, J.E. et al. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med*, v.342, p.836–43, 2000c.

RIDKER, P.M.; RIFAI, N.; PFEFFER, M.; SACKS, F.; LEPAGE, S.; BRAUNWALD, E. Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation*, v.101, n.18, p.2149–2153, 2000a.

RIDKER, P.M.; RIFAI, N.; STAMPFER, M.J.; HENNEKENS, C.H. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*, p. 101, n.15, p.1767–1772, 2000b.

RING-DIMITRIOU S, PAULWEBER B, VON DUVILLARD SP, STADLMANN M, LEMURA LM, LANG J, MÜLLER E. The effect of physical activity and physical fitness on plasma adiponectin in adults with predisposition to metabolic syndrome. *Eur J Appl Physiol*. 98(5):472-481, 2006.

RODRIGUES, B.; FIGUEROA, D.M.; MOSTARDA, C.T.; HEEREN, M.V.; IRIGOYEN, M.C.; DE ANGELIS, K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol*, 6:38, 2007.

ROLIM LIMA SMR, BELLÓ-KLEIN A, FLUES K, PAULINI J, MONTE O, IRIGOYEN MC, DE ANGELIS K. Efeitos da suplementação do 17 β -estradiol no dano oxidativo cardíaco de ratas submetidas à privação dos hormônios ovarianos. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 29(1), 27-33. 2007.

ROSS, R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*, v.138, n.5 Pt 2, p.S419–S420, 1999.

ROSSI, R.; GRIMALDI, T.; ORIGLIANI, G.; FANTINI, G.; COPPI, F.; MODENA, M.G. Menopause and cardiovascular risk. *Pathophysiol Haemost Thromb*, v.32, p.325-328, 2002.

RUBANYI, G. & VANHOUTE, M. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol*, n.22, suppl. 4, p.S1-14, 1993.

SALE, D.G.; JACOBS, I.; MACDOUGALL, J.D.; GARNER, S. Comparison of two regimens of concurrent strength and endurance training. *Med Scie in Sport Exerc*, v.22, n.3, p.348-356, 1990.

SANCHES, I.C.; BRITO, J.O.; CANDIDO, G.O.; DIAS, D.S.; JORGE, L.; IRIGOYEN, M.C.; DE ANGELIS, K. Cardiometabolic benefits of exercise training in an experimental model of metabolic syndrome and menopause. *Menopause*, v. 19, n. 5, p. 562-568, 2012.

SANCHES, I.C.; CONTI, F.F.; SARTORI, M.; IRIGOYEN, M.C.; DE ANGELIS, K. Standardization of a resistance exercise training: effects in diabetic ovariectomized rats. *Inter J Sports Med. In Press*. 2013.

SCHULTZ, H.D & USTINOVA, E.E. Capsaicin receptors mediate free radical-induced activation of cardiac afferent endings. *Cardiovasc Res.*, n.38, p.348–355, 1998.

SHAIBI, G. Q., CRUZ, M.L.; BALL, G.D.C.; WEIGENBERG, M.J.; SALEM, G.J.; CRESPO, N.C.; GORAN, M.I. Effects of Resistance Training on Insulin Sensitivity in Overweight Latino Adolescent Males. *Med. Sci. Sports Exerc.*, v.38, n.7, p.1208 – 1215, 2006.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. *Angew ChemInt Ed Engl*, n.25, p.1058-71, 1986.

SILVA, GJJ; BRUM, PC; NEGRÃO, CE; KRIEGER, EM. Acute and chronic effect of exercise or baroreflexes in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 30:714-719, 1997.

SINAGRA, D & CONTI, M. Metabolic syndrome in menopause: physiopathological, clinic and therapeutic aspects for cardiovascular prevention. *Recenti Prog Med*, v.98, n.3:185-91, 2007.

SOARES, P.P.; DA NÓBREGA, A.C.; USHIZIMA, M.R.; IRIGOYEN, M.C. Cholinergic stimulation with pyridostigmine increases heart rate variability and baroreflex sensitivity in rats. *Auton Neurosci.*, v.30, n.113(1-2), p.24-31, 2004.

SOUZA, S.B.C.; FLUES, K.; PAULINI, J.; MOSTARDA, C.; RODRIGUES, B.; SOUZA, L.E.; IRIGOYEN, M.C.; DE ANGELIS, K. Role of exercise training in cardiovascular autonomic dysfunction and mortality in diabetic ovariectomized rats. *Hypertension*, n.30, p.786-791, 2007.

SOWERS, M.R. & LA PIETRA, M. Menopause: its epidemiology and potencial association with chronic diseases. *Epidemiol Rev*, n.17, p. 287-302, 1995.

STAESSEN, J.A.; GINOCCHIO, G.; THIJIS, L.; FAGARD, R. Conventional and ambulatory blood pressure and menopause in a prospective population study. *J Hum Hypertens*, v.11,n.8, p.507-514, 1997.

STAMLER, J.; STAMLER, R.; RIEDLINGER, W.F.; ALGERA, G.; ROBERTS, R.H. Hypertension screening of 1 million Americans. Community Hypertension Evaluation Clinic (CHEC) program, 1973 through 1975. *JAMA*, v.235, n.21, p.2299-2306, 1976.

STRACK, V.; STOYANOV, B.; BOSSENMAIER, B.; MOSTHAF, L.; KELLERER, M.; HÄRING, H.-U. Impact of mutations at different serine residues on the tyrosine kinase activity of the insulin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, v.239, p.235–239, 1997.

STRASSER B, SIEBERT U, SCHOBERSBERGER W. Resistance training in the treatment of the metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis of the effect of resistance training on metabolic clustering in patients with abnormal glucose metabolism. *Sports Med*. 2010 1;40(5):397-415

SUZUKI, M.; NOMURA, C.; ODAKA, H.; IKEDA, H. Effect of an insulin sensitizer, pioglitazone, on hypertension in fructose-drinking rats. *Jpn J Pharmacol*, v.74, n.4, p.297-302, 1997.

THIYAGARAJAN R, SUBRAMANIAN SK, SAMPATH N, MADANMOHAN TRAKROO, PAL P, BOBBY Z, PANEERSELVAM S, DAS AK. Association between cardiac autonomic function, oxidative stress and inflammatory response in impaired fasting glucose subjects: cross-sectional study. PLoS One, 7(7): e41889. Epub 2012.

TAPSELL, L.C.; GILLEN, L.J.; PATCH, C.S.; BATTERHAM, M.; OWEN, A.; BARE', M. et al. Including walnuts in a low-fat/modified-fat diet improves HDL cholesterol-to-total cholesterol ratios in patients with type 2 diabetes. Diabetes Care, v.27, p.2777e83, 2004.

TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY: Heart rate variability: Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Circulation, n.93, p.1043-1065, 1996.

TEFF, K.L.; ELLIOTT, S.S.; TSCHOP, M.; KIEFFER, T.J.; RADER, D.; HEIMAN, M.; TOWNSEND, R.R.; KEIM, N.L.; D'ALESSIO, D.; HAVEL, P. Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. J Clin Endocrinol Metab, n.89, p.2963-2972, 2004.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. Analyti Biochem, v.27, n.3, p.502-522,1969.

TSUJI, H.; VENDITTI, F.J.; MANDERS, E.S. et al. Reduced heart rate variability and mortality risk in an elderly cohort: the Framingham Heart Study. *Circulation*, v.90, p.878–83, 1994.

TUOMILEHTO, J.; LINDSTROM, J.; ERIKSSON, J.G.; VALLE, T.T.; HAMALAINEN, H.; ILANNE-PARIKKA, P.; KEINANEN-KIUKAANNIEMI, S.; LAAKSO, M.; LOUHERANTA, A.; RASTAS, M.; SALMINEN, V.; UUSITUPA, M. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med*, v.344, n.18, p.1343-1350, 2001.

VITTINGHOFF, E.; SHLIPAK, M.G.; VAROSY, P.D.; FURBERG, C.D.; IRELAND, C.C.; KHAN, S.S.; BLUMENTHAL, R.; BARRETT-CONNOR, E.; HULLEY, S. Risk factors and secondary prevention in women with heart disease: the Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. *Ann Intern Med*, v.138, n.2, p.81-89, 2003.

WILLIAMS, M.A.; HASKELL, W.L.; ADES, P.A.; AMSTERDAM, E.A.; BITTNER, V.; FRANKLIN, B.A.; GULANICK, M.; LAING, S.T.; STEWART, K.J. Resistance Exercise in Individuals With and Without Cardiovascular Disease: 2007 Update: A Scientific Statement From the American Heart Association Council on Clinical Cardiology and Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation*, v.116, p.572-584, 2007.

XU, L.; BADR, M.Z. Enhanced potential for oxidative stress in hyperinsulinemic rats imbalance between hepatic peroxisomal hydrogen peroxide production and decomposition due to hyperinsulinemia. *Horm Metab Res*, v.31, p.278-82, 1999.

YAMAGUCHI, Y.; YOSHIKAWA, N.; KAGOTA, S.; NAKAMURA, K.; HAGINAKA, J.; KUNITOMO, M. Elevated circulating levels of markers of oxidative-nitrative stress and inflammation in a genetic rat model of metabolic syndrome. *Nitric Oxide*, v.15, n.4, p.380–6, 2006.

7. ANEXOS

Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nº An002/2012

Título do Projeto: **Efeitos do treinamento físico aeróbio, resistido ou combinado em modelos experimentais de disfunções cardiometabólicas associadas à privação dos hormônios ovarianos**

Orientador: **Profa. Katia de Angelis**

Aluno:

Objetivos: O objetivo geral do presente projeto será avaliar e comparar os efeitos do treinamento físico dinâmico aeróbio, resistido ou combinado em parâmetros cardiovasculares, de regulação autonômica cardiovascular, metabólicos e de capacidade física, e sua relação com alterações em parâmetros de estresse oxidativo, de metabolização de óxido nítrico e de inflamação, em ratas ooforectomizadas normotensas diabéticas por estreptozotocina e em ratas ooforectomizadas hipertensas submetidas à sobrecarga de frutose.

Método:

Animais (procedência, raça, linhagem, número de animais, peso, sexo): Serão utilizados ratos Wistar fêmeas (200-250g) provenientes do biotério da Universidade Nove de Julho (SP1, SP2, SP3), SHR fêmeas (200-250g) proveniente do Biotério da Universidade Federal de São Paulo (SP3 e SP4). Os animais serão divididos nos grupos experimentais conforme descrição prévia realizada para cada subprojeto. Os grupos serão constituídos de 8 animais cada. *Embora dentre os diferentes subprojetos apresentados algumas vezes os grupos controles possam ser superponíveis (mesmos animais) nossa proposta pretende correr animais controle em paralelo com os tratados (ou grupo intervenção) levando em conta fatores que possam influenciar nos resultados, como a estação do ano, o pesquisador treinador, etc...*

Condições de alojamento e nutrição: Os animais serão mantidos em ambiente com temperatura controlada, entre 22 e 25°C, ciclo claro-escuro (12 horas) e com livre acesso a água e alimentação no Biotério da UNINOVE.

Medidas para evitar estresse e/ou dor nos animais:

As ratas dos grupos ooforectomizados serão anestesiadas com cloridrato de cetamina (50mg/Kg Ketalar a 10% ou 100mg/ml, Park-Davis) e cloridrato de xilazina (12mg/Kg, Rompum a 2% ou 20mg/ml, Bayer).

Canulação- Após 18 semanas de protocolo, as ratas serão anestesiadas com cloridrato de cetamina (50mg/Kg Ketalar a 10% ou 100mg/ml, Park-Davis) e cloridrato de xilazina (12mg/Kg, Rompum a 2% ou 20mg/ml, Bayer) e colocadas em decúbito dorsal para que se realize uma pequena incisão na região do pescoço para implantação de uma cânula na artéria carótida em direção ao ventrículo esquerdo, para registro direto da PA e na veia jugular para administração das drogas.

Procedimento Anestésico e/ou Analgésico (incluir dose e vias de administração):

Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nº An002/2012

Título do Projeto: Efeitos do treinamento físico aeróbio, resistido ou combinado em modelos experimentais de disfunções cardiometabólicas associadas à privação dos hormônios ovarianos

As ratas dos grupos ooforectomizados serão anestesiadas com cloridrato de cetamina (50mg/Kg Ketalar a 10% ou 100mg/ml, Park-Davis) e cloridrato de xilazina (12mg/Kg, Rompum a 2% ou 20mg/ml, Bayer).

Canulação- Após 18 semanas de protocolo, as ratas serão anestesiadas com cloridrato de cetamina (50mg/Kg Ketalar a 10% ou 100mg/ml, Park-Davis) e cloridrato de xilazina (12mg/Kg, Rompum a 2% ou 20mg/ml, Bayer) e colocadas em decúbito dorsal para que se realize uma pequena incisão na região do pescoço para implantação de uma cânula na artéria carótida em direção ao ventrículo esquerdo, para registro direto da PA e na veia jugular para administração das drogas.

Eutanásia:

Os animais de todos os grupos serão sacrificados por decapitação e os tecidos serão pesados e congelados para avaliações de estresse oxidativo. Tal método de eutanásia se faz necessário em função das demais técnicas induzirem aumento de estresse oxidativo (por exemplo, pela ação de anestésicos), bem como pela necessidade de coleta de grande volume de sangue para medidas bioquímicas.

Pertinência e valor científico do estudo proposto:

O Projeto é da expertise da pesquisadora e não foram encontradas questões éticas conflitantes no projeto.

O presente projeto será realizado no Laboratório de Fisiologia Translacional da Universidade Nove de Julho que conta hoje com bancadas, material cirúrgico, lupa cirúrgica, microscópios e equipamentos de monitorização de glicemia, LDL e HDL colesterol e lactato sanguíneo, esteira ergométrica para treinamento físico em animais de experimentação, biotério de manutenção de ratos, guilhotina, computadores com softwares para análise de sinais biológicos (Windaq, Matlab e Excel), centrífugas, espectrofotômetro, contador de cintilação. Vale destacar que boa parte da infraestrutura e materiais de consumo deste laboratório foram e são adquiridos com Auxílio de Projeto Jovem Investigador da FAPESP à Profª Kátia De Angelis (Processo 07/57595-5) e com o Edital Universal do CNPq (479766/2011-8). As técnicas hemodinâmicas, bem como de análise de sinais, os métodos de dosagem de parâmetros de estresse oxidativo, nitritos e nitratos estão padronizados em nosso grupo de pesquisa.

Todos os procedimentos experimentais são de domínio de nosso grupo de pesquisa e temos experiência comprovada pela publicação de artigos internacionais com o uso destas técnicas. Com relação aos aspectos éticos e acurácia dos pesquisadores informo que os alunos recebem formação e treinamentos nos procedimentos realizados em nosso laboratório. Contamos ainda com uma técnica de pesquisa com bolsa FAPESP que acompanha todos os procedimentos experimentais, os quais também são supervisionados pela cocente responsável.

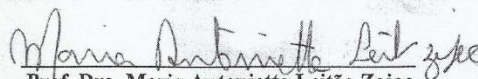
Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nº An002/2012

Título do Projeto: Efeitos do treinamento físico aeróbio, resistido ou combinado em modelos experimentais de disfunções cardiometabólicas associadas à privação dos hormônios ovarianos

Apresentado a este Comitê para análise ética, foi considerado:

- (x) Aprovado, sendo que este projeto deverá permanecer arquivado por 05 (cinco) anos nesta Secretaria.
() Com pendência (relacionar), devendo o Pesquisador encaminhar as modificações sugeridas, e iniciar a coleta de dados somente após a aprovação do projeto por este Comitê.
() Não-Aprovado

São Paulo, 14 de março 2012



Prof. Dra. Maria Antonietta Leitão Zajac
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais da
Universidade Nove de Julho