

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
**Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da**  
**Reabilitação**

**Efeitos da associação de treinamento físico aeróbio e resistido em  
parâmetros autonômicos e de estresse oxidativo em ratas  
hipertensas ooforectomizadas.**

**São Paulo**  
**2014**

Formatado: Centralizado

Formatado: Centralizado

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
**Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da**  
**Reabilitação**

**Efeitos da associação de treinamento físico aeróbio e resistido em  
parâmetros autonômicos e de estresse oxidativo em ratas  
hipertensas ooforectomizadas.**

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

**Aluno: Guilherme Lemos Shimojo Ferreira**

**Orientadora: Profa. Dra. Kátia De Angelis**

2014<sup>4</sup>

*Ferreira, Guilherme Lemos Shimoyo.*

*Efeitos da associação de treinamento físico aeróbio e resistido em parâmetros autonômicos e de estresse oxidativo em ratas hipertensas ooforectomizadas. /Guilherme Lemos Shimoyo Ferreira. 2014.*

*118 f.*

*Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2014.*

*Orientador (a): Profa. Dra. Kátia De Angelis.*

*1. Menopausa. 2. Hipertensão. 3. Treinamento físico combinado. 4. Rato. 5. Sistema nervoso autônomo.*

*I. De Angelis, K.*

*II. Título*

**CDU 615.8**

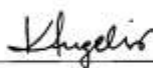
São Paulo, 16 de dezembro de 2014.

**TERMO DE APROVAÇÃO**

Aluno(a): GUILHERME LEMOS SHIMOJO FERREIRA

Título da Dissertação: "Efeitos da associação de treinamento físico aeróbio e resistido em parâmetros autonômicos e de estresse oxidativo em ratas hipertensas ooforectomizadas"

Presidente: PROFA. DRA. KATIA DE ANGELIS



Membro: PROF. DR. BRUNO RODRIGUES



Membro: PROFA. DRA. FERNANDA DE CORDOBA LANZA



*Dedico essa dissertação à minha mãe*

## **AGRADECIMENTOS**

*Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por me guiar até aqui e por colocar pessoas maravilhosas no meu caminho.*

*Ao meu querido avô (Pai), homem de fibra, guerreiro, que me ensinou a viver em um mundo onde as coisas não acontecem por acaso. Ensinou-me o valor da família.*

*À minha querida mãe, mulher de fibra, guerreira, que sempre me incentivou e sempre estava ali quando eu precisei que me ensinou que as coisas não acontecem se não existir muito trabalho e persistência. Ensinou-me o valor da verdade, lealdade e dignidade.*

*Ao meu querido pai, um homem de coração bom, guerreiro, que não mede esforços para ajudar a quem precisa. Ensinou-me que a vida é feita de escolhas.*

*Agradeço a minha família, meus irmãos, meus tios, meus primos que em algum momento estiveram presentes quando eu precisei.*

*Aos professores da UNINOVE que sempre me incentivaram e fazem parte da minha formação.*

*Agradeço a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kátia De Angelis, mais que uma orientadora uma mãe. Uma pessoa que mudou totalmente minha vida. Agradeço por me aceitar, por me orientar, por me ensinar tudo com a maior paciência do mundo. Se hoje eu tenho objetivos e planos a senhora tem grande parcela de participação. Muito obrigado!*

*Aos amigos e colegas do Laboratório de Fisiologia Translacional. Nada seria possível sem essa equipe. Obrigado por me ensinarem absolutamente tudo, desde cuidar de um rato até como utilizar uma pipeta. Obrigado por esses anos de amizade. Em especial: Renata por encontrar em você uma irmã como nossa música diz a “amizade é tudo”; Janaina por todas as conversas, conselhos e risadas; Danizinha por sempre me apoiar e fazer uma super massagem; Fernando por sempre me ajudar, por acreditar no meu potencial “quero ser igual à você quando eu crescer”; Nathalia por nunca negar ajuda e estar sempre sorrindo; Prof<sup>a</sup> Christiane e Prof<sup>a</sup> Iris por sempre estarem dispostas a me ajudar; e claro que não poderia esquecer do nosso baiano preferido (in memoriam Thayguara).*

*Obrigada a todos que fizeram parte dessa conquista direta ou indiretamente*

*Agradeço, à FAPESP (2013/07869-2), CNPq e CAPES pelo suporte financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.*

## RESUMO

A hipertensão é um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares em mulheres pós-menopausadas. Nesse contexto, a hiperatividade simpática, o estresse oxidativo e a inflamação parecem ter um importante papel no seu desenvolvimento. Por outro lado, o treinamento físico (TF) aeróbio tem sido sugerido para prevenção e/ou tratamento de diversas doenças, enquanto o TF resistido é preconizado em complemento ao TF aeróbio. Entretanto, os efeitos da associação desses tipos de treinamento (TF combinado) ainda não estão claros na condição de hipertensão associada a menopausa. Dessa forma, objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos do TF combinado em parâmetros hemodinâmicos, de controle autonômico cardiovascular, de estresse oxidativo e inflamação em ratas hipertensas ooforectomizadas. Ratas fêmeas Wistar e espontaneamente hipertensas (SHR) foram divididas em (n=8 por grupo): controle (C), hipertenso (H), hipertenso ooforectomizado (HO) e hipertenso ooforectomizado submetido ao treinamento físico combinado (THO). O TF foi realizado em esteira e escada adaptada (5 dias por semana; 8 semanas; 40-60% da capacidade máxima). A pressão arterial (PA) foi mensurada de forma direta (Windaq, 2 KHz); e a modulação autonômica cardiovascular foi avaliada por análise espectral. A sensibilidade barorreflexa foi avaliada pela infusão de drogas vasoativas. O estresse oxidativo foi avaliado pela lipoperoxidação e pela capacidade antioxidante em tecido renal e cardíaco. Marcadores inflamatórios foram avaliados em tecido cardíaco. Observou-se um aumento na PA média no grupo H ( $165 \pm 3$  mmHg) quando comparado ao grupo C ( $113 \pm 1,5$  mmHg) e um aumento adicional no grupo HO ( $176 \pm 4$  mmHg) quando comparado aos demais grupos. Entretanto, o grupo THO ( $155 \pm 3$  mmHg) apresentou uma redução de PA associada à bradicardia de repouso. Além disso, grupo THO apresentou normalização do prejuízo observado nos grupos H e HO na variância do intervalo de pulso e dos pressorreceptores para respostas bradicárdicas. O grupo HO ( $50,78 \pm 4,61$  mmHg<sup>2</sup>) apresentou um prejuízo adicional na variabilidade da PA sistólica quando comparado aos grupos

H e C ( $23,69 \pm 0,45$  e  $34,09 \pm 2,37$  mmHg<sup>2</sup>, respectivamente). Entretanto, o grupo treinado apresentou atenuação dessa disfunção (THO:  $30,09 \pm 2,03$  mmHg<sup>2</sup>). Adicionalmente, observou-se uma atenuação na modulação simpática vascular no grupo THO ( $5,72 \pm 0,60$  mmHg<sup>2</sup>) quando comparado ao grupo HO ( $7,69 \pm 0,46$  mmHg<sup>2</sup>). A ooforectomia induziu um aumento adicional no estresse oxidativo avaliado por TBARS em tecido cardíaco e renal (vs. demais grupos estudados). No entanto, o grupo THO apresentou uma redução deste parâmetro no tecido cardíaco (THO:  $3,84 \pm 0,43$  vs. HO:  $9,18 \pm 0,81$  μmoles/mg proteína) e renal (THO:  $2,68 \pm 0,21$  vs. HO:  $4,58 \pm 0,40$  μmoles/mg proteína). O grupo THO apresentou um aumento na capacidade antioxidante total não enzimática (TRAP) quando comparado aos demais grupos. Houve redução da IL-10 nos grupos ooforectomizados (HO e THO vs. C). Além disto, houve aumento de TNF-α nos grupos hipertensos sedentários (H e HO vs. C), o que não foi observado no grupo THO. Concluindo, o treinamento físico combinado foi eficaz em reduzir PA associado à melhora do barorreflexo, redução da modulação simpática vascular, do estresse oxidativo e da inflamação em ratos espontaneamente hipertensos ooforectomizados. Esses resultados sugerem um papel importante do treinamento físico combinado no manejo do risco cardiovascular na presença de hipertensão e privação dos hormônios ovarianos.



## ABSTRACT

Hypertension is one of the main risk factors for cardiovascular disease mainly in postmenopausal women. In this context, the sympathetic overactivity, the oxidative stress and the inflammation seem to have play an important role in development of this disease. On the other hand, aerobic exercise training (ET) has been suggested to prevention and/or treatment of several diseases. Moreover, resistance ET has been recommended as a complement of aerobic ET. However, the effects of the association of these types of ET (combined exercise training) in this condition remains unclear. Thus, the aim of this study was to investigate the effects of combined ET on hemodynamic, cardiovascular autonomic modulation, oxidative stress and inflammation parameters in hypertensive-ovariectomized rats. Female Wistar and SHR rats were divided into (n=8 per group): control (c), hypertensive (H), hypertensive ovariectomized (HO) and hypertensive ovariectomized submitted to combined exercise training (THO). Trained group was submitted to an exercise protocol on a treadmill and vertical ladder (5d/w; 8wk; 40-60% of maximal capacity). Arterial pressure (AP) was directly measured (Windaq, 2 KHz), and cardiovascular autonomic modulation was assessed by spectral analysis. The baroreflex sensitivity was measured by administration of vasoactive drugs. Oxidative stress was evaluated by lipid peroxidation and by antioxidant capacity in cardiac and renal tissues. Inflammatory markers were assessed in cardiac tissue. We observed an increase in mean AP in H group ( $165\pm 3$  mmHg) when compared to C group ( $113\pm 1.5$  mmHg); and an additional increase in AP in HO group ( $176\pm 4$  mmHg) when compared to other groups. However, THO group ( $155\pm 3$  mmHg) showed a reduction in AP associated with resting bradycardia. We observed a normalization in THO group in the pulse interval of variance (VAR-IP) and in baroreceptor induced-bradycardic responses. The HO group ( $50.78\pm 4.61$  mmHg<sup>2</sup>) presented an additional impairment in systolic AP variability when compared to C

and H groups ( $23.69 \pm 0.45$  and  $34.09 \pm 2.37$  mmHg<sup>2</sup> respectively). However, the trained group was able to mitigate this dysfunction (THO:  $30.09 \pm 2.03$  mmHg<sup>2</sup>). Additionally, it was observed an attenuation on vascular sympathetic modulation in THO group ( $5.72 \pm 0.60$  mmHg<sup>2</sup>) compared to HO group ( $7.69 \pm 0.46$  mmHg<sup>2</sup>). Ovariectomy induced an additional increase on oxidative stress assessed by TBARS in relation to others groups in cardiac and renal tissues. However, the THO group showed reduction in this parameter in cardiac (THO:  $3.84 \pm 0.43$  vs. HO:  $9.18 \pm 0.81$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein) and renal tissues (THO:  $2.68 \pm 0.21$  vs. HO:  $4.58 \pm 0.40$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein). The THO group presented an increase in total non-enzymatic antioxidant capacity (TRAP) when compared to others groups. There was a reduction of IL-10 in ovariectomized groups (HO and THO vs. C). Furthermore, there was an increase in TNF- $\alpha$  in sedentary hypertensive groups (H and HO vs. C), which has not been observed in THO group. In conclusion, combined exercise training was able to reduce AP associated with BrS improvement, reduction in sympathetic vascular modulation, in oxidative stress and in inflammation in hypertensive ovariectomized rats. These data suggests a positive role of combined exercise training in the management of cardiovascular risk factors in the presence of hypertension and ovarian hormones deprivation.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

### 1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1. Doença cardiovascular e Climatério: Papel da disfunção autonômica .....	1
1.2. Mecanismos associados às disfunções cardiovasculares no climatério .....	3
1.3. Treinamento físico no climatério .....	5

### 2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral .....	10
2.2 Objetivos Específicos .....	10

### 3. MÉTODOS

3.1. Amostra .....	11
3.2. Procedimentos .....	12
Ooforectomia Bilateral .....	12
Teste de Esforço Máximo em Esteira .....	12
Determinação da Carga Máxima em Escada .....	12
Treinamento Físico Dinâmico Combinado .....	13
Identificação da Fase do Ciclo Estral .....	14
Canulação .....	15
Registro de Pressão Arterial .....	15
Avaliação da Sensibilidade dos Pressorreceptores .....	16
Avaliação da Modulação Autonômica Cardiovascular .....	16
Sacrifício dos Animais .....	17
Preparação dos Tecidos .....	17
Dosagem de Proteínas .....	18
Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico .....	18
Dosagem de Proteínas Carboniladas .....	18
Catalase .....	19
Superóxido Dismutase .....	19
Capacidade Antioxidante Total (TRAP) .....	20
Marcadores Inflamatórios .....	20

4.13. Análise Estatística .....	21
---------------------------------	----

### 5. RESULTADOS .....

5. RESULTADOS .....	22
---------------------	----

### 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	53
-------------------------------	----

### 7. REFERÊNCIAS .....

7. REFERÊNCIAS .....	57
----------------------	----

### 8. ANEXOS

ANEXO A- Aprovação do comitê de ética em pesquisa com animais.....	67
ANEXO B- Artigo publicado.....	68
ANEXO C- Artigo aceito para publicação.....	85

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

- Quadro 1.** Modelo de treinamento físico combinado \_\_\_\_\_ Pg.14
- Table 1.** Hemodynamic and cardiac autonomic control in C: sedentary control; H: sedentary hypertensive; HO: sedentary hypertensive ovariectomized; THO: combined trained hypertensive ovariectomized. \_\_\_\_\_ Pg.47
- Table 2.** Cardiovascular autonomic modulation in C: sedentary control; H: sedentary hypertensive; HO: sedentary hypertensive ovariectomized; THO: combined trained hypertensive ovariectomized. \_\_\_\_\_ Pg.48
- Table 3.** Cardiac and renal oxidative stress in C: sedentary control; H: sedentary hypertensive; HO: sedentary hypertensive ovariectomized; THO: combined trained hypertensive ovariectomized. \_\_\_\_\_ Pg.49
- Tabela 4.** Inflammatory response in cardiac tissue in C: sedentary control; H: sedentary hypertensive; HO: sedentary hypertensive ovariectomized; THO: combined trained hypertensive ovariectomized. \_\_\_\_\_ Pg.50

## LISTA DE FIGURAS

### Figure Captions.

Figure 1. BrS evaluated by bradycardic and tachycardic responses. C: sedentary control (n=7); H: sedentary hypertensive (n=7); HO: sedentary hypertensive ovariectomized (n=7); THO: combined trained hypertensive ovariectomized (n=7). Pg.51  
\*P < 0.05 vs. C; # P < 0.05 vs. H; † P < 0.05 vs. HO.

Figure 2. **A** Cardiac TBARS, **B** Cardiac TRAP, **C** Renal TBARS and **D** Renal TRAP. Pg.52  
C: sedentary control (n=7); H: sedentary hypertensive (n=7); HO: sedentary hypertensive ovariectomized (n=7); THO: combined trained hypertensive ovariectomized (n=7). \*P < 0.05 vs. C; # P < 0.05 vs. H; † P < 0.05 v

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**C:** Controle sedentário

**CAT:** Catalase

**DCV:** Doença Cardiovascular

**EO:** Estresse Oxidativo

**EROs:** Espécies Reativas de Oxigênio

**FC:** Frequência cardíaca

**FFT:** Transformada Rápida de Fourier

**GPx:** Glutathione Peroxidase

**HF:** Banda de Alta frequência

**H:** Hipertenso sedentário

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de Hidrogênio

**IP:** Intervalo de pulso

**IL-6:** Interleucina -6

**IL-10:** Interleucina-10

**LF:** Banda de Baixa frequência

**HO:** Hipertenso ooforectomizado sedentário

**THO:** Hipertenso ooforectomizado treinado combinado

**OVX:** Ooforectomizada

**PA:** Pressão arterial

**PAD:** Pressão arterial diastólica

**PAM:** Pressão arterial média

**PAS:** Pressão arterial sistólica

**PCR:** Proteína C Reativa

**PICs:** Citocinas Pró-inflamatórias

**RMSSD:** Raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças entre intervalos adjacentes (atividade parassimpática)

**SHR:** Ratos Espontaneamente Hipertensos

**SNA:** Sistema Nervoso Autônomo

**SOD:** Superóxido Dismutase

**t-BOOH:** Hidroperóxido de Tert-Butil

**TBARS:** Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

**TCA:** Ácido Tricloroacético

**TF:** Treinamento Físico

**TNF-alfa:** Fator de Necrose Tumoral alfa

**VAR-IP:** Variabilidade do Intervalo de Pulso

**VPA:** Variabilidade da Pressão Arterial

**VFC:** Variabilidade da Frequência Cardíaca



## 1. CONTEXTUALIZAÇÃO

### 1.1. Doença cardiovascular e Climatério: Papel da disfunção autonômica

A doença cardiovascular (DCV) é o principal problema de saúde pública (Gerczuk and Kloner, 2012), tendo números mundialmente alarmantes de mortalidade por ano (WHO, 2013). Além disso, é a maior causa de morte entre americanos (AHA, 2012) e europeus (Nichols et al., 2014). Sabe-se que a hipertensão é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de DCV, estando presente em 69% dos casos de infarto do miocárdio, 77% dos casos de acidente vascular encefálico e 74 % dos casos de insuficiência cardíaca (Go et al., 2013).

É importante ressaltar que tem sido observada uma diferença na mortalidade por DCV entre gêneros. Segundo um recente estudo epidemiológico, 51% das mortes são decorrentes de DCV entre as mulheres ao passo que entre os homens este percentual é de 42% (Nichols et al., 2014). Além disto, em média as mulheres são diagnosticadas com DCV 10 anos mais velhas do que os homens (Linda et al., 2004). Todavia, ainda não estão bem estabelecidos os mecanismos pelos quais a mulher apresenta aumento na prevalência de doenças cardíacas durante o climatério. Neste aspecto, sugere-se que o estrogênio promova cardioproteção previamente à menopausa, reduzindo a incidência de DCV em relação ao sexo masculino (Miller, 1999; Doshi et al., 2013).

O aumento do risco de eventos cardiovasculares após o advento da menopausa está associado a disfunções metabólicas e endoteliais, que podem estar diretamente relacionadas à disfunção autonômica (Arnal et al., 2007; Sinagra & Conti, 2007), principalmente com a hiperatividade simpática (Swedberg et al., 1990; Bertagnolli et al., 2008). De fato, alguns estudos prévios demonstraram que mulheres acima de 60 anos apresentam maior atividade

simpática muscular quando comparadas a homens da mesma idade (Narkiewicz et al., 2005; Schlaich et al., 2010; Maranon et al., 2014). Nesse sentido, a avaliação da sensibilidade dos pressorreceptores (barorreflexo) e a análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e da pressão arterial (VPA) são excelentes medidas para o entendimento da função autonômica (Goldstein et al., 2002; De Angelis et al., 2004).

A variabilidade natural dos parâmetros da FC e PA refletem a interação de diversos fatores que, em sua maioria, envolvem o sistema nervoso autonômico (SNA) sobre o aparelho cardiovascular (Joaquim et al., 2005). Além disto, a análise espectral destes sinais permite a avaliação da sensibilidade espontânea dos pressorreceptores. Os pressorreceptores são mecanorreceptores responsáveis pelo controle da PA através da atividade simpática e parassimpática momento a momento em um curto espaço de tempo (Irigoyen et al., 2003; De Angelis et al., 2004). Atualmente, intervenções no sentido de detectar, prevenir e/ou atenuar a disfunção autonômica cardiovascular têm sido vista como importante estratégia no manejo das doenças cardiovasculares (Task Force, 1996; La Rovere et al., 1998).

Estudos de nosso grupo evidenciam que ratas submetidas à privação dos hormônios ovarianos apresentam aumento da PA associados a prejuízo no controle autonômico cardiovascular (Flues et al., 2010). De forma semelhante, a redução da sensibilidade barorreflexa foi observado ao longo da vida em mulheres (Laitinen et al., 1998), assim como aumento do balanço simpato-vagal cardíaco após a faixa etária da menopausa (Kuo et al., 1999). Todavia, os mecanismos responsáveis por tais disfunções tanto em humanos como em modelos animais, não estão bem elucidados.

## 1.2. Mecanismos associados às disfunções cardiovasculares no climatério

A hiperatividade simpática tem sido associada ao desenvolvimento de hipertensão, diabetes e doenças cardíacas isquêmicas (Hellstrom, 2007; Souza et al., 2014). Além disso, estudos sugerem que atividade simpática elevada leva a um prejuízo na sensibilidade dos pressorreceptores bem como a um prejuízo renal, ambos importantes reguladores de pressão arterial (Neto et al., 2013).

Em contrapartida, estrogênio tem sido relacionado a funções cardioprotetoras (Dubey, 1994; Dubey et al., 1995; Boukhris et al., 2014). Os mecanismos pelos quais o estrogênio atenua o desenvolvimento de doenças cardiovasculares são multifatoriais. Estudos desenvolvidos previamente demonstraram que o estrogênio é capaz de diminuir tônus vascular simpático, por meio de fatores de relaxamento derivado do endotélio (Mendelsohn et al., 1999), liberação de óxido nítrico (NO) (Kaiser and Rubanyi, 1994), ou por meio de alterações no sistema renina angiotensina (SRN) (Gallagher et al., 1999).

O termo estresse oxidativo (EO) descreve a condição resultante do desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (íons/moléculas com elétrons não pareados ou ligações instáveis) e suas enzimas antioxidantes (Nordmann, 1994; Campos et al., 2013). Em mulheres pós-menopausadas a disfunção autonômica (Bertagnolli et al., 2006), a elevação de citocinas inflamatórias e de marcadores pro-oxidantes (Signorelli et al., 2006; McLean et al., 2007) estão relacionados com o aumento do EO. Neste sentido, Barp et al. (2012) demonstraram que a associação de hipertensão e ooforectomia resultam em perfil de EO mais acentuado. Em nosso grupo evidenciamos aumento do EO após ooforectomia, caracterizado por aumento da lipoperoxidação de membrana e redução das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) em tecido cardíaco (Rolim et al., 2007). No entanto, parâmetros

de EO ainda não estão totalmente elucidados, na associação de fatores de risco em modelos experimentais, principalmente em ratas ooforectomizadas (OVX) hipertensas.

Neste sentido, vale destacar que um número crescente de evidências sugere que a produção aumentada de EROs, como o ânion superóxido e o radical hidroxila, participam criticamente da patogênese das doenças coronarianas, hipertensão, aterosclerose e síndrome metabólica (Dantas et al., 2000; Bello-Klein et al., 2001). Dentre muitas evidências, investigadores sugerem que o aumento excessivo de EROs pode ser considerado um dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de DCV (Churchill et al., 2005; Yogalingam et al., 2013).

É importante ressaltar que em trabalhos realizados em nosso grupo, que alterações em parâmetros cardiovasculares e autonômicos correlacionaram-se com a redução do EO, aumento das enzimas antioxidantes e melhora da sensibilidade dos pressorreceptores, em ratos machos idosos, com insuficiência cardíaca ou hipertensão, e também em ratas fêmeas submetidas à privação dos hormônios ovarianos (De Angelis et al., 1997; Rabelo et al., 2001; Irigoyen et al., 2005; Bertagnolli et al., 2006).

Além do aumento do EO, o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (PICs) tais como: proteína C reativa (PCR) (Kurtz et al., 2010), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF alfa) (Ridker et al., 2000; Park et al., 2009) estão associados ao maior risco cardiovascular e ao aumento da morbidade e mortalidade entre a população em geral (Ridker et al., 2000; Pradhan et al., 2002). Interessantemente, em um estudo de cultura *in vivo* a deficiência do hormônio sexual feminino (estrogênio) foi acompanhando subitamente pelo aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF alfa (Pacifici et al., 1989). Também demonstrou-se, que a deficiência de estrogênio promove uma resposta celular pela regulação positiva de receptores de citocinas e cofatores envolvidos na ação de citocinas, assim agravando a ação do processo inflamatório (Lin et al., 1997). De forma semelhante, indivíduos

idosos ou com maior risco de insuficiência cardíaca crônica apresentaram níveis elevados de PCR, TNF alfa e IL-6 (Strack et al., 2000) associados à redução da variabilidade da FC (Bossenmaier et al., 2000).

A inflamação vem sido associada ao aumento de pressão arterial em diversos modelos, sugerindo que a inflamação pode contribuir para o desenvolvimento de hipertensão em mulheres pós-menopausadas (Yanes & Reckelhoff, 2011). No entanto, poucos estudos avaliaram a associação de marcadores de estresse oxidativo, inflamatórios e disfunções cardiovasculares após a privação dos hormônios ovarianos

### **1.3. Treinamento físico no climatério**

Os efeitos benéficos do treinamento físico (TF) têm sido demonstrados na literatura como uma abordagem não farmacológica na prevenção e tratamento da hipertensão, na resistência à insulina, no diabetes melitos, na dislipidemia, na obesidade e na síndrome metabólica (Ross et al., 1999; NCEP, 2001; Tuomilehto et al., 2001; Guimaraes & Ciolac, 2004; Pedersen & Saltin, 2006). Neste sentido, uma recente meta-análise demonstrou que o TF aeróbio, resistido ou combinado estão associados à redução nos valores de PA em pacientes hipertensos. Interessantemente, a magnitude de redução destes valores foram similares entre as 3 modalidades (Cornelissen and Smart, 2013).

Vale ressaltar que a menopausa está associada a prejuízos na capacidade aeróbia, força muscular, ganho de peso, osteoporose, diabetes mellitus tipo 2 e doenças cardiovasculares (Staessen et al., 1997; Sowers et al., 2005; Hoffman et al., 2012). Neste sentido, uma revisão sistemática que inclui estudos clínicos randomizados e controlados em mulheres na menopausa mostrou os benefícios do exercício físico no peso corporal, na massa óssea, na força e na

resistência muscular, na flexibilidade, no consumo de oxigênio, na PA e no controle metabólico (Asikainen et al., 2004). Recentemente, evidenciamos em modelo experimental de privação dos hormônios ovarianos redução de  $VO_2\text{max}$ . em comparação com ratos machos e fêmeas de mesma idade (Conti et al., 2014).

Estudos evidenciam que mulheres na menopausa são mais sedentárias, desta forma a adoção de um estilo de vida ativo tem sido recomendado para essa população (Mosca et al., 2007). Após TF aeróbico dinâmico foi observado melhora na modulação autonômica (Jurca et al., 2004), da sensibilidade dos pressorreceptores e da variabilidade da frequência cardíaca (Davy et al., 1996), evidenciando os benefícios desta abordagem no manejo do risco cardiovascular em mulheres menopausadas.

Modelos experimentais, em machos e fêmeas SHR apresentam melhora cardiovascular, autonômica e de função renal após o TF aeróbico em esteira (Silva et al., 1997; Coimbra et al., 2008; Agarwal et al., 2012). Em nosso grupo, demonstramos que o TF aeróbico 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 OVX treinadas aerobiamente (Souza et al., 2007), dislipidêmicas OVX treinadas aerobiamente (Heeren et al., 2009). Além disso, animais submetidos ao TF aeróbico apresentaram redução do estresse oxidativo e aumento das enzimas antioxidantes, correlacionados com melhora dos parâmetros cardiovasculares e autonômicos em machos SHR e em ratas OVX (Irigoyen et al., 2005; Bertagnolli et al., 2006).

Além disto, quando associamos a terapia hormonal com o TF aeróbico observamos benefícios adicionais como redução da PA, melhora barorreflexa, diminuição acentuada da atividade simpática cardíaca em relação ao grupo OVX submetido apenas a reposição

hormonal, sugerindo um papel positivo desta associação no manejo de fatores de risco cardiovascular em mulheres menopausadas (Flues et al., 2010).

Recentemente, nosso grupo evidenciou em modelo experimental de ratas SHR OVX que o TF aeróbio promoveu redução da PA associado à melhora do barorreflexo, da VFC e da VPA. No entanto, a adição do consumo de frutose nestas ratas SHR treinadas não induziu redução da PA, porém houve redução da glicemia, dos triglicérides, da resistência a insulina e melhora da modulação autonômica cardiovascular em relação ao grupo frutose sedentário (Sanches et al., 2013).

Estudos também demonstram benefícios na ação antiinflamatória associada ao TF em indivíduos saudáveis (Pedersen and Fisher, 2007; Flynn et al., 2007) e em idosos (Bruunsgaard et al., 2003). Já em pacientes com predisposição a síndrome metabólica, foi observada que o TF aeróbio aumentou a adiponectina sérica (Ring-Dimitrou et al., 2006). Recentemente, nosso grupo verificou 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). Em conjunto, os resultados sugerem que o TF aeróbio parece ser uma poderosa ferramenta que pode atenuar os fatores de risco para DCV. Entretanto, associação do TF aeróbio ao resistido foi pouco estudada.

Acredita-se que em pacientes hipertensos a utilização do treinamento resistido é um importante complemento ao treinamento aeróbio devido aos seus benefícios osteomusculares (Cardoso et al., 2010). Além disto, uma meta-análise concluiu que o TF resistido tem um importante papel no controle dos fatores de risco, como obesidade, hemoglobina glicada e pressão arterial sistólica, devendo ser indicado no manejo do diabetes e da síndrome metabólica (Strasser 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 II, obesidade e outras condições comorbidas (ACSM, 2003). Nesse sentido, a literatura internacional tem adotado com frequência os termos treinamento combinado ou concorrente para se referir aos programas que combinam TF aeróbio dinâmico com TF resistido num mesmo período de tempo (Mariorana et al., 2002; Paulo et al., 2005).

No estudo com paciente diabético tipo II, o efeito do exercício combinado demonstrou melhora da sensibilidade à insulina, controle da pressão arterial, sem efeito significativo no controle glicêmico (Wagner, 2006). O treinamento físico aeróbio pode melhorar o  $VO_2$ máx, as variáveis antropométricas de mulheres com câncer e reduzir IMC e percentual de gordura. Já o treinamento físico resistido pode melhorar a composição corporal e reduzir peso, após 12 semanas de treinamento, melhorando, assim, a capacidade funcional (Rahnama et al., 2009).

No estudo de Maiorana et al. (2002), após 8 semanas de TF combinado de moderada intensidade, observou-se melhora da capacidade funcional com incremento de  $VO_2$ máx e  $VO_2$  de pico, também foi observado aumento na força; além de manutenção dos níveis basais de glicose e de hemoglobina glicada; sugerindo que um programa de treinamento composto por exercícios aeróbios e resistidos é de grande valia para pacientes diabéticos tipo II, uma vez que a combinação dos efeitos de ambos os treinos são benéficos à melhora de composição corporal e controle glicêmico.

Um estudo transversal foi desenhado para analisar o efeito do TF combinado em humanos de meia idade, praticantes de remo, para avaliar o impacto nos grandes vasos (Cook et al., 2006). Verificou-se que o TF induzia efeitos favoráveis na elasticidade das artérias centrais em comparação ao grupo controle; favorecendo a regulação de grandes variações de PA, evitando assim a hipertensão e melhorando a função dos pressorreceptores (Cook et al., 2006). Em um estudo randomizado com 92 pacientes mulheres em TF combinado pós-evento



cardíaco observa-se melhora da capacidade física, flexibilidade no desempenho das atividades da vida diária e em aspectos psicológicos como calma e concentração (Arthur et al., 2007).

Todavia, tais estudos, não evidenciaram as possíveis alterações cardiovasculares e autonômicas, bem como os mecanismos envolvidos nos benefícios desta prática, especificamente, durante o climatério. Considerando que o sedentarismo pós-menopausa vem se tornando um fator de risco importante para o desenvolvimento de hipertensão e doenças cardiovasculares, há necessidade de intervenções que promovam a mudança do crescente aumento da prevalência de DCV no sexo feminino, principalmente após a menopausa. Neste contexto, os exercícios físicos regulares são adotados como alternativas terapêuticas e podem contribuir para a diminuição de fatores de risco cardiovasculares como a disfunção autonômica, o estresse oxidativo e a inflamação. *Neste sentido, o presente trabalho tem por objetivo testar a hipótese que o treinamento físico combinado induza benefícios cardiovasculares e autonômicos, relacionadas à redução de parâmetros de estresse oxidativo e inflamatório em ratas ooforectomizadas espontaneamente hipertensas.*

Neste sentido, considerando que o sedentarismo pós-menopausa é um fator de risco eminente para o desenvolvimento de hipertensão e DCV, são necessárias intervenções que promovam a mudança no estilo de vida. Neste contexto, os exercícios físicos regulares são adotados como alternativas terapêuticas e podem contribuir para a diminuição de fatores de risco cardiovasculares. Assim, os resultados do presente estudo poderão colaborar na compreensão dos mecanismos responsáveis pelos benefícios fisiológicos induzidos pelo treinamento físico aeróbio associado ao resistido (combinado) na redução do risco cardiovascular em mulheres no climatério, bem como na busca de abordagens mais precisas para o tratamento das doenças cardiovasculares nas mulheres menopausadas, de tal forma que estudos posteriores possam mostrar melhora da qualidade de vida e redução da morbimortalidade nessa população.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos do treinamento físico aeróbio associado ao resistido (combinado) em parâmetros cardiovasculares e de controle autonômico cardiovascular, e sua relação com as alterações em parâmetros de estresse oxidativo, de metabolização de óxido nítrico e de inflamação em ratas SHR submetidas à privação de hormônios ovarianos.

### 2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do presente estudo foi avaliar os efeitos da associação do treinamento físico aeróbio ao resistido, em ratas SHR submetidas à privação dos hormônios ovarianos, nas seguintes parâmetros:

- de capacidade física (teste máximo de corrida em esteira e teste de carga máxima em escada);
- de função cardiovascular (pressão arterial, PA, e frequência cardíaca, FC);
- de regulação autonômica cardiovascular (variabilidade da FC e da PA e sensibilidade dos pressorreceptores);
- de estresse oxidativo cardíaco e renal (lipoperoxidação por quimilunescência, proteínas carboniladas, catalase, superóxido dismutase, capacidade antioxidante total);
- e de inflamação cardíaco (TNF alfa, IL-6 e IL-10).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Amostra

Foram utilizadas 7 ratos Wistar fêmeas, provenientes do Biotério da Universidade Nove de Julho, e 21 ratos fêmeas espontaneamente hipertensos (SHR), provenientes do Biotério do Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul com aproximadamente 10 semanas de vida (190-220g). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Nove de Julho (An0019/2013). Os animais foram mantidos em gaiolas, contendo no máximo 6 animais em cada uma, em ambiente com temperatura controlada (220 - 240C) e com luz controlada em ciclo de 12 horas (claro - escuro, invertido). Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais com 7 ratas em cada grupo:

Grupo I- **Controle saudável (C)**: foram acompanhadas por 8 semanas (foram avaliadas nas fases não ovulatória do ciclo estral).

Grupo II - **Hipertenso sedentário (H)**: foram acompanhadas por 8 semanas (foram avaliadas nas fases não ovulatória do ciclo estral).

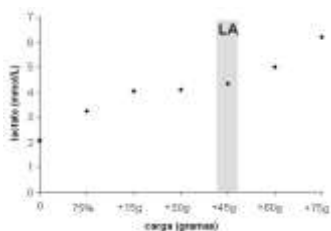
Grupo III- **Hipertenso ooforectomizado sedentário (HO)**: foram submetidas à cirurgia de ooforectomia bilateral e acompanhadas por 8 semanas.

Grupo IV- **Hipertenso ooforectomizado treinado combinado (THO)**: foram submetidas à cirurgia de ooforectomia bilateral e a treinamento físico em esteira ergométrica rolante (Imbramed TK-01) e escada adaptada para ratos em dias alternados a partir da 1ª semana de protocolo durante 8 semanas.

### 3.2. PROCEDIMENTOS

**3.2.1. Ooforectomia Bilateral-** 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 realize uma laparotomia (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). (Latour et al., 2001; Irigoyen et al., 2005; Flues et al., 2010). Após uma semana de recuperação os animais foram submetidos ao teste de esforço em esteira e escada adaptada para ratos.

**3.2.2. 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 seja atingida a velocidade máxima suportada pelos animais. O critério utilizado para a determinação da exaustão do animal e interrupção do teste é o momento em que o rato não for mais capaz de correr mediante o incremento de velocidade da esteira (Brooks and White, 1978). Vale ressaltar que recentemente demonstramos relação entre velocidade do atingida no teste de esforço e a medida direta do consumo de oxigênio em ratos (Rodrigues et al., 2007).



### 3.2.3. 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 0,5 cm. 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 executem 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 ao lado 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 deverão realizar de 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 15 gramas foi adicionado ao aparato. Esse procedimento foi sucessivamente repetido até que a carga alcance um peso que não permita que o rato escale. Ao final de cada escalada, coletas sanguíneas da extremidade distal da cauda dos animais foram realizadas para posterior determinação da lactacidemia.

**3.2.4. Treinamento Físico Dinâmico Combinado-** O treinamento físico combinado também teve duração de 8 semanas e foi constituído 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 (Saleet 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 (50-60% 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 consistirá em sessões de 15 escaladas a 40% da carga máxima na 1ª semana e 2ª semana. Na 3ª e 4ª semana, o treinamento consistirá em sessões de 15 escaladas a 50% da carga máxima. Ao final da 4ª semana se realizou um novo teste de esforço e de carga máxima, o qual permitirá os reajustes nas cargas para as semanas subsequentes (5ª a 8ª), sendo a intensidade destas semanas entre 50-60% da carga máxima (Quadro 2).

**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	45 min	50%	1	15	40%
2	60 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	15	50%
6	60 min	50-60%	6	15	50%
7	60 min	60%	7	15	60%
8	60 min	60%	8	15	60%

**3.2.5. 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 foix' 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 foram realizados nas fases não ovulatórias do ciclo estral das ratas.

**3.2.6. Canulação-** Após o treinamento, 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 fosse realizada 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).

**3.2.7. 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 (Blood Pressure XDCR, Kent<sup>®</sup>Scientific, Litchfield, CT, EUA) que, por sua vez, esteve conectado a um pré-amplificador (Stemtech BPMT-2, Quintron Instrument<sup>®</sup>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, Dataq Instruments, 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 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).

**3.2.8. 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 (0,25 para 32 g/kg) e de nitroprussiato de sódio (0,05 para 1,6g/kg). 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 através divisão da variação da FC pela variação da PAM (De Angelis et al., 1997; De Angelis et al., 1999; Irigoyen et al., 2005).

**3.2.9. 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 (BF;



0,20-0,75 Hz) e alta frequência (AF; 0,75-4,0 Hz). 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 apresentarem oscilações muito lentas (<0,1 Hz), que contribuem para mais de 70% da variabilidade total, foram considerados não estacionários e foram descartados do estudo. A sensibilidade barorreflexa espontânea foi obtida pelo índice  $\alpha$ , metodologia que analisa a correlação temporal e linear entre o intervalo RR e a variabilidade da PAS (Mostarda et al., 2009; Heeren et al., 2010).

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

### **3.2.11. Estresse oxidativo e enzimas antioxidantes**

**3.2.11.1. Preparação dos Tecidos-** Após as avaliações citadas acima de acordo, os animais foram pesados e mortos por meio de decapitação. O tecido cardíaco e rim foram coletados e homogeneizados 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 10 $\mu$ L/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 já congelado em freezer a -70°C para as dosagens (Llesuy et al., 1985).

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

**3.2.11.3. 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 and Aust, 1978).

**3.2.11.4. 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 and Packer, 1994). A técnica se baseia na reação das proteínas oxidadas do plasma sanguíneo 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.

**3.2.11.5. 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 $\mu$ L deste tampão e 10 $\mu$ L de amostra de tecido na cubeta do espectrofotômetro, sendo esta mistura descontada contra um branco de tampão fosfato. A seguir foram adicionados 35 $\mu$ L de peróxido de hidrogênio (0,3 mol/L) e foi monitorada a diminuição da absorbância no espectrofotômetro (Boveris and Chance, 1973).

**3.2.11.6. 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 foi determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado. No meio de reação, foram utilizados 20  $\mu$ L de homogeneizado, 973  $\mu$ L de tampão Tris-Fosfato a 50 mmol/L (pH 8,2), 8  $\mu$ L de pirogalol a 24 mmol/L, 4  $\mu$ L de CAT a 30  $\mu$ 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 (Marklund, 1985).

**3.2.11.7. Capacidade Antioxidante Total (TRAP)-** Esta técnica é baseada na decomposição do 2,2' Azo-bis (2-amidino-propano ABAP) diidrocloreto que gera radicais livres. Os radicais formados pela decomposição do Azo vão, por sua vez, reagir com o luminol acrescentado ao meio de reação, gerando outro radical livre mais energético e com maior emissão de luz, que é detectado por contador beta (*TriCrab 2800TR, PerkinElmer*) com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio em sala escura. Porém, se no meio de reação existir a presença de uma substância antioxidante, esta irá neutralizar os radicais livres e, assim, diminuir a emissão de luz. Quando toda a substância antioxidante tiver reagido, ou seja, quanto todo antioxidante tiver sido consumido, o luminol volta a reagir com o ABAP radical aumentando novamente a emissão de luz detectada pelo contador. A primeira leitura é realizada com Azo (2,0 ml) e luminol (10 µL) nesta, verificamos a formação de radicais livres, posteriormente realizamos uma curva padrão utilizando o Trolox (5µL e 10µL) como antioxidante e, medimos a capacidade antioxidante de nossas amostras observando-se o tempo que amostra inibe a formação dos radicais do luminol (Lissi et al., 1995).

**3.2.12. Marcadores Inflamatórios-** As dosagens de interleucinas 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 utilizou 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.

### **3.2.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão. A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Levene. O teste de análise de variância de um caminho (ANOVA) foi devidamente aplicado para análise dos dados, seguido do post hoc de *Student Newman Keuls*. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Artigo submetido para revista *Hypertension* – Qualis A1

#### **IMPACT OF COMBINED EXERCISE TRAINING IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF HYPERTENSION ASSOCIATED WITH MENOPAUSE.**

Impacto do treinamento físico combinado em modelo experimental de hipertensão associado à menopausa.

O objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos do treinamento físico combinado em parâmetros hemodinâmicos, de controle autonômico cardiovascular, de estresse oxidativo e inflamação em ratas hipertensas ooforectomizadas.



# Hypertension

Manuscript Submission and Peer Review System

[Tracking System Home](#)
[Author Help](#)
[Reviewer Help](#)
[Change Journal](#)
[Tips](#)
[Logout](#)

<b>Manuscript #</b>	HYPER01505223
<b>Current Revision #</b>	0
<b>Submission Date</b>	23-Jan-2018 13:10
<b>Current Stage</b>	Submitted
<b>Title</b>	IMPACT OF COMBINED EXERCISE TRAINING IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF HYPERTENSION ASSOCIATED WITH MENOPAUSE
<b>Running Title</b>	COMBINED EXERCISE TRAINING EFFECTS IN OVX-SHR
<b>Manuscript Type</b>	Original Article
<b>Category</b>	Basic
<b>Corresponding Author</b>	Prof. Fábio De Angelo (Universidade Nova de Julho (URINOVE))
<b>Contributing Authors</b>	Dr. Guilherme Lemos Shimizu, Daniele Dias, Christiane Raftani, Nias Irs Sanchez, Maria-Claudia Duggan
<b>Abstract</b>	<p>In this study we tested the hypothesis that the cardiovascular autonomic dysfunction plays an important role in the management of inflammation and oxidative stress, and that these dysfunctions may in turn be modulated by combined exercise training in an experimental model of hypertension and menopause. Female rats were divided into (n=7) groups: control (C) and hypertensive (H), hypertensive ovariectomized (HO) and hypertensive ovariectomized undergoing combined (aerobic+resistance) training (THO). We observed an additional increase in HO group (176±4 mmHg) in relation to H group (165±3 mmHg). However, the THO group (155±3 mmHg) showed a reduction of arterial pressure associated with resting bradycardia. The HO group (70.75±4.51 mmHg<sup>2</sup>) presented an additional impairment in systolic arterial pressure variability when compared to C and H groups (23.88±0.45 and 24.09±2.27 mmHg<sup>2</sup>); this dysfunction was not observed in THO group (30.09±2.03 mmHg<sup>2</sup>). Additionally, an attenuation in vascular sympathetic modulation and an improvement in baroreflex sensitivity were found in the THO when compared to HO group. There was an increase in TNF-<math>\alpha</math> in sedentary hypertensive groups (H and HO vs. C), which was not observed in THO group. Ovariectomy induced an additional increase in cardiac and renal oxidative stress, which were reduced in THO group. The THO group presented an increase in total antioxidant capacity when compared to the other groups. In conclusion, combined exercise training was able to reduce AP associated with improvement in cardiovascular autonomic control, probably reducing cardiac and renal inflammation and oxidative stress, in an experimental model of hypertension and menopause.</p>
<b>Associate Editor</b>	Not Assigned
<b>Author-Supplied Keywords</b>	Combined exercise training
<b>Keywords</b>	menopause, hypertension, high blood pressure, oxidative stress, autonomic function
<b>Word Count</b>	5625

**IMPACT OF COMBINED EXERCISE TRAINING IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF HYPERTENSION ASSOCIATED WITH MENOPAUSE.**

**Guilherme Lemos SHIMOJO<sup>1</sup>, Danielle da Silva DIAS<sup>1</sup>, Christiane MALFITANO<sup>1</sup>, Iris Callado SANCHES<sup>1</sup>, Maria-Cláudia IRIGOYEN<sup>2</sup>, Kátia DE ANGELIS<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratory of Translational Physiology, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, Brazil; <sup>2</sup>Heart Institute, University of São Paulo, Medical School, São Paulo

**Short Title: COMBINED EXERCISE TRAINING EFFECTS IN OVX-SHR**

Word count of manuscript: 5625  
Word count of abstract: 247  
Total number of figures: 2

**Corresponding author**

Kátia De Angelis, PhD

Universidade Nove de Julho - Science Rehabilitation Program.

Adrees: Rua Vergueiro, 235, Zip Code: 01504001

São Paulo, SP, Brazil.

Fone: 55 11 3385-9154

Fax: 55 11 3385-9154

E-mail: [prof.kangelis@uninove.br](mailto:prof.kangelis@uninove.br)



### ABSTRACT

In this study we tested the hypothesis that the cardiovascular autonomic dysfunction plays an important role on the management of inflammation and oxidative stress, and that these dysfunctions may in turn be modulated by combined exercise training in an experimental model of hypertension and menopause. Female rats were divided into (n=7/group): control (C) and hypertensive (H), hypertensive ovariectomized (HO) and hypertensive ovariectomized undergoing combined (aerobic+resistance) training (THO). We observed an additional increase in HO group ( $176\pm 4$  mmHg) in relation to H group ( $165\pm 3$  mmHg). However, the THO group ( $155\pm 3$  mmHg) showed a reduction of arterial pressure associated with resting bradycardia. The HO group ( $50.78\pm 4.61$  mmHg<sup>2</sup>) presented an additional impairment in systolic arterial pressure variability when compared to C and H groups ( $23.69\pm 0.45$  and  $34.09\pm 2.37$  mmHg<sup>2</sup>); this dysfunction was not observed in THO group ( $30.09\pm 2.03$  mmHg<sup>2</sup>). Additionally, an attenuation on vascular sympathetic modulation and an improvement in baroreflex sensitivity were found in the THO when compared to HO group. There was an increase in TNF- $\alpha$  in sedentary hypertensive groups (H and HO vs. C), which was not observed in THO group. Ovariectomy induced an additional increase in cardiac and renal oxidative stress, which were reduced in THO group. The THO group presented an increase in total antioxidant capacity when compared to the other groups. In conclusion, combined exercise training was able to reduce AP associated with improvement on cardiovascular autonomic control, probably reducing cardiac and renal inflammation and oxidative stress, in an experimental model of hypertension and menopause.

## INTRODUCTION

It is known that hypertension is the one of the main risk factors for development of cardiovascular disease.<sup>1</sup> In this sense, statistical surveys have shown that after 50 years of age, the prevalence of hypertension is higher in women than in men, regardless of ethnicity.<sup>2</sup> The mechanisms underlying this increase in blood pressure (BP) in postmenopausal women remain unclear.<sup>3</sup> However, some evidence seems to indicate that increase in sympathetic activity may be linked to the increase on blood pressure and renal damage.<sup>4-6</sup>

Both chronic inflammation and oxidative stress seem to contribute to the genesis of hypertension.<sup>7,8</sup> Studies have demonstrated that the adaptive immune response releases cytokines (such as TNF- $\alpha$ ), which in turn trigger increased levels of oxidative stress.<sup>9,10</sup> In addition, previous research has shown that oxidative stress may further lead to local inflammation by increasing endothelial permeability, thus allowing infiltration of pro-inflammatory cytokines.<sup>11,12</sup> In addition, several studies have demonstrated the key role oxidative stress plays in the pathophysiology of a large number of diseases.<sup>13,14</sup> These findings suggest that sympathetic nervous system is able to act as a key trigger of both inflammation and oxidative stress in the development of hypertension.

Exercise training is an important non-pharmacological tool for the prevention and/or treatment of hypertension.<sup>15,16</sup> Some studies have shown the beneficial effects that follow aerobic exercise training, such as decreased blood pressure, oxidative stress,<sup>17,18</sup> and pro-inflammatory profile in autonomic brain areas,<sup>19,20</sup> together with reduced sympathetic activity.<sup>19</sup> Considering that resistance exercise has shown positive effects on several menopause-related diseases,<sup>21,22</sup> it has been prescribed as a complementary tool to aerobic exercise training. In this sense, the several guidelines suggest that the combination of these two approaches (aerobic plus resistance training) can maximize not only musculoskeletal

benefits, but also cardiovascular risk in this population.<sup>23</sup> However, few studies have dealt with the cardiovascular effects of combined exercise training in hypertensive post-menopausal women.

Therefore, we hypothesized that cardiovascular autonomic dysfunction plays an important role on the management of inflammation and oxidative stress, and that these dysfunctions can be modulated by combined exercise training. To address this issue, the purpose of the present study was to investigate the effects of combined exercise training on hemodynamic, cardiovascular autonomic dysfunction, inflammation and oxidative stress in hypertensive ovariectomized rats.

## **METHODS**

*Animals and groups.* Seven normotensive Wistar rats (WKY) and twenty one female spontaneously hypertensive rats (SHR) (3 months) were obtained from the Animals Facilities. The animals were freely fed with standard laboratory chow and water and were housed in temperature-controlled rooms (22° C) with a 12: 12-h dark-light cycle. The rats were assigned into 4 groups (n=7 each): sedentary control (C), sedentary hypertensive (H), sedentary hypertensive ovariectomized (HO), and combined trained hypertensive ovariectomized (THO). All surgical procedures and protocols were approved by the Ethics Committee of Universidade Nove de Julho (An0019/2013) and were conducted in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

*Combined exercise training.* Combined exercise training was performed on a motor treadmill (aerobic training) and in a ladder adapted to rats (resistance training), in alternate days, 5 days/week, for 8 weeks. For accuracy of prescription, maximal (running or load) tests

were performed at the beginning of the experiment and in the 4th and 8th weeks of the training protocol.

Aerobic exercise training. All animals were adapted to walk and run in motorized treadmill (10 min/day; 0.3 km/h) for 5 consecutive days before the maximal running test. The aerobic exercise test was performed in sedentary and trained rats as described in detail in a previous study.<sup>24</sup> Aerobic exercise training was performed on a treadmill (Imbramed TK-01, Brazil) at low-to-moderate intensity (~50-60% maximal running speed) for 1 h a day, 5 days a week for 8 weeks. In order to provide a similar environment and manipulation, sedentary animals were placed on the stationary treadmill three times a week.

Resistance exercise training. 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 maximal load test. 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. The dynamic resistance exercise test consisted of an initial load of 75% of the body weight. After a 2-min resting period, a progressively increased with 15% of body weight was applied in the subsequent climbs, as previously described in details elsewhere.<sup>25</sup> The protocol 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 during 8 weeks, for 5 days a week and at moderate intensity (1st-2nd wk.: 30-40 %; 3th-5th wk.: 40-50 %; 6th-8th wk.: 40-60 % of the maximal load) with 15 climbs per session and a 1-min time interval between climbs, as previously described in details elsewhere.<sup>25</sup> Importantly, to maintain the standard of 6 climbs for maximal load, load increment was adjusted to 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. The purpose was to determine both physical capacity and exercise training intensity.<sup>26</sup>

*Cardiovascular measurements.* On the day following the last exercise session, rats were anaesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (90 mg/kg) and xylazine (20 mg/kg) to implant 2 polyethylene-tipped Tygon cannulas filled with heparinized saline into the right carotid artery and jugular vein for direct measurements of arterial pressure (AP) and drug administration, respectively. Cannulated rats were treated with antibiotic and analgesic and allowed to recover for 1 day. All efforts were made to avoid suffering. Throughout the experiment, rats received food and water ad libitum; they remained conscious in their cages and were allowed to move freely during hemodynamic measurements. To avoid detraining, hemodynamic measurements were made in conscious, freely moving rats in their home cage 24 h after surgery.<sup>27,28</sup> The arterial cannula was connected to a transducer (Blood Pressure XDCR, Kent® Scientific, USA), and AP signals were recorded for a 30-min period using a microcomputer equipped with an analog-to-digital converter (CODAS, 2Kz, DATAQ Instruments, USA). The recorded data were analyzed on a beat-to-beat basis to quantify changes in systolic (SAP), diastolic (DAP) and mean AP (MAP) and heart rate (HR).

*Cardiovascular autonomic measurements.* After basal AP measurements, baroreflex sensitivity was evaluated using increasing doses of phenylephrine (0.5 to 2.0 µg/mL) and sodium nitroprusside (5 to 20 µg/mL), given as sequential bolus injections (0.1 mL) to produce AP rise and fall responses ranging from 5 to 40 mmHg each. A 3- to 5-min interval between doses was necessary for AP to return to baseline. Peak increases or decreases in mean AP after phenylephrine or sodium nitroprusside injection and the corresponding peak reflex changes in HR were recorded for each drug dose.<sup>29,28</sup>

Standard deviation from the mean of three time series of 5 min for each animal was used to obtain the pulse interval (PI) and SAP variabilities in time-domain. For frequency

domain analysis, the same time series of PI and SAP were cubic spline interpolated (250 Hz) and cubic spline 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 were calculated by power spectrum density integration within each frequency bandwidth, using a customized routine (MATLAB 6.0, Mathworks). The coherence between the PI and SAP signal variability was assessed through cross-spectral analysis.<sup>27</sup>

*Tissue preparation.* After cardiovascular measurements, the animals were killed by decapitation, the heart (ventricles) and kidney (right) were immediately removed, rinsed in saline, and trimmed to remove fat tissue and visible connective tissue.

*Inflammatory markers.* IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  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 evaluations.* Tissues were then cut into small pieces, placed in ice-cold buffer, and homogenized in an ultra-Turrax blender with 1g of tissue per 5mL of 120mmol/L KCl and 30nmol/L phosphate buffer, pH 7.4. Homogenates were centrifuged at 600g for 10 minutes at 4°C. Protein was determined by the method of Lowry et al. (1951)<sup>30</sup> using bovine serum albumin as the standard.

#### 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. This mixture was then centrifuged (10006 g, 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. Commercially available malondialdehyde (MDA) was used as a standard, and the results are expressed as nanomoles per milligram of protein.<sup>31</sup>

#### Protein carbonylation

This method uses the a reaction of protein carbonyl groups with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) to form a 2,4-dinitrophenylhydrazone , which can be measured spectrophotometrically at 360nm as previously described.<sup>32</sup>

#### Total radical- trapping antioxidant potential

TRAP, wich indicates the total antioxidant capacity present in a homogenate was measured by chemiluminescence using 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) (ABAP, a source of alkyl peroxy free radicals) and luminal. A mixture consisting of 20 mmol.L-1luminol, and 50 mmol.l -1phosphate buffer (pH= 7.4) was incubated to achieve a steady-state luminescence from the free radical-mediated luminal oxidation. A calibration curve was obtained by using different concentrations (between 0.2 and 1  $\mu$ mol.L-1) of Trolox (hydrosoluble vitamim E).<sup>33</sup> Luminescence was measured in a liquid scintillation counter using the out-of-coincidence mode and the results were expressed in milimoles per litre of Trolox.

#### Antioxidant enzyme

Superoxide dismutase activity was measured spectrophotometrically by the rate inhibition of pyrogallol auto-oxidation at 420 nm.<sup>34</sup> Enzyme activity was reported as U/mg protein. CAT concentration was measured by monitoring the decrease in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration at 240 nm, and the results are reported as pmol of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/mg protein.<sup>35</sup>

*Statistical Analysis.* Data are presented as mean  $\pm$ SEM. Levene's test was used to assess variance homogeneity. Comparisons between the 4 groups were performed with one-way ANOVA, followed by Student Newmann Keuls post hoc test. The significance level was established at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### *Body weight*

At the beginning of the protocol, the C group presented higher body weight than hypertensive groups (C:  $216 \pm 5$  vs. H:  $188 \pm 2$ ; HO:  $191 \pm 2$  and THO:  $191 \pm 2$  g,  $p < 0.05$ ); however, no difference in body weight was found between hypertensive groups. All groups showed a significant increase in body weight at the end of the protocol (C:  $280 \pm 5$ ; H:  $197 \pm 2$ ; HO:  $264 \pm 3$  and THO:  $255 \pm 3$  g,  $p < 0.05$ ). However, THO animals ( $255 \pm 3$  g) showed reduced body weight when compared to HO group at the end of the protocol ( $264 \pm 3$  g,  $p < 0.05$ ).

### *Maximal exercise capacity*

At the beginning of the experiment, the maximal running test on the treadmill (H:  $2.4 \pm 0.6$ ; HO:  $2.5 \pm 0.6$  and THO:  $2.4 \pm 0.4$  km/h,  $p > 0.05$ ) and maximal load test in the ladder (H:  $315 \pm 19$ ; HO:  $320 \pm 13$  and THO:  $329 \pm 7.3$  g,  $p > 0.05$ ) were similar among the hypertensive groups. However, the all hypertensive groups showed a higher maximal speed of running and a higher maximal load test when compared to C animals ( $1.8 \pm 0.7$  km/h,  $p < 0.05$  and  $128 \pm 6$  g,  $p < 0.05$ , respectively).

After 8 weeks of combined exercise training, the THO group demonstrated an increase in maximal speed of running when compared to the other groups (THO:  $3.4 \pm 0.5$  vs. C:  $1.8 \pm 1.5$ ; H:  $2.4 \pm 0.6$  and HO:  $2.3 \pm 0.6$  km/h,  $p < 0.05$ ). The same was observed in the maximal load in the ladder (THO:  $500 \pm 10.3$  vs. C:  $204 \pm 11$ ; H:  $360 \pm 20$  and HO:  $335 \pm 24$  g,  $p < 0.05$ ).

### *Cardiovascular measurements*

Hemodynamic data are shown in Table 1. SHR had well-established showed higher MAP than WKY. Ovariectomy induced an additional MAP increase in hypertensive rats (HO



vs. H group). Combined exercise training also induced MAP reduction when compared to both H and HO groups. Combined exercise training was also able to induce resting bradycardia in THO group (Table 1).

#### *Cardiovascular autonomic evaluations*

The H and HO groups presented reduced tachycardic (H:  $1.9 \pm 0.17$  and HO:  $1.4 \pm 0.17$  vs. C:  $4.4 \pm 0.34$  bpm/mmHg,  $p < 0.05$ ) and bradycardic responses (H:  $-1.1 \pm 0.08$  and HO:  $-1.0 \pm 0.09$  vs. C:  $-1.5 \pm 0.08$  bpm/mmHg,  $p < 0.05$ ) when compared to C group. However, after combined exercise training, the THO group showed increased tachycardic responses (THO:  $2.4 \pm 0.1$  bpm/mmHg,  $p < 0.05$ ) when compared to HO group (Figure 1A). In a similar way, THO group showed increased bradycardic responses (HT:  $-1.3 \pm 0.09$  bpm/mmHg,  $p < 0.05$ ) when compared to both H and HO groups (Figure 1A).

The hypertensive groups (H and HO) showed a decrease in VAR-PI and RMSSD when compared to C group, as shown in Table 2. However, after combined exercise protocol, the THO group showed an increase in VAR-PI when compared to sedentary hypertensive groups (THO vs. HO and H groups) (Table 2). No significant differences between groups were observed on LF and HF band of PI. The THO group presented a decrease in LF/HF ratio when compared to the other groups (Table 2).

Ovariectomy induced an additional increase in VAR-SAP and LF band of SAP in HO group when compared to C and H groups (Table 2). However, combined exercise training was able to reduce these additional increments in both variables (Table 2).

#### *Cardiac inflammatory evaluation*

Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) was higher in sedentary hypertensive groups (H and HO) when compared to C group; however, this was not observed in THO group. Interleukin-

10 (IL-10) was significantly lower in both HO and THO groups when compared to C group (Table 3).

#### *Cardiac Oxidative stress evaluations*

Cardiac thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were increased in H group in relation to C group (H:  $5.37 \pm 1.11$  vs. C:  $1.72 \pm 0.27$   $\mu\text{mol/mg protein}$ ,  $p < 0.05$ ). Ovariectomy led to an additional increase in cardiac TBARS values (HO:  $9.18 \pm 0.81$   $\mu\text{mol/mg protein}$ ,  $p < 0.05$ ) in relation to the other studied groups. However, the combined exercise training was able to reduce these values (THO:  $3.84 \pm 0.43$   $\mu\text{mol/mg protein}$ ,  $p < 0.05$ ) when compared to the HO group (Figure 2A).

Carbonyl values in cardiac tissue were significantly higher in HO group when compared with C and H groups. However, the THO group cardiac carbonyls were significantly lower than in the HO group (Table 4).

Total radical- trapping antioxidant potential (TRAP) in cardiac tissue was increased in HO group when compared to both C and H groups (HO:  $16.88 \pm 2.56$  vs. C:  $7.37 \pm 1.19$  and H:  $6.22 \pm 0.47$   $\mu\text{M Trolox}$ ,  $p < 0.05$ ). However, in the THO group (THO:  $29.79 \pm 1.22$   $\mu\text{M Trolox}$ ,  $p < 0.05$ ). TRAP values in cardiac tissue were significantly higher when compared to the other groups (Figure 2B).

Cardiac SOD activity was significantly lower in the H, HO and THO groups when compared to C group. Myocardial CAT activity was decreased in H group in relation to C group. However, CAT activity was significantly higher in the HO and THO groups when compared to C group (Table 4).

### *Renal Oxidative stress evaluations*

Renal TBARS values were significantly higher in the H group when compared to C group (H:  $2.60 \pm 0.31$  vs. C:  $1.69 \pm 0.09$   $\mu\text{mol/mg}$  protein,  $p < 0.05$ ). Ovariectomy induced an additional increase in renal TBARS (HO:  $4.58 \pm 0.40$   $\mu\text{mol/mg}$  protein,  $p < 0.05$ ) when compared to the other studied groups. However, the combined exercise training (THO:  $2.68 \pm 0.21$   $\mu\text{mol/mg}$  protein,  $p < 0.05$ ) was able to reduce these values in ovariectomized hypertensive rats (vs. HO group) (Figure 2C, Table 4).

Carbonyl values in renal tissue were significantly higher in H group when compared to C group. Ovariectomy (HO group) induced an additional increase in renal carbonyl values. However, carbonyl values in renal tissue were significantly lower in the THO group when compared to the other groups.

Renal TRAP values were significantly higher in the THO group when compared to the other studied groups (THO:  $140.7 \pm 8.62$  vs. C:  $81.60 \pm 5.78$ ; H:  $92.94 \pm 7.55$  and HO:  $80.03 \pm 9.87$   $\mu\text{M}$  Trolox,  $p < 0.05$ ) (Figure 2D).

Renal SOD activity was significantly higher in both H and HO groups when compared to C group. However, the THO group showed a significant increase in renal SOD when compared to the other groups. Renal CAT activity was significantly higher in THO group when compared to the other studied groups (Table 4).

## **DISCUSSION**

Given the increased prevalence of hypertension in post-menopausal women, and the fact that autonomic dysfunction, oxidative stress and chronic inflammation contribute to the genesis of hypertension, we aimed to investigate whether these dysfunctions can be

modulated by combined exercise training (aerobic plus resistance, in alternate days) in hypertensive ovariectomized rats. Three important insights emerged from the present study. First, the THO rats had a reduced AP and HR at rest when compared to their sedentary peers. Secondly, the beneficial adaptation in BrS and in cardiovascular autonomic modulation was more prominent in trained rats than in the sedentary ones. Finally, the major finding of this investigation is that these improvements in BrS and cardiovascular autonomic modulation after exercise training could partly account for the decrease in both TNF alfa and oxidative stress in THO animals.

Reduced baroreflex sensitivity (BrS) and heart rate variability are strong predictors of cardiac mortality<sup>36</sup> and were observed in both hypertensive humans<sup>37</sup> and animals.<sup>18</sup> In fact, in the present study, we observed decreased BrS in sedentary SHR animals (H and HO groups) along with increased AP levels, thus corroborating some previous studies.<sup>18,20</sup>

Interestingly, we observed that combined exercise training led to an improvement in tachycardic and bradycardic responses to sequential bolus injection of sodium nitroprusside and phenylephrine, respectively, associated with a reduction in THO animals. These findings are similar to those observed after aerobic exercise training protocols in male and female-ovariectomized SHR rats.<sup>18,27,33</sup>

Furthermore, besides BrS improvement, the THO group showed a more effective adaptation to vascular autonomic modulation (VAR-SAP and LF-SAP), to total HR variance (VAR-PI), to cardiac vagal cardiac modulation (RMSSD), and to cardiac sympatho-vagal balance when compared to SHR sedentary animals. These changes have probably contributed to AP and HR reduction after combined exercise training protocol in hypertensive ovariectomized rats. Therefore, we suggest that combined exercise training at low/moderate intensity may promote a reduction of cardiac and vascular sympathetic modulation, while increasing parasympathetic modulation, thus improving cardiovascular autonomic balance.

Some studies have demonstrated an improvement in cardiovascular autonomic modulation in male and ovariectomized SHR after aerobic exercise training.<sup>18,27,38</sup> Recently, similar findings have been reported for infarcted rats after resistance exercise training.<sup>39</sup> However, this is the first study to demonstrate a reduction in AP associated with an improvement in cardiovascular autonomic control/modulation promoted by combined exercise training in a model associating hypertension and menopause.

Moreover, in our study, both H and HO groups showed an increase in cardiac TNF- $\alpha$  levels, which may explain the increased oxidative stress, as shown by TBARS and carbonyl enhancement in cardiac and renal tissues. These results corroborate previous findings, which reported that TNF- $\alpha$  induced an increase in oxidative stress.<sup>40</sup>

Another candidate mechanism which could account for the increase in oxidative stress parameters would lay in the imbalance between oxidant and antioxidant forces, as observed previously.<sup>18</sup> In fact, the H and HO groups showed an increase in carbonyl levels (in cardiac and renal tissues) and a decrease in catalase (in cardiac tissue) when compared to normotensive animals (C group).

Furthermore, we observed an additional impairment in the parameters of oxidative stress damage (TBARS and CARB) in HO group when compared to H group. This additional impairment could be partly explained by the association between hypertension and ovarian hormone deprivation.<sup>41</sup> Interestingly, the combined exercise training was able to reduce, at least in part, the oxidative stress damage in cardiac and renal tissues promoted by the association of hypertension and ovariectomy, as demonstrated by the reduction in carbonyl and TBARS levels and the increase in catalase and TRAP levels (in both cardiac and renal tissues) in THO group (vs. H and HO groups). These results indicate that combined exercise training is effective in reducing oxidative stress in hypertensive ovariectomized rats. In fact, previous studies have shown that moderate intensity aerobic exercise training on treadmill

was able to reduce oxidative stress.<sup>17,18</sup> Several factors, including an increase in antioxidant enzymes (CAT and SOD) and nonenzymatic antioxidants (TRAP) could be implicated in the beneficial response to chronic exercise.

Moreover, in the present study, we showed that SHR animals have lower body weight than control animals (H vs. C group); this is probably due to the SHR lineage.<sup>42</sup> However, we observed that ovariectomy led to an increase in body weight in HO group, thus corroborating previous studies of our group with ovariectomized female rats.<sup>18,27,28</sup> On the other hand, exercise training has been regarded as an approach which favors control of body weight, either by reducing it or by managing weight increase. In the present study, the combined exercise training was able to reduce body weight in THO group in relation to HO group. We also observed an improvement in physical capacity as evaluated by their response to the maximal treadmill test and maximal load test in the ladder in THO group, as demonstrated previously.<sup>18,25,27,39</sup> Additionally, we observed resting bradycardia in THO group, which clearly demonstrates the effectiveness of the exercise protocol used in the present study.

In conclusion, combined exercise training was able to reduce AP associated with benefits for BrS, improve cardiovascular autonomic modulation, and decrease inflammation and oxidative stress in hypertensive ovariectomized rats. These results suggest a positive role of combined exercise training in the management of cardiovascular risk in the presence of hypertension and ovarian hormones deprivation.

### **Perspectives**

In the present study we used an ovariectomized rat model of menopause to demonstrate the utility of combined (resistance+aerobic) exercise training in minimizing the long term effects of hypertension. These non-pharmacological approaches improved

resting hemodynamic status and cardiovascular control of circulation, suggesting a homeostatic role for exercise in hypertension induced-autonomic imbalance. This study shed light on a relatively large population of women who are postmenopausal with hypertension and with high cardiovascular risk. The postulate mechanism involved in exercise training induced-cardiovascular benefits was the inflammation and oxidative stress cardiac and renal profile improvement. To advance the field, the next steps will be to complete mechanistic studies to validate the correlative changes in cardiovascular control that accompany combined exercise training and to then develop therapeutic strategies to target the exercise benefits in postmenopausal hypertensive women.

#### **Acknowledgments**

This study was supported by Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 2012/20141-5; 2011/16441-0) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). MCI and KDA are recipients of CNPq-BPQ fellowships.

#### **No Disclosures**

#### **REFERENCES**

1. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, et al. Heart disease and stroke statistics—2013 update: a report from the American heart association. *Circulation*. 2013; 127:e6–e245.
2. Cutler JA, Sorlie PD, Wolz M, Thom T, Fields LE, Roccella EJ. Trends in hypertension prevalence, awareness, treatment, and control rates in United States adults between 1988–1994 and 1999–2004. *Hypertension*. 2008; 52:818–827.

3. Maranon RO, Lima R, Mathbout M, Do Carmo JM, Hall JE, Roman RJ, Reckelhoff JF. Postmenopausal hypertension: role of the sympathetic nervous system in an animal model. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014; 306(4):R248-56.
4. Hogarth AJ, Graham LN, Corrigan JH, Deuchars J, Mary DA, Greenwood JP. Sympathetic nerve hyperactivity and its effect in postmenopausal women. *J Hypertens*. 2011; 29:2167–2175.
5. Barbosa Neto O, Abate DT, Marocolo Júnior M, Mota GR, Orsatti FL, Rossi e Silva RC, Reis MA, da Silva VJ. Exercise training improves cardiovascular autonomic activity and attenuates renal damage in spontaneously hypertensive rats. *J Sports Sci Med*. 2013; 12(1):52-59.
6. Sousa JB, Vieira-Rocha MS, Sá C, Ferreirinha F, Correia-De-Sá P, Fresco P, Diniz C. Lack of endogenous adenosine tonus on sympathetic neurotransmission in spontaneously hypertensive rat mesenteric artery. *Plos One*. 2014; 9(8). doi: 10.1371/journal.pone.0105540.
7. Watson T, Goon PK, Lip GY. Endothelial progenitor cells, endothelial dysfunction, inflammation, and oxidative stress in hypertension. *Antioxid Redox Signal*. 2008; 10:1079–88.
8. Göçmen AY, Celikbilek A, Hacıoğlu G, Tanik N, Açar A, Yargıçoğlu P, Gümüşlü S. The relationship between oxidative stress markers and visual evoked potentials in different hypertension models. *Anadolu Kardiyol Derg*. 2014; 14(6):498-504.
9. Kaur K, Sharma AK, Dhingra S, Singal PK. Interplay of TNF-alpha and IL-10 in regulating oxidative stress in isolated adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2006; 41:1023–1030.
10. Crowley SD. The cooperative roles of inflammation and oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 20(1):102-20.



11. Bjorkbacka H. Multiple roles of Toll-like receptor signaling in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2006; 17:527–533.
12. Sima AV, Stancu CS, Simionescu M. Vascular endothelium in atherosclerosis. *Cell Tissue Res.* 2009; 335:191–203.
13. Studinger P, Mersich B, Lenard Z, Somogyi A, Kollai M. Effect of vitamin E on carotid artery elasticity and baroreflex gain in young, healthy adults. *Autonom Neurosci.* 2004; 113:63–70.
14. Yogalingam G, Hwang S, Ferreira JC, Mochly-Rosen D. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) phosphorylation by protein kinase C $\delta$  (PKC $\delta$ ) inhibits mitochondria elimination by lysosomal-like structures following ischemia and reoxygenation-induced injury. *J Biol Chem.* 2013; 288(26):18947-60.
15. Pescatello LS, Franklin BA, Fagard R, Farquhar WB, Kelley GA, Ray CA. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and hypertension. *Med Sci Sports Exerc.* 2004; 36(3):533-53.
16. Cornelissen VA, Smart NA. Exercise training for blood pressure: a systematic review and meta-analysis. *J Am Heart Assoc.* 2013; 2:1-9.
17. Irigoyen MC, Paulini J, Flores LJ, Flues K, Bertagnolli 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(4):998-1003.
18. Bertagnolli M, Campos C, Schenkel PC, De Oliveira VL, De Angelis K, Bello- Klein A, Rigatto K, Irigoyen MC. Baroreflex sensitivity improvement is associated with decreased oxidative stress in trained spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens.* 2006; 24:2437-2443.

19. Pan YX, Gao L, Wang WZ, Zheng H, Liu D, Patel KP, Zucker IH, Wang W. Exercise training prevents arterial baroreflex dysfunction in rats treated with central angiotensin II. *Hypertension*. 2007; 49(3):519-27.
20. Masson GS, Costa TS, Yshi I L, Fernandes DC, Soares PP, Laurindo FR, Scavone C, Michelini LC. Time-dependent effects of training on cardiovascular control in spontaneously hypertensive rats: role for brain oxidative stress and inflammation and baroreflex sensitivity. *PLoS One*. 2014; 9(5):e94927. doi:10.1371/journal.pone.0094927.
21. Brochu M, Malita MF, Messier V, Doucet E, Strychar I, Lavoie JM, Prud'homme D, Rabasa-Lhoret R. Resistance training does not contribute to improving the metabolic profile after a 6-month weight loss program in overweight and obese postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94:3226–3233.
22. Zaki ME. Effects of whole body vibration and resistance training on bone mineral density and anthropometry in obese postmenopausal women. *J Osteoporos*. 2014; 2014:702589. doi: 10.1155/2014/702589.
23. 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.
24. 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.
25. Sanches IC, Conti FF, Sartori M, Irigoyen MC, De Angelis K. Standardization of resistance exercise training: effects in diabetic ovariectomized rats. *Int Journal of Sports Med*. 2013; 34:1-7.

26. Cornelissen VA, Fagard RH, Coeckelberghs E, Vanhees L. Impact of resistance training on blood pressure and other cardiovascular risk factors: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Hypertension*. 2011; 58(5):950-958.
27. Sanches IC, de Oliveira Brito J, Candido GO, da Silva Dias D, 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.
28. Flues K, Paulini J, Brito S, Sanches IC, Colombo CF, Irigoyen MC, De Angelis K. Exercise training associated with strogen therapy induced cardiovascular benets after ovarian hormones deprivation. *Maturitas*. 2010; 65:267–271.
29. Rabelo E, De Angelis K, Bock P, Fernandes TG, Cervo F, Bello´-Klein A, Clausell N, Irigoyen MC. Baroreflex sensitivity and oxidative stress in adriamycin- induced heart failure. *Hypertension*. 2001; 38:576–580.
30. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193:265–275.
31. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979; 95(2):351-8.
32. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol*. 1994; 233:357-363.
33. Silva G, Brum PC, Negrão CE, Krieger EM. Acute and chronic effects of exercise on baroreflexes in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997; 30:714-719.
34. Marklund S, Orelund L, Perdahl E, Winblad B. Superoxide dismutase activity in brains from chronic alcoholics. *Drug Alcohol Depend*. 1983; 12:209–215.
35. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984; 105:121–126.

36. La Rovere MT, Bersano C, Gnemmi M, Specchia G, Schwartz PJ. Exercise-induced increase in baroreflex sensitivity predicts improved prognosis after myocardial infarction. *Circulation*. 2002; 106:945–949.
37. Bristow JD, Gribbin B, Honour AJ, Pickering TG, Sleight P. Diminished baroreflex sensitivity in high blood pressure and ageing man. *J Physiol*. 1969; 202:45P–46P.
38. Moraes-Silva IC, De La Fuente RN, Mostarda C, Rosa K, Flues K, Damaceno-Rodrigues NR, Caldini EG, De Angelis K, Krieger EM, Irigoyen MC. Baroreflex deficit blunts exercise training –induced cardiovascular and autonomic adaptations in hypertensive rats. *Clin and Exper Pharma and Physiol*. 2010; 37:114-120.
39. Grans CF, Feriani DJ, Absamra ME, Rocha LY, Carrozzi NM, Mostarda C, Figueroa DM, Angelis KD, Irigoyen MC, Rodrigues B. Resistance training after myocardial infarction in rats: its role on cardiac and autonomic function. *Arq Bras Cardiol*. 2014; 103(1):60-8.
40. Dhingra S, Sharma AK, Singla DK, Singal PK. p38 and ERK1/2 MAPKs mediate the interplay of TNF-alpha and IL-10 in regulating oxidative stress and cardiac myocyte apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 293:3524–3531.
41. Barp J, Sartório LC, Campos C, Llesuy SF, Araujo AS, Bello-Klein A. Influence of ovariectomy on cardiac oxidative stress in a renovascular hypertension model. *J. Physiol. Pharmacol*. 2012; 90:1229-34.
42. Cicogna AC, Brooks WW, Hayes JA, Robinson KG, Sen S, Conrad CH, Bing OH. Effect of chronic colchicine administration on the myocardium of the aging spontaneously hypertensive rat. *Mol cell biochem*. 1997; 166(1-2):45-54.

## NOVELTY AND SIGNIFICANCE

- Dynamic moderate intensity combined (resistance + aerobic) exercise training led to arterial pressure reduction, improvement in autonomic nervous system control of circulation probably associated with decrease in cardiac and renal inflammation and free radicals induced damage, thus minimized the long term effects of hypertension after ovarian hormones deprivation in an experimental model.
- In a model of hypertension associated with menopause no adverse effects were observed after dynamic moderate intensity resistance + aerobic exercise training;
- In summary, this study provided experimental evidences that dynamic moderate intensity combined exercise training are useful non-pharmacological strategies to management risk factors after menopause in presence of hypertension. Future clinical studies should be carried on to confirm these results.

**Figure Captions.**

Figure 1. BrS evaluated by bradycardic and tachycardic responses. C: sedentary control (n=7); H: sedentary hypertensive (n=7); HO: sedentary hypertensive ovariectomized (n=7); THO: combined trained hypertensive ovariectomized (n=7). \*P < 0.05 vs. C; # P < 0.05 vs. H; † P < 0.05 vs. HO.

Figure 2. **A** Cardiac TBARS, **B** Cardiac TRAP, **C** Renal TBARS and **D** Renal TRAP. C: sedentary control (n=7); H: sedentary hypertensive (n=7); HO: sedentary hypertensive ovariectomized (n=7); THO: combined trained hypertensive ovariectomized (n=7). \*P < 0.05 vs. C; # P < 0.05 vs. H; † P < 0.05 vs. HO.

**Table 1.** Hemodynamic and cardiac autonomic control in C: sedentary control (n=7); H: sedentary hypertensive (n=7); HO: sedentary hypertensive ovariectomized (n=7); THO: combined trained hypertensive ovariectomized (n=7).

Measurement	C	H	HO	THO
MAP (mmHg)	113±1.5	165±3*	176±4*#	155±3*#†
DAP (mmHg)	95±2	145±3*	154±3.4*#	133±3*#†
SAP (mmHg)	128±2	192±4*	200±5*	177±4*#†
HR (bpm)	366±11	359±7	355±6	330±6*#†

Data are reported as mean± SEM. \* p < 0.05 vs. C; # p < 0.05 vs. H; † p < 0.05 vs. HO. MAP: mean arterial pressure; SAP: systolic arterial pressure; DAP: diastolic arterial pressure; HR: heart rate.

**Table 2.** Cardiovascular autonomic modulation in C: sedentary control (n=7); H: sedentary hypertensive (n=7); HO: sedentary hypertensive ovariectomized (n=7); THO: combined trained hypertensive ovariectomized (n=7).

Measurement	C	H	HO	THO
<b>HRV</b>				
<b>VAR-PI</b> (ms <sup>2</sup> )	68.07±6.92	48.66±3.31*	49.77±6.74*	71.04±4.54#†
<b>RMSSD</b> (ms)	7.41±0.83	5.23±0.40*	4.56±0.49*	6.06±0.58
<b>%LF</b> (nu)	24.6±1.40	23.08±1.08	28.08±2.58	22.26±1.67
<b>%HF</b> (nu)	75.4±1.40	76.92±1.08	71.92±2.58	77.74±1.67
<b>LF/HF</b>	0.34±0.02	0.34±0.02	0.43±0.04	0.29±0.03*#†
<b>BPV</b>				
<b>VAR-SAP</b> (mmHg <sup>2</sup> )	23.69±0.45	34.09±2.37*	50.78±4.61*#	30.09±2.03†
<b>LF</b> (mmHg <sup>2</sup> )	2.90±0.44	5.46±0.53*	7.69±0.46*#	5.72±0.60*†

Data are reported as mean ± SEM. \* p < 0.05 vs. C; # p < 0.05 vs. H; † p < 0.05 vs. HO. Heart rate (HRV) and systolic blood pressure (BPV) variability computed from 0.20 to 3 Hz (total power).

VAR: total variance; LF: low-frequency band (0.20-0.75 Hz); HF: high-frequency band (HF: 0.75-3 Hz).



**Table 3.** Inflammatory response in cardiac tissue in C: sedentary control (n=7); H: sedentary hypertensive (n=7); HO: sedentary hypertensive ovariectomized (n=7); THO: combined trained hypertensive ovariectomized (n=7).

Measurement	C	H	HO	THO
<b>TNF-<math>\alpha</math></b> (pg/mg protein)	36.05 $\pm$ 5.1	61.71 $\pm$ 7.2*	60.72 $\pm$ 8.4*	49.5 $\pm$ 4.0
<b>IL-10</b> (pg/mg protein)	59.05 $\pm$ 7.05	54.19 $\pm$ 10.23	33.16 $\pm$ 5.98*	29.45 $\pm$ 4.35*

Data are reported as mean $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. C. TNF- $\alpha$ : Tumour necrosis factor-  $\alpha$ ; IL-10: interleukin-10.

**Table 4.** Cardiac and renal oxidative stress in C: sedentary control (n=7); H: sedentary hypertensive (n=7); HO: sedentary hypertensive ovariectomized (n=7); THO: combined trained hypertensive ovariectomized (n=7).

Measurement	C	H	HO	THO
<b>Cardiac</b>				
CARB (nmol/mg protein)	3.00±0.23	5.78±0.26*	7.47±0.55*#	4.93±0.42*†
CAT (pmol/mg protein)	0.84±0.04	0.31±0.04*	0.45±0.05*#	0.51±0.04*#
SOD (USOD/mg protein)	16.21±1.10	11.13±0.35*	10.73±0.46*	11.88±0.83*
<b>Renal</b>				
CARB (nmol/mg protein)	1.97±0.21	4.68±0.15*	3.71±0.33*#	2.95±0.22*#†
CAT (pmol/mg protein)	1.72±0.16	1.77±0.23	1.60±0.19	3.67±0.31*#†
SOD (USOD/mg protein)	10.75±0.73	12.69±0.43*	13.39±0.41*	16.44±0.76*#†

Data are reported as mean± SEM. \* p < 0.05 vs. C; # p < 0.05 vs. H; † p < 0.05 vs. HO. CARB: carbonyls; CAT: catalase; SOD: Superoxide dismutase; GSH/GSSG ratio (GSSG: Oxidized glutathione form; GSH: reduced glutathione form).

Figure 1

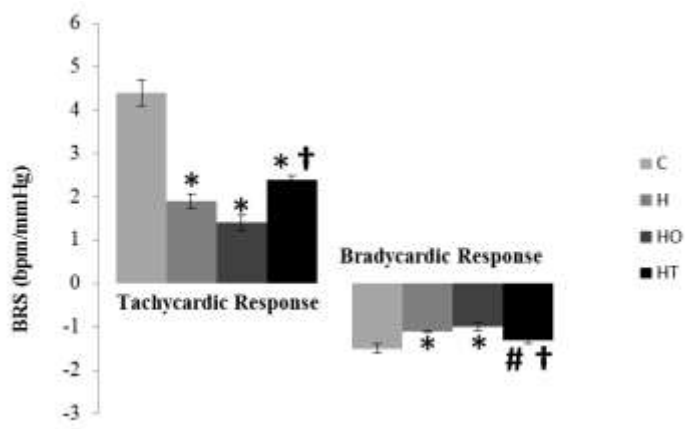
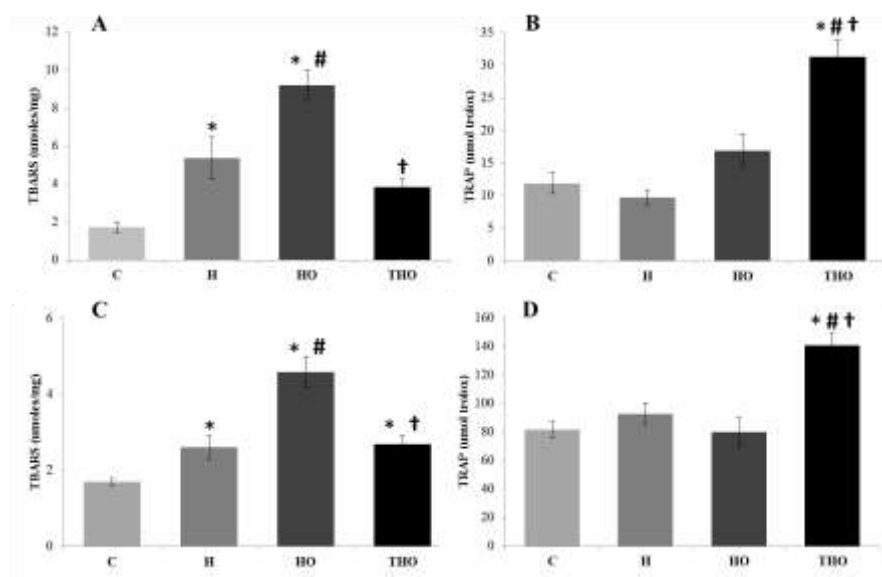


Figure 2



## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo evidenciam um aumento de peso após a privação dos hormônios ovarianos corroborando com dados anteriores do nosso grupo (Irigoyen et al., 2005; Flues et al., 2010; Sanches et al., 2012). Esse aumento de peso nas ratas espontaneamente hipertensas submetidas à privação dos hormônios ovarianos é semelhante à observada em mulheres após a menopausa. De fato, a privação dos hormônios ovarianos induz aumento da ingestão de alimentos, do peso corporal, da resistência à insulina (Latour et al., 2001; Irigoyen et al., 2005), sarcopenia e osteopenia (Leite et al., 2010).

Por outro lado, o treinamento físico tem sido sugerido como uma abordagem favorável para redução e/ou controle do aumento de peso corporal, tanto em humanos (Teixeira et al., 2003) quanto em modelo experimental (De Angelis et al., 1997). Neste estudo o treinamento físico combinado foi eficaz em reduzir o peso corporal em relação ao grupo hipertenso ooforectomizado.

Além disto, observamos um aumento da capacidade física ao final do protocolo no grupo THO, evidenciado pelo teste de esforço máximo em esteira e pelo teste de carga máxima em escada. Em um estudo prévio do nosso grupo, demonstramos correlação entre a velocidade atingida no teste de esforço e o consumo de oxigênio em ratos (Rodrigues et al., 2007). Vale ressaltar que o consumo de oxigênio representa hoje não só um indicador de performance, mas um marcador prognóstico em cardiopatas (Armstrong et al., 2005). Resultados semelhantes foram observados no teste de carga máxima em escada nas ratas submetidas ao treinamento físico combinado, corroborando com um estudo do nosso laboratório no qual ratas diabéticas ooforectomizadas aumentaram sua carga máxima ao final do protocolo de treinamento resistido em escada com duração de 8 semanas (Sanches et al., 2013). Desta forma, estes resultados evidenciam a eficiência do protocolo de treinamento físico combinado, uma vez que, a literatura considera a capacidade física um marcador da eficiência do protocolo de treinamento físico,

sendo um achado comum pós treinamento em ratos controles, diabéticos, velhos, infartados e hipertensos (De Angelis et al., 1997; De Angelis et al., 1999; De Angelis et al., 2000; Musch, et al., 1989; Sanches et al., 2013).

Adicionalmente, demonstramos um aumento da PA nos grupo hipertensos sedentário quando comparado ao grupo controle. Esse aumento da pressão arterial tem sido correlacionado a hiperatividade simpática e a prejuízo na sensibilidade dos pressorreceptores (Silva et al., 1997; Gava et al., 1995). Observamos também um aumento adicional da PA no grupo submetido à privação dos hormônios ovarianos, corroborando com estudos anteriores do nosso grupo em ratas Wistar e SHR submetidas à ooforectomia (Irigoyen et al., 2005; Flues et al., 2010, Sanches et al., 2013), acompanhado pelo aumento da modulação simpática vascular (VAR-PAS e BF-PAS) e de prejuízo na sensibilidade dos pressorreceptores.

De forma importante, no presente estudo observou-se após 8 semanas de treinamento físico combinado (aeróbico + resistido) uma redução nos valores pressóricos, bem como bradicardia de repouso nas ratas hipertensas ooforectomizadas. De forma semelhante, nosso grupo observou em um estudo anterior redução da pressão arterial média em ratas ooforectomizadas treinadas (Irigoyen et al., 2005), bem como em machos SHR (Bertagnolli et al., 2006; Moraes-Silva et al., 2010). Fato esse, pode estar associado à melhora da sensibilidade dos pressorreceptores no grupo submetido à protocolo de treinamento físico aeróbico (Bertagnolli et al., 2006; Moraes-Silva et al., 2010). Neste sentido, um achado importante do presente estudo foi a melhora da sensibilidade dos pressorreceptores no grupo treinado combinado (normalização quanto a resposta bradicárdica e atenuação da disfunção da resposta taquicárdica) em relação ao grupo hipertenso ooforectomizados sedentário (THO).

Além disto, observou-se melhora da modulação autonômica cardiovascular pós treinamento combinado, com normalização da VAR-PAS e com a melhora da modulação simpática vascular (LF-PAS) e vagal cardíaca (RMSSD e VAR-IP). Tais alterações podem ter

colaborado para a redução da pressão arterial e da frequência cardíaca no grupo hipertenso ooforectomizado treinado. É importante ressaltar que o treinamento físico combinado parece ter efeito adicional em relação ao aeróbio, uma vez que induziu redução da PA, o que não foi observado após o treinamento aeróbio em esteira, em outro modelo experimental (Sanches et al., 2012).

As análises de estresse oxidativo no presente trabalho foram realizadas em tecido cardíaco e renal. Sabe-se que o tipo de treinamento físico, bem como suas variáveis, (intensidade e duração) pode influenciar na resposta ao estresse oxidativo (Powers et al., 1999). Desta forma, pouco se sabe sobre os benefícios do treinamento físico combinado em relação estresse oxidativo. No presente estudo, foi observado um aumento do estresse oxidativo nos grupos hipertensos sedentários (aumento de Lipoperoxidação e dano a proteína), o que pode ser explicado pelo aumento do TNF- $\alpha$  (Dhingra et al., 2007) que poderia induzir um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio e suas enzimas antioxidantes (Nordmann, 1994; Campos et al., 2013). Em contrapartida, o treinamento físico combinado foi eficaz em melhorar o perfil de estresse oxidativo, evidenciado por uma melhora no equilíbrio entre espécies reativas de oxigênio e suas defesas antioxidantes no tecido cardíaco (aumento da TRAP e CAT) e no tecido renal (aumento de TRAP, SOD e CAT), ocasionando menor dano (redução de Lipoperoxidação e de dano à proteína vs. HO) bem como pela melhora do perfil inflamatório no grupo THO. Esses achados corroboram com dados previamente publicados nos quais se observou uma redução de estresse oxidativo após treinamento físico aeróbio de baixa intensidade em machos SHR (Bertagnolli et al., 2006) ou fêmeas ooforectomizadas (Irigoyen et al., 2005).

Concluindo, o treinamento físico combinado foi eficaz em reduzir PA associado à melhora do barorreflexo, redução da modulação simpática vascular, do estresse oxidativo e da inflamação em ratos espontaneamente hipertensos ooforectomizados. Esses resultados

sugerem um papel importante do treinamento físico combinado no manejo do risco cardiovascular na presença de hipertensão e privação dos hormônios ovarianos.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ARMSTRONG, K.A.; PRINS, J.B.; BELLER, E.M.; CAMPBELL, S.B.; HAWLEY, C.M.; JOHNSON, D.W.; ISBEL, N.M. Should an oral glucose tolerance test be performed routinely in all renal transplant recipients? **Clin J Am Soc Nephrol**, v.1(1) p. 100-8, 2005.

ARNAL, J.F.; SCARABIN, P.Y.; TREMOLIERES, F.; LAURELL, H.; GOURDY, P. Estrogens in vascular biology and disease: Where do we stand today? **Curr Opin Lipidol**, v.18(5) p.554-60, 2007.

ARTHUR, H.M.; GUNN, E.; THORPE, K.E.; GINIS, K.M.; MATASEJE, L.; MCCARTNEY, N.; MCKELVIE R.S. Effect of aerobic vs combined aerobic-strength training on 1-year, post-cardiac rehabilitation outcomes in women after a cardiac event. **J Rehabil Med**, v.39(9) p.730-5, 2007.

ASIKAINEM, 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(11) p.753-778, 2004.

BARP, J.; SARTÓRIO, L.C.; CAMPOS, C.; LLESUY, S.F.; ARAUJO, A.S.; BELLO-KLEIN, A. Influence of ovariectomy on cardiac oxidative stress in a renovascular hypertension model. **J Physiol Pharmacol**, v.90(9) p. 1229-34, 2012.

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(12) p.2437-2443, 2006.

BERTAGNOLLI, M.; SCHENKEL, P.C.; CAMPOS, C.; MOSTARDA, C.T.; CASARINI, D.E.; BELLÓ-KLEIN, A.; IRIGOYEN, M.C.; RIGATTO, K. Exercise training reduces sympathetic modulation on cardiovascular system and cardiac oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. **Am J Hypertens**, v.21(11) p. 1183-93, 2008.

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(1) p.43-50, 2001.

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

BOUKHRIS, M.; TOMASELLO, S.D.; MARZÀ, F.; BREGANTE, S.; PLUCHINOTTA, F.R.; GALASSI, A.R. Coronary Heart Disease in Postmenopausal Women with Type II Diabetes Mellitus and the Impact of Estrogen Replacement Therapy: A Narrative Review. **Int J Endocrinol**, 2014 doi: 10.1155/2014/413920.

BRITO, J.O.; SANCHES, I.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(6) p.1009-15, 1978.

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

BOSSENMAIER, B.; STRACK, V.; STOYANOV, B.; KRUTZFELDT, J.; BECK, A.; LEHMANN, R.; KELLERER, M.; KLEIN, H.; ULLRICH, A.; LAMMERS, R.; HA'RING, H. U. Serine residues 1177/78/82 of the insulin receptor are required for substrate phosphorylation but not autophosphorylation. **Diabetes**, v.49(6) p.889– 895, 2000.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem J**, v.134(3) p. 707-16, 1973.

CAMPOS, J.C.; GOMES, K.M.; FERREIRA, J.C. Impact of exercise training on redox signaling in cardiovascular diseases. **Food Chem Toxicol**, v.62 p. 107-19, 2013 doi: 10.1016/j.fct.2013.08.035.

CARDOSO, C.G.J., GOMIDES R.S.; QUEIROZ, A.C.C.; PINTO, L.G.; LOBO, F.S.; TINUCCI, T.; MION, D.J.; FORJAZ, C.L.M. Acute and chronic effects of aerobic and resistance exercise on ambulatory blood pressure. **Clinics**, v.65(3): 317-325, 2010.

CHURCHILL, E.N.; MURRIEL, C.L.; CHEN, C.H.; MOCHLY-ROSEN, L.I. Reperfusion-induced translocation of  $\Delta$ tapkc to cardiac mitochondria prevents pyruvate dehydrogenase reactivation. **Circulation**, v.97 p.78-85, 2005.

CICOGNA, A.C.; BROOKS, W.W.; HAYES, J.A.; ROBINSON, K.G.; SEN, S.; CONRAD, C.H.; BING, O.H. Effect of chronic colchicine administration on the myocardium of the aging spontaneously hypertensive rat. **Mol cell biochem**, v.166(1-2) p.45-54, 1997.

COIMBRA, R.; SANCHEZ, L.S.; POTENZA, J.M.; ROSSONI, L.V.; AMARAL, S.L.; MICHELINI, L.C. Is gender crucial for cardiovascular adjustments induced by exercise training in female spontaneously hypertensive rats? **Hypertension**. v.52(3):514-21, 2008.

CONRAADS, V.M.; BECKERS, P.; BOSMANS, J.; DE CLERCK, L.S.; STEVENS, W.J.; VRINTS, C.J.; BRUTSAERT, D.L. Combined endurance/resistance training reduces plasma TNF- $\alpha$  receptor levels in patients with chronic heart failure and coronary artery disease. **Eur Heart J**, 23(23) p.1854–1860, 2002.

CONTI, F.F.; SANCHES, I.C.; BERNARDES, N.; SHIMOJO, G.L.; FIGUEROA, D.; WICHI, R.B.; DE ANGELIS, K. Influência dos hormônios sexuais no consumo de oxigênio de rato. **RBME**, inpress.

COOK, J.N.; DEVAN A.E.; SCHLEIFER, J.L.; ANTON, M.M.; CORTEZ-COOPER, M.Y.; TANAKA, H. Arterial compliance of rowers: implications for combined aerobic and strength training on arterial elasticity. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** v.290(4) p.1596–1600, 2006.

CORNELISSEN, V.A.; SMART, N.A. Exercise training for blood pressure: a systematic review and meta-analysis. **J Am Heart Assoc**, v.2(1), 2013 doi: 10.1161/JAHA.112.004473.

DANTAS, A.P.V.; CARVALHO, M.H.C. Efectoprotector de los estrógenos em el sistema cardiovascular. **Antioxidantes y Calidad de Vida**, v.7(28) p. 6-11, 2000.

DAVY, K.P.; MINICLIER, N.L.; TAYLOR, J.A.; STEVENSON, E.T.; SEALS, D.R. Elevated heart rate variability in physically active postmenopausal women; a cardioprotective effect? **Am J Physiol.**, v.271(40) p. 455- 460, 1996.

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

DE ANGELIS, K.L.D.; OLIVEIRA, A.R.; DALL' AGO, P. PEIXOTO, L.R.; GADONSKI, G.; LACCHINI, S.; FERNANDES, T.G.; IRIGOYEN, M.C. Effects of exercise training in autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. **Braz J Med Biol Res**, v.33(6) p.635-641, 2000.

DE ANGELIS, K.; WICHI, R.B.; JESUS, W.R.; MOREIRA, E.D.; MORRIS, M.; KRIEGER, E.M.; IRIGOYEN, M.C. Exercise training changes autonomic cardiovascular balance in mice. **J Appl Physiol**, v.96(6) p.2174-8, 2004

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

DHINGRA, S.; SHARMA, A.K.; SINGLA, D.K.; SINGAL, P.K. p38 and ERK1/2 MAPKs mediate the interplay of TNF-alpha and IL-10 in regulating oxidative stress and cardiac myocyte apoptosis. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.293(6) p.3524–3531, 2007.

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 I receptors. **J Clin Invest**, v.96, p.141-149, 1995.

DOSHI, S.B.; AGARWAL, A. The role of oxidative stress in menopause. **J Midlife Healthn**, v.4(3), p.140-6, 2013.

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(3) p.220-35, 2007.

FLUES, K.; PAULINI, J.; BRITO, S.; SANCHES, I. C.; COLOMBO, C. F.; IRIGOYEN, M.C.; DE ANGELIS, K. Exercise training associated with estrogen therapy induced cardiovascular benefits after ovarian hormones deprivation. **Maturitas**, n.65: 267–271, 2010.

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

GALLAGHER, P.E.; LI, P.; LENHART, J.R.; CHAPPELL, M.C.; BROSNIHAN, K.B. Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. **Hypertension**, v.33(2) p. 323-328, 1999.

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

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**, v.10 p.1093-100, 1991.

GUIMARÃES, G.V.; CIOLAC, E.G. Síndrome metabólica: abordagem do educador físico. **RevSocCardiol de São Paulo**, v.14 p. 659-70, 2004.

GAVA, N.S.; VERAS- SILVA, A.S.; NEGRAO, C.E.; KRIEGER, E.M. Low-intensity exercise training attenuates cardiac adrenergic tone during exercise in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v.26, p.1129-33, 1995.

GERCZUK, P.Z.; KLONER, R.A. An update on cardioprotection: a review of the latest adjunctive therapies to limit myocardial infarction size in clinical trials. **Journal of the American College of Cardiology**, v.59 p.969-978, 2012.

GO A.S.; MOZAFFARIAN, D.; ROGER, V.L.; BENJAMIN, E.J.; BERRY, J.D.; BLAHA, M.J.; DAI, S.; FORD, E.S.; FOX, C.S.; FRANCO, S.; FULLERTON, H.J.; GILLESPIE, C.; HAILPERN, S.M.; HEIT, J.A.; HOWARD, V.J.; HUFFMAN, M.D.; JUDD, S.E.; KISSELA, B.M.; KITTNER, S.J.; LACKLAND, D.T.; LICHTMAN, J.H.; LISABETH, L.D.; MACKKEY, R.H.; MAGID, D.J.; MARCUS, G.M.; MARELLI, A.; MATCHAR, D.B.; MCGUIRE, D.K.; MOHLER, E.R.; MOY, C.S.; MUSSOLINO, M.E.; NEUMAR, R.W.; NICHOL, G.; PANDEY, D.K.; PAYNTER, N.P.; REEVES, M.J.; SORLIE, P.D.; STEIN, J.; TOWFIGHI, A.; TURAN, T.N.; VIRANI, S.S.; WONG, N.D.; WOO, D.; TURNER, M.B.; Heart disease and stroke statistics–2013 update: a report from the American heart association. **Circulation**, v.127 p.6–245, 2013.

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*. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v.130(1) p.21-7, 2001.

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

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**. V.62(2) p.200-4, 2009.

HOFFMAN, B.; SCHORGE, J.; HALVORSON, L.; BRADSHAW, K.; CUNNINGHAM, F. William's gynecology, 2<sup>nd</sup> ed. New York City: **The MacGraw Hill Companies**; p.1-1399, 2012.

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

IRIGOYEN, M.C.; PAULINI, J.; FLORES, L.J.; FLUES, K.; BERTAGNOLLI, M.; MOREIRA, E.D.; CONSOLIM-COLOMBO, F.; BELLÓ-KLEIN, A.; DE ANGELIS, K. Exercise training improves baroreflex sensitivity associated with oxidative stress reduction in ovariectomized rats. **Hypertension**, v.46(2) p.1-6, 2005.

JOAQUIM L.F.; SALGADO H.C.; FAZAN R. Variabilidade da pressão arterial e da frequência cardíaca, e sensibilidade do barorreflexo, em animais geneticamente manipulados. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 12, p. 36-40, 2005.

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(5) p.21, 2004.

KAUSER, K.; RUBANYI, G.M. Gender difference in bioassayable endothelium-derived NO from isolated rat aortas. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.267 p.2311–2317, 1994.

KURTZ, E.G.; RIDKER, P.M.; ROSE, L.M.; COOK, N.R.; EVERETT, B.M.; BURING, J.E.; REXRODE, K.M. Oral postmenopausal hormone therapy, C-reactive protein and cardiovascular outcomes. **Menopause**. 2010 epub ahead of print.

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**, v.277(46) p.2233-2239, 1999.

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

LATOUR M.G.; SHINODA M.; LAVOIE J.M. Metabolic effects of physical training in ovariectomized and hyperestrogenic rats. **J Appl Physiol**, v.90(1) p.235-241, 2001.

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. **Lancet**, v.351, p.478-84, 1998.

LEITE, RD., PRESTES, J., PEREIRA, GB., SHIGUEMOTO, GE., PEREZ, SE. Menopause: Highlighting the effects os resistance training. **Ver port Cardiol**. 29(7-8), p. 1269-72, 2010.

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.

PESCATELLO, L.S.; FRANKLIN, B.A.; FAGARD, R.; FARQUHAR, W.B.; KELLEY, G.A.; RAY, C.A. Exercise and Hypertension. **American College of Sports Medicine**, v.36(3) p.533-53, 2004.

LIN, S.C.; YAMATE, T.; TAGUCHI, Y.; BORBA, V.Z.; GIRASOLE, G.; O'BRIEN, C.A.; BELLIDO, T.; ABE, E.; MANOLAGAS, S.C. Regulation of the gp80 and gp130 subunits of the IL-6 receptor by sex steroids in the murine bone marrow. **J Clin Invest**, v.100(8) p.1980 – 90, 1997.

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(2) p.153-8, 1995.

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

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. **Diabetes Res 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.

MARANON, R.O.; LIMA, R.; MATHBOUT, M.; DO CARMO, J.M.; HALL, J.E.; ROMAN, R.J.; RECKELHOFF, J.F. Postmenopausal hypertension: role of the sympathetic nervous system in an animal model. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.306(4) p.R248-56, 2014.

MARCONDES, F.K.; BIANCHI, F.J.; TANNO, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz J Biol**, v.62(4A), p. 609-14, 2002.

MARKLUND, S.L. Product of extracellular-superoxide dismutase catalysis. **FEBS Lett**, v.184(2), p.237-9, 1985.

MCLEAN, R.R. Proinflammatory cytokines and osteoporosis. **Curr Osteoporos Rep**, v.7 p. 134-9, 2007.

MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> in photolyzed water demonstrated through the use of superoxide dismutase. **Photochem Photobiol**, v. 17(2), p. 115-21, 1973.

MENDELSON, M.E.; KARAS, R.H. Mechanisms of disease: the protective effect of estrogen on the cardiovascular system. **N Engl J Med**, v.340 p.1801-1811, 1999.

MILLER, V.M. Gender, Estrogen, and NOS: Cautions about Generalizations. **Cir Res**. 85:979-981, 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(1) p.62-71, 2001.

MOSCA, L.; BANKA, C.L.; BENJAMIN, E.J.; BERRA, K.; BUSHNELL, C.; DOLOR, R.J.; GANIATS, T.G.; GOMES, A.S.; GORNIK, H.L.; GRACIA, C.; GULATI, M.; HAAN, C.K.; JUDELSON, D.R.; KEENAN, N.; KELEPOURIS, E.; MICHOS, E.D.; NEWBY, L.K.; OPARIL, S.; OUYANG, P.; OZ, M.C.; PETITTI, D.; PINN, V.W.; REDBERG, R.F.; SCOTT, R.; SHERIF, K.; SMITH, S.C. J.R.; SOPKO, G.; STEINHORN, R.H.; STONE, N.J.; TAUBERT, K.A.; TODD, B.A.; URBINA, E.; WENGER, N.K.; 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**, v.115(11) p.1481-501, 2007.

MORAES-SILVA, IC.; DE LA FUENTE, RN.; MOSTARDA, C.; ROSA, K.; FLUES, K.; DAMACENO-RODRIGUES, N.R.; CALDINI, E.G.; DE ANGELIS, K.; KRIEGER, E.M.; IRIGOYEN, M.C. Baroreflex deficit blunts exercise training –induced cardiovascular and autonomic adaptations in hypertensive rats. **Clin and Exper Pharma and Physiol**. V.37 p. 114-120, 2010.

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: Basic and Clinical*, v.145, p.11-16, 2009.

MUSCH, T.I.; WARFEL, B.S.; MOORE, R.L.; LARACH, D.R. Anesthetic effects on liver and muscle glycogen concentrations: rest and postexercise. **J Appl Physiol**, v.66(6) p.2895-900, 1985.

NARKIEWICZ, K.; PHILLIPS, B.G.; KATO, M.; HERING, D.; BIENIASZEWSKI, L.; SOMERS, V.K. Gender-selective interaction between aging, blood pressure, and sympathetic nerve activity. **Hypertension**, v 45 p 522–525, 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.

NICHOLS, M.; TOWNSEND, N.; SCARBOROUGH, P.; RAYNER, M. Cardiovascular disease in Europe 2014:epidemiological update. **European Heart Journal**. [Epub ahead of print], 2014.

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

PACIFICI, R.; RIFAS, L.; MCCRACKEN, R. Ovarian steroid treatment 8 blocks a postmenopausal increase in blood monocyte interleukin 1 release. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 86 p. 2398 – 402, 1989.

PARK, H.T.; CHO, S.H.; CHO, G.J.; SHIN, J.H.; HONG, S.C.; KIM, T.; HUR, J.Y.; KIM, Y.T.; KIM, S.H. Relationship between serum adipocytokine levels and metabolic syndrome in menopausal women. **Gynecol Endocrinol**, v.25 p. 27–31, 2009.

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.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **J Immunol Methods**, v.38 (1-2), p. 161-70, 1980.

PRADHAN, A.D.; MANSON, J.E.; ROSSOUW, J.E.; SISCOVICK, D.S.; MOUTON, C.P.; RIFAI, N.; WALLACE, R.B.; JACKSON, R.D.; PETTINGER, M.B.; RIDKER, P.M. 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.

PEDERSEN, B.K.; FISCHER, C.P. Beneficial health effects of exercise - the role of IL-6 as a myokine. **Trends Pharmacol Sci**, v.28(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(1) p.3–63, 2006.

POWERS, S.K.; JI, L.L.; LEEUWENBURGH, C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: A brief review. **Med Sci Sports Exerc**, v.31 p.987-97, 1999.

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(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.

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, 2000.

RING-DIMITRIOU, S.; PAULWEBER, B.; VON DUVILLARD, S.P.; STADLMANN, M.; LEMURA, L.M.; 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.

ROLIM LIMA, S.M.R.; BELLÓ-KLEIN, A.; FLUES, K.; PAULINI, J.; MONTE, O; IRIGOYEN, M.C; DE ANGELIS, K. Efeitos da suplementação do 17 $\beta$ -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(5) p.419–420, 1999.

RODRIGUES, B.; IRIGOYEN, M.C.; DE ANGELIS, K. Correlation between speed and oxygen consumption (VO<sub>2</sub>) in rats submitted to maximum exercise test. **FIEP Bulletin**, 76:231-233, 2006.

SANCHES, I.C.; BRITO, J.O.; DE ANGELIS, K. Cardiometabolic benefits of exercise training in an experimental model of metabolic syndrome and menopause. **Menopause** v.19(5) p. 562-568, 2012.

SANCHES, IC.; CONTI, FF.; SARTORI, M.; IRIGOYEN, MC.; DE ANGELIS, K. Standardization of resistance exercise training: effects in diabetic ovariectomized rats. **Int J Sports Med**, 35(4), p. 323-9, 2013.

SIGNORELLI, S.S.; NERI, S.; SCIACCHITANO, S.; PINO, L.D.; COSTA, M.P.; MARCHESE, G. et al. Behaviour of some indicators of oxidative stress in postmenopausal and fertile women. **Maturitas**, v.53 p.77-82, 2006.

SINAGRA, D.; CONTI, M. Metabolic syndrome in menopause: physiopathological, clinic and therapeutic aspects for cardiovascular prevention. **RecentiProg Med**, v.98(3) p.185-91, 2007.

SILVA, G.J.J.; BRUM, P.C.; NEGRÃO, C.E.; KRIEGER, E.M. Acute and chronic effect of exercise or baroreflexes in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v.30 p.714-719, 1997.

SCHLAICH, M.P.; KRUM, H.; ESLER, M.D. New therapeutic approaches to resistant hypertension. **Curr Hypertens Rep**, v. 12 p. 296–302, 2010.

SOWERS MR, LA PIETRA M. Menopause: its epidemiology and potential association with chronic diseases. **Epidemiol.** v.17 p.287- 30 2005.

STRACK, V.; STOYANOV, B.; BOSSENMAIER, B.; MOSTHAF, L.; KELLERER, M.; HARING, 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, 2000.

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.** 40(5):397-415, 2010.

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**, v.30, p.786-791, 2007.

STAESSEN, J.A.; GINNOCHIO, G.; THIJS, L.; FAGARD, R. Conventional and ambulatory blood pressure and menopause in a prospective population study. **Journal of Human Hypertension**, v.11 p.507- 514, 1997.

SWEDBERG, K.; ENEROTH, P.; KJEKSHUS, J.; WILHELMSEN, L. Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. **Circulation**, v.82 p.1730-1736, 1990;

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**, v.93 p.1043-1065, 1996.

TEIXEIRA, P.J., GOING, S.B., HOUTKOOPER, L.B., METCALFE, L.L., BLEW, R.M., FLINT-WAGNER, H.G., CUSSLER, E.C., SARDINHA, L.B., LOHMAN, T.G. Resistance training in postmenopause women with and without hormone therapy. **Med Sci Sports Med**, v.35(4) p. 555-62, 2003.

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 Méd**, v.344(18) p.1343-1350, 2001.

WAGNER, J.; JAMES, A. A pilot study of school counselor's preparedness to serve students with diabetes: relationship to self-reported diabetes training. **J Sch Health**, v.76(7) p.387-92, 2006.

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. **Circulation**, v.116 p. 572-584, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION Regional Office for Europe. European Health for All Database (HFA-DB). <http://data.euro.who.int/hfad/> (08 June 2014). WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark; 2013.

YANES, L.L.; RECKELHOFF, J.F. Postmenopausal hypertension. **Am J Hypertens**, v. 24(7) p.740-9, 2011.

YOGALINGAM, G.; HWANG, S.; FERREIRA, J.C.; MOCHLY-ROSEN, D. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) phosphorylation by protein kinase C $\delta$  (PKC $\delta$ ) inhibits mitochondria elimination by lysosomal-like structures following ischemia and reoxygenation-induced injury. **J Biol Chem**, v.288(26) p.18947-60, 2013.

# **ANEXO A**

## **Parecer do COEP**



Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nº An0019\_2013

Efeitos da associação do treinamento físico aeróbio e resistido em parâmetros autonômicos e de estresse oxidativo em ratas hipertensas ooforectomizadas.

Apresentado a esta Comissão 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

Comentário

Favor enviar relatório final na conclusão do projeto.

São Paulo, 17 de junho de 2013.

  
Prof. Dra. Karin Marie van der Heijden

Vice - Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais da  
Universidade Nove de Julho

# **ANEXO B**

Artigo aceito p/  
publicação

*Brazilian Journal of Medical and  
Biological Research*

16 de janeiro de 2015

Prezada Dra. Katia De Angelis,

Temos a satisfação de informar que seu manuscrito "4387R1 - DYNAMIC RESISTANCE TRAINING DECREASES SYMPATHETIC TONUS IN HYPERTENSIVE OVARECTOMIZED RATS" foi aceito para publicação no Brazilian Journal of Medical and Biological Research.

O trabalho está sendo verificado e preparado pelo Editor de Estilo, e se necessário o texto corrigido e eventuais questões serão enviadas a V.Sa. via e-mail, antes da preparação da Prova Gráfica que será inicialmente publicada como Ahead of print.

O processo de publicação do trabalho depende do pagamento de "Publication Charge", portanto precisamos das informações abaixo, o mais rapidamente possível.

Para emissão do Boleto Bancário e da Nota Fiscal Eletrônica, precisamos que V.Sa. informe com urgência e clareza, via email (bjournal@terra.com.br):

1. Em nome de quem deverá ser emitido o Boleto Bancário e a Nota Fiscal Eletrônica. Ambos os documentos serão remetidos conjuntamente a V.Sa., via email. Certifique-se bem antes de fornecer estes dados pois depois de emitida, a Nota Fiscal Eletrônica NÃO poderá ser refeita com outro nome ou instituição.
2. O CNPJ (Pessoa Jurídica) ou o CPF (Pessoa Física) pois é exigência obrigatória para emissão da Nota Fiscal Eletrônica.
3. Usualmente são fixados 15 dias para o pagamento do boleto. Caso V.Sa. necessite de um prazo maior, informe na hora em que enviar os dados. Lembramos que enquanto não houver a quitação da Publication Charge, o trabalho não será disponibilizado na Scielo.
4. Para qual endereço deverão ser remetidos os documentos.
5. O Boleto Bancário e a Nota Fiscal Eletrônica, com os dados fornecidos, deve ser pago na data de vencimento. Caso isto não ocorra já existe uma multa inserida no boleto que deverá ser paga por conta do interessado pois **NAO SERA POSSIVEL FAZER CANCELAMENTO OU SUBSTITUICAO DE NENHUM DESTES DOCUMENTOS**. Esta medida foi adotada por exigências de órgãos financiadores (Fapesp, CNPq, Capes, Universidades federais, estaduais, etc.).

Estamos à disposição para esclarecer qualquer questão adicional, através do e-mail (bjournal@terra.com.br) ou telefone 16-3633-3825 (Sr. Reinaldo).

Enfatizamos que o processo de publicação do trabalho depende do pagamento da Publication Charge e portanto precisamos dessas informações o mais rapidamente possível.

Contamos com sua compreensão e colaboração.

Atenciosamente,

Dr. Lewis Joel Greene; Editor Brazilian Journal of Medical and Biological Research

**DYNAMIC RESISTANCE TRAINING DECREASES SYMPATHETIC TONUS IN HYPERTENSIVE OVARECTOMIZED RATS**

**Guilherme Lemos SHIMOJO<sup>1</sup>, Renata Kelly da PALMA<sup>1</sup>, Janaina de Oliveira BRITO<sup>1</sup>,**

**Iris Callado SANCHES<sup>1</sup>, Maria-Cláudia IRIGOYEN<sup>2</sup>, Kátia DE ANGELIS<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratory of Translational Physiology, Universidade Nove de Julho, São Paulo, Brazil;

<sup>2</sup>Heart Institute, University of São Paulo, Medical School, São Paulo

**Short Title: RESISTANCE TRAINING IN SHR-OVX RATS**

Words: 1713

Figures: 2

Reference: 20

*No disclosure, no conflict of interest*

**Corresponding author:**

Kátia De Angelis, PhD,

Universidade Nove de Julho - Science Rehabilitation Program.

Adress: Rua Vergueiro, 235, Postal Code: 01504001

São Paulo, SP, Brazil.

Fone: 55 11 3385-9154

Fax: 55 11 3385-9154

E-mail: prof.kangelis@uninove.br

## ABSTRACT

**Background:** The aim of the present study was to investigate the effects of resistance exercise training on hemodynamics and cardiac autonomic control in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. **Methods:** Female rats were divided into 4 groups: sedentary control (SC), sedentary hypertensive (SH), sedentary hypertensive ovariectomized (SHO), and resistance trained hypertensive ovariectomized (RTHO). Resistance exercise training was performed on a vertical ladder (5d/w; 8wk), 40-60% maximal load. Arterial pressure was directly recorded. Vagal and sympathetic tonus were measured by heart rate (HR) responses to methylatropine (3 mg/kg, iv) and propranolol (4 mg/kg, iv). **Results:** Ovariectomy additionally increased blood pressure in hypertensive rats and was associated with decreased vagal tonus. Resistance exercise training induced mean arterial pressure reduction (RTHO:  $159\pm 2.2$  vs. SHO:  $177\pm 3.4$  mmHg) and resting bradycardia (RTHO:  $332\pm 9.0$  vs. SHO:  $356\pm 5$  bpm). Sympathetic tonus was reduced in the trained group. Moreover, sympathetic tonus was positively correlated with resting HR ( $r= 0.7$ ,  $p<0.05$ ). **Conclusion:** Ovarian hormone deprivation in hypertensive rats induced additional AP increase, which was in turn attenuated by moderate-intensity dynamic resistance training. This benefit may be associated with resting bradycardia and reduced cardiac sympathetic tonus after training, thus pointing to the beneficial effects of this approach in the management of hypertension after ovarian hormone deprivation.

**Key words:** Resistance exercise training, menopause, hypertension, sympathetic tonus, blood pressure.



## Introduction

Hypertension is a leading cause of cardiovascular disease in both genders. The incidence of cardiovascular disease (CVD) in women increases sharply after menopause, suggesting that ovarian hormones play a role in arterial pressure (AP) regulation (1). In fact, a previous study from our group has reported that ovarian hormone deprivation in rats induced an increase in AP values (2).

Resting bradycardia induced by aerobic exercise training has been well documented in humans and animals. Several studies have demonstrated resting bradycardia in young (3) or old (4) normotensive male rats, in young normotensive female rats (5), in female ovariectomized rats (6,7), in male and female hypertensive rats (8,9) and in humans (10). The mechanisms underlying the cardiac adaptive response to exercise training seem to be different across species and genders (3,5,10). A recent report from our laboratory has demonstrated that changes in autonomic control in trained female rats were correlated with reduced basal heart rate (HR), lending support to the role of autonomic control of HR in the resting bradycardia observed in trained female rats (5).

Therefore, it seems well established that aerobic exercise training induces decreases in basal AP and HR, associated with improvement in cardiovascular autonomic control (5,9) and in baroreflex sensitivity (6,8,11). Recently, growing clinical evidence has lent further support to the positive effects of resistance exercise training on body composition and metabolic profile in both normal and diseased population. In fact, medical associations recommend resistance exercise training (40-60% maximal load) as a complement to aerobic training for the aging population, and in the management of various chronic diseases, including hypertension (12,13). However, the cardiovascular effects of this type of training remain poorly understood. Silveira et al. have found bradycardia and reduced intrinsic heart rate in Wistar normotensive OVX rats after high-intensity resistance exercise training (from

75% of body mass until reaching a maximal overload) in an adapted ladder (7). We have recently standardized a moderate-intensity resistance exercise training (40-60% maximal load) in ladder to study the effects of this type of training in experimental models of diseases. We applied this protocol to diabetic normotensive OVX rats and found improvement in body composition and hemodynamics (14). Given the high prevalence of hypertension in postmenopausal women and the lack of studies addressing the cardiovascular effect of resistance training in this population, the present study was designed to test the hypothesis that dynamic moderate-intensity resistance exercise training can reduce AP and HR associated with positive cardiac autonomic changes in hypertensive OVX rats. Thus, the aim of our study was to investigate the effects of moderate-intensity resistance exercise training on hemodynamic parameters and on cardiac autonomic control in hypertensive OVX rats.

### **Methods**

Seven normotensive Wistar rats and twenty one female spontaneously hypertensive rats (SHR) (3 months) were obtained from the Animals Facilities. The animals received freely available standard laboratory chow and water and were housed in temperature-controlled rooms (22° C) with a 12: 12-h dark-light cycle. The rats were assigned into 4 groups (n=7 each): sedentary normotensive (SC), sedentary hypertensive (SH), sedentary hypertensive ovariectomized (SHO), and resistance trained hypertensive ovariectomized (RTHO). All surgical procedures and protocols were approved by the Ethics Committee of Universidade Nove de Julho (Protocol 0035/2011) and were conducted in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

At 12 weeks of age, animals were anesthetized (80 mg/kg ketamine and 12 mg/kg xylazine), and a small abdominal incision was made. The ovaries were then located, and a silk thread was tightly tied around the oviduct, including the ovarian blood vessels. The oviduct was sectioned and the ovary removed. The skin and muscle wall were then sutured

with silk thread. After surgery, the animals received an injection of antibiotics (40 000 U/kg penicillin G procaine IM) (2,6,9).

Resistance exercise training (RT) was performed in ladder adapted for rats, with 54 vertical steps and 0.5 cm of distance between them, and a small rat cage at the top, which was covered with a cloth to promote a dark environment for the animal rest between the climbs. All animals were adapted to the act of climbing for 5 consecutive days, before the maximum load test. The test consisted of an initial load of 75% of the body weight, which was progressively increased with 50 grams in the subsequent climbs as previously described in details elsewhere (14). 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 during 8 weeks, for 5 days a week and at moderate intensity (1<sup>st</sup>-2<sup>nd</sup> wk.: 30-40 %; 3<sup>th</sup>-5<sup>th</sup> wk.: 40-50 %; 6<sup>th</sup>-8<sup>th</sup> wk.: 40-60 % of the maximal load) with 15 climbs per session and a 1-min time interval between climbs as previously described in details elsewhere (14).

On the day following the last exercise session, rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (90 mg/kg) and xylazine (20 mg/kg) to implant 2 polyethylene-tipped Tygon cannulas filled with heparinized saline into the right carotid artery and jugular vein for direct measurements of arterial pressure and drug administration, respectively. The free ends of the cannulas were tunneled subcutaneously and exteriorized at the top of the skull. To avoid detraining hemodynamics, measurements were made in conscious, freely moving rats in their home cage. The arterial cannula was connected to a transducer (Blood Pressure XDRC, Kent® Scientific, USA), and AP signals were recorded for a 30-min period using a microcomputer equipped with an analog-to-digital converter (CODAS, 2Kz, DATAQ Instruments, USA). The recorded data were analyzed on a beat-to-beat basis to quantify changes in mean AP (MAP) and HR.

After the basal HR recording, vagal and the sympathetic tonus and intrinsic heart rate (IHR) were measured by determining the response to methylatropine (3 mg/kg, iv) and propranolol (4 mg/kg, iv) with a maximum volume of 0.2 mL per injection. Because the HR response to these drugs reaches its peak within 3 to 5 min, this time interval was allowed to elapse before the HR measurement. Propranolol was injected 10 min after methylatropine, and again the response was evaluated after simultaneous blockade with propranolol and methylatropine. On the following day, the sequence of injections was inverted (first propranolol and then methylatropine) and the intrinsic heart rate (IHR) was evaluated after simultaneous blockade with propranolol and methylatropine. Sympathetic tonus was determined as the difference between maximum HR after methylatropine injection and IHR. Vagal tonus was obtained by the difference between the lowest HR after propranolol injection and IHR (3,5).

Data are presented as mean  $\pm$ SEM. Levene's test was used to assess variance homogeneity. Comparisons between the 4 groups were performed with one-way ANOVA, followed by Student Newmann Keuls post hoc test. Pearson correlation was used to study the association between variables. The significance level was established at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

At the beginning of the protocol, the SC group presented higher body weight than hypertensive groups (SC:  $216 \pm 5$  vs. SH:  $188 \pm 2$ ; SHO:  $191 \pm 2$  and RTHO:  $190 \pm 1$  g,  $p < 0.05$ ); however, no difference in weight was found between hypertensive groups. All groups showed a significant increase in body weight (SC:  $280 \pm 5$ ; SH:  $197 \pm 2$ ; SHO:  $264 \pm 3$  and RTHO:  $240 \pm 4$  g,  $p > 0.05$ ) at the end of the protocol. However, RTHO animals ( $240 \pm 4$  g) showed reduced body weight when compared to SHO group at the end of the protocol ( $264 \pm 3$  g,  $p < 0.05$ ).

At the beginning of the experiment, the maximal load in the ladder test was similar among the hypertensive groups (SH:  $315 \pm 19.2$ ; SHO:  $320 \pm 13$  and RTHO:  $300 \pm 10.4$  g,  $p > 0.05$ ). However, the hypertensive groups carried a higher maximum load when compared to SC animals ( $128.5 \pm 5.9$  g,  $p < 0.05$ ). After 8 weeks of resistance exercise training, the RTHO group demonstrated an increase in maximum load when compared with other groups (RTHO:  $490 \pm 10.3$  vs. SC:  $204 \pm 11.4$ ; SH:  $360 \pm 20.4$  and SHO:  $335 \pm 37.2$  g,  $p < 0.05$ ).

Ovariectomy induced MAP increase in hypertensive rats (SHO vs. SH group). Resistance exercise training induced MAP reduction in relation to both SH and SHO groups. Resistance exercise training also was able to induce resting bradycardia in RTHO group (Figure 1).

The results of the autonomic control of HR demonstrated that hypertensive groups had a reduced vagal tonus when compared to SC group (SH:  $21.5 \pm 5$  SHO:  $26 \pm 6$  and RTHO  $23.7 \pm 4$  vs. SC:  $48 \pm 5$  bpm,  $p < 0.05$ ). Resistance exercise training decreased sympathetic tonus in hypertensive OVX rats (RTHO:  $35.6 \pm 5.7$  vs. SC:  $54 \pm 6$ ; SH:  $56.7 \pm 4.4$  and SHO:  $50.9 \pm 3.9$  bpm,  $p < 0.05$ ) (Figure 1). The IHR was reduced in hypertensive groups (SH:  $325 \pm 10$ ; SHO:  $312 \pm 6$  and RTHO:  $314 \pm 7$  bpm) when compared to SC group ( $368 \pm 8$  bpm,  $p < 0.05$ ).

Correlation analysis involving all hypertensive rats (SH, SHO and RTHO groups) showed a significant positive correlation between sympathetic tonus and heart rate ( $r = 0.7$ ,  $p < 0.05$ ) (Figure 2A). There was no correlation between vagal tonus and heart rate ( $r = 0.2$ ,  $p > 0.05$ ) (Figure 2B).

## Discussion

In the present study we used an experimental model of menopause associated with hypertension to demonstrate that resistance exercise training is able to minimize the long term effects of hypertension. Thus, there are two important findings in the present study.

First, the RTHO rats showed a reduction in AP and HR at rest when compared to sedentary hypertensive groups. Second, resistance exercise training seems to induce a reduction in sympathetic tonus, which is associated with resting bradycardia.

Menopause has been associated with impairment in muscle strength, and bone mineral density, as well as with weight gain (15). In the present study, resistance exercise training reduced body weight of hypertensive ovariectomized rats. Although some studies have not demonstrated any reduction in body weight in aerobic trained hypertensive male rats (8) or in aerobic trained female hypertensive OVX rats (9), several others have indicated progressive resistance training as a promising intervention in positively changing body composition. In fact, despite unchanged body weight, we have previously observed a decrease in adipose tissue and increase in muscle mass after resistance training in ladder in male normotensive rats. Moreover, some studies have demonstrated the benefits of resistance training in slowing sarcopenia and the overall deterioration of muscle structure associated with menopause (17,18). In this sense, we observed a significant gain (~46%) in hypertensive OVX rats in the maximum load in the ladder test after training, and the *magnitude of this gain was similar* (~50%) to that of diabetic normotensive OVX rats, as we previously observed (14). However, using a similar resistance training protocol, Grans et al. have reported a more pronounced strength gain (~80%) in male normotensive rats (16). Taken together, these data suggest that gender and ovarian hormone deprivation probably play a role in the responses to dynamic resistance training.

The incidence of hypertension rises after menopause (1), and this increase involves changes in AP and AP regulation associated with estrogen loss. In the present study, we showed an additional increase in AP in OVX rats, thus corroborating previously published research undertaken by our group (2). Importantly, we demonstrated that 8 weeks of moderate-intensity dynamic resistance exercise training induced a reduction in AP values in

hypertensive rats undergoing ovarian hormone deprivation. A few mechanisms may account for the reduction in blood pressure in trained hypertensive humans, such as reduced cardiac output (19) and/or peripheral vascular resistance (20). In this study, the reduction in AP values may be associated with a decrease in sympathetic tonus, resulting in resting bradycardia after 8 weeks of moderate-intensity resistance exercise training. However, 10 weeks (3 times/week) of high-intensity resistance training in ladder induced a reduction in resting HR and in intrinsic heart rate, but did not change either AP or cardiac autonomic tonus in normotensive OVX rats (7). In male SHR, the moderate-intensity treadmill exercise training induced AP, HR and sympathetic tonus reduction. Moreover, reduced resting HR correlated with the reduced sympathetic tonus observed in female Wistar rats after moderate-intensity aerobic treadmill training (5). Another study from our group has previously reported that resting bradycardia may be the candidate mechanism for AP reduction in OVX rats undertaking aerobic treadmill training (6). In fact, we observed in the present study a positive correlation between sympathetic tonus and resting HR ( $r=0.7$ ), lending further support to the critical role of the reducing cardiac sympathetic tonus to induce resting bradycardia in hypertensive animals.

In conclusion, ovarian hormone deprivation in hypertensive rats induced additional AP increase, which was attenuated by moderate-intensity dynamic resistance exercise training. This benefit may be associated with resting bradycardia and reduced cardiac sympathetic tonus after training. These findings point to the beneficial effects of moderate-intensity dynamic resistance exercise training in the management of hypertension after ovarian hormones deprivation.

## Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 2011/16441-0; 2012/02023-5; 2013/07869-2; 2012/20141-5), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES: 88881.062178/2014-01). MCI and KDA are recipients of CNPq-BPQ fellowships.

---

## REFERENCES

1. Vokonas PS, Kannel WB, Cupples LA. Epidemiology and risk of hypertension in the elderly: the Framingham Study. *J Hypertens* 1988; 6: S3-S9.
2. 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.
3. Negrão CE, Moreira ED, Santos MC, Farah VM, Krieger EM. Vagal function impairment after exercise training. *J Appl Physiol* 1992; 72: 1749-1753.
4. De Angelis K, Oliveira AR, Werner A, Bock P, Bello-Klein A, Fernandes TG, Belló A, Irigoyen MC. Exercise training in aging: hemodynamic, metabolic, and oxidative stress evaluations. *Hypertension* 1997; 30: 767-771.
5. 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.
6. Irigoyen MC, Paulini J, Flores LJF, Flues K, Bertagnolli 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.



7. Silveira LC, Tezini GC, Schujmann DS, Porto JM, Rossi BR, Souza HC. Comparison of the effects of aerobic and resistance training on cardiac autonomic adaptations in ovariectomized rats. *Auton Neurosci*. 2011;162(1-2):35-41.
8. Gava NS, Vêras-Silva AS, Negrão CE, Krieger EM. Low-intensity exercise training attenuates cardiac beta-adrenergic tone during exercise in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1995; 26(6 Pt 2):1129-1133.
9. 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.
10. Smith ML, Hudson DL, Graitzer HM, Raven PB. Exercise training bradycardia: the role of autonomic balance. *Med Sci Sports Exerc* 1989; 21: 40-44.
11. Bertagnolli M, Campos C, Schenkel P, de Oliveira V, De Angelis K, Belló-Klein A, Rigatto K, Irigoyen M. Baroreflex sensitivity improvement is associated with decreased oxidative stress in trained spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 2006; 24: 2437-2443.
12. 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.
13. 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.
14. Sanches IC, Conti FF, Sartori M, Irigoyen MC, De Angelis K. Standardization of resistance exercise training: effects in diabetic ovariectomized rats. *Int Journal of Sports Med* 2013; 34: 1-7.
15. Asikainen TM, Kukkonen-Harjula K, Miilunpalo S. Exercise for health for early postmenopausal women: a systematic review of randomized controlled trials. *Sports Med*. 2004; 34(11):753-778.

16. Grans CF, Feriani DJ, Abssamra ME, Rocha LY, Carrozzi NM, Mostarda C, Figueroa DM, Angelis KD, Irigoyen MC, Rodrigues B. Resistance training after myocardial infarction in rats: its role on cardiac and autonomic function.

*Arq Bras Cardiol.* 2014; 103(1):60-68.

17. Bocalini DS, Serra AJ, Dos Santos L, Murad N, Levy RF. Strength training reserves the bone mineral density of postmenopausal women without hormone replacement therapy. *J Aging Health* 2009; 21: 519 – 527.

18. Fjeldstad C, Palmer IJ, Bembem MG, Bembem DA. Whole-body vibration augments resistance training effects on body composition in post-menopausal women. *Maturitas* 2009; 63: 79 – 83.

19. Hagberg JM, Montain SJ, Martin WH, Ehsani AA. Effect of exercise training in 60-to 69-years-old persons with essential hypertension. *Am J Cardiol* 1989; 64: 348-353.

20. Jennings GL, Deakin G, Komer P, Meredith I, Kingwell B, Nelson L. What is the dose-response relationship between exercise training and blood pressure? *Ann Med* 1991; 23: 313-318.

**FIGURE CAPTIONS**

**Figure 1.** Hemodynamic and cardiac autonomic control in studied groups. SC: sedentary control; SH: sedentary hypertensive; SHO: sedentary hypertensive ovariectomized; RTHO: resistance trained hypertensive ovariectomized. \* $P < 0.05$  vs. SC; #  $P < 0.05$  vs. SH; †  $P < 0.05$  vs. SHO.

**Figure 2.** Correlations between **A.** resting heart rate and sympathetic tonus ( $r = 0.7$ ,  $p < 0.05$ ) and **B.** resting heart rate and vagal tonus ( $r = 0.2$ ,  $p > 0.05$ ). Pearson correlations involved all hypertensive groups.

FIGURE 1

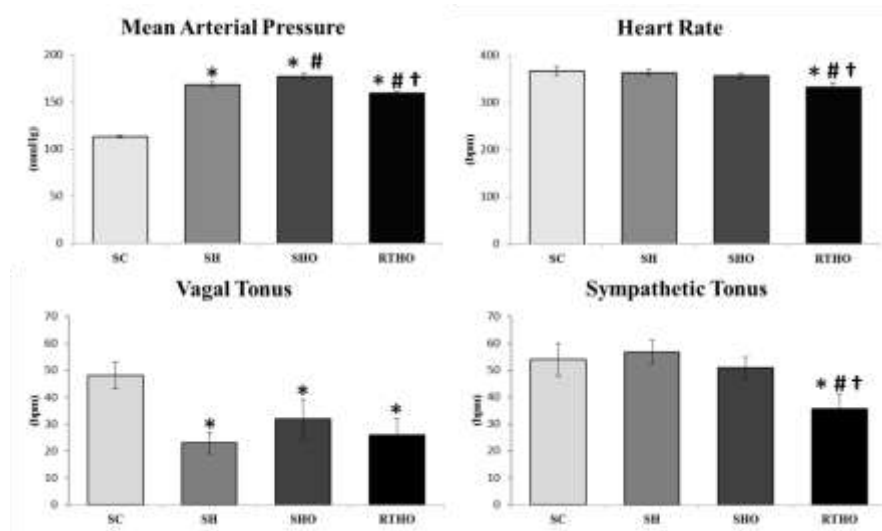
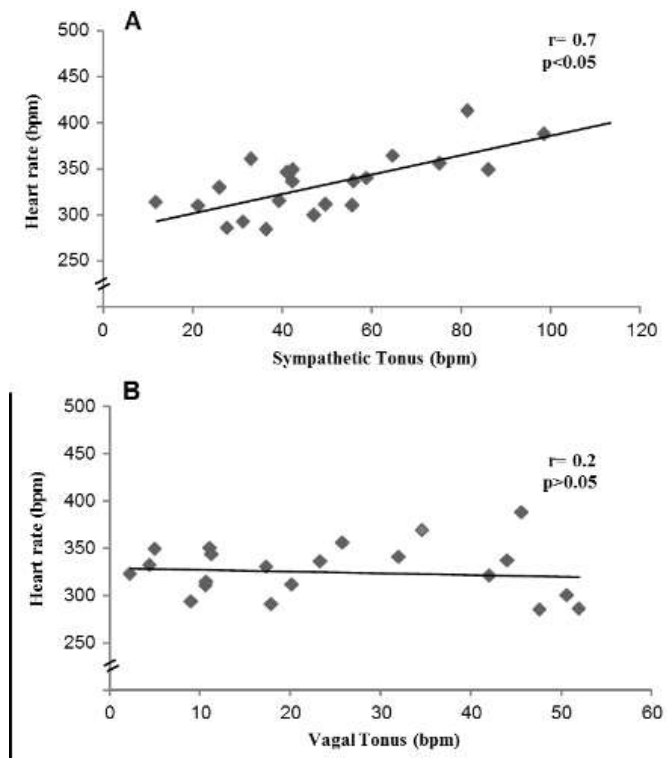


FIGURE 2



# ANEXO C

Artigo aceito p/  
publicação

*Revista Brasileira de Medicina do Esporte*

## INFLUÊNCIA DOS HORMÔNIOS SEXUAIS NO CONSUMO DE OXIGÊNIO DE RATO

INFLUENCE OF SEXUAL HORMONES ON OXYGEN CONSUMPTION IN RATS

INFLUENCIA DE LAS HORMONAS SEXUALES EN EL CONSUMO DE OXÍGENO EN RATAS



Ribeiro Fernando Corti<sup>1</sup>  
Educação Física

Av. Celso Sanchez<sup>1</sup>  
Educação Física

Marilena Bernardes<sup>1,2</sup>  
Educação Física

Guilherme Lenini Strikany<sup>1</sup>  
Educação Física

Diego Mendes Tabosa Figueira<sup>1</sup>  
Educação Física

Ruydo Brandão Wu<sup>1,3</sup>  
Educação Física

Márcia De Angelo<sup>1</sup>  
Educação Física

1. Laboratório de Fisiologia  
Fundamental, Universidade Nove de  
Julho, São Paulo, SP, Brasil

2. Laboratório de Hipertensão  
Essencial, Instituto de Coração  
HCFMUSP, São Paulo, SP, Brasil

3. Universidade Federal de Sergipe,  
São Cristóvão, SE, Brasil

Correspondência:  
Ribeiro Fernando Corti, Laboratório de  
Fisiologia Fundamental, Universidade Nove de  
Julho, Rua Marginal, 255/2-90, Jd. Aderaldo,  
01504-001 São Paulo, SP, Brasil.  
fco@campus9.ufrn.br

### RESUMO

**Introdução:** Achados da literatura sugerem que oscilações dos hormônios sexuais femininos podem alterar o consumo máximo de oxigênio ( $\dot{V}O_{2max}$ ). Dessa forma, o objetivo deste estudo foi comparar o  $\dot{V}O_{2max}$  entre ratos machos (M, n=8), fêmeas nas fases ovulatórias (OV, n=8) ou não-ovulatórias (NOV, n=8) do ciclo estral e ooforectomizadas (OS, n=8). **Métodos:** A avaliação do consumo de oxigênio foi realizada em estufa metabólica com caixa metabólica acoplada. **Resultados:** Em repouso, o  $\dot{V}O_2$  foi semelhante entre os grupos estudados. O grupo M apresentou maior  $\dot{V}O_{2max}$  em relação ao grupo NOV, mas valores semelhantes ao do grupo OV. O  $\dot{V}O_{2max}$  foi menor no grupo ooforectomizado (OS:  $62 \pm 3$  ml/kg  $^{-1}$  min $^{-1}$ ) quando comparado aos demais grupos (M:  $92 \pm 2$ ; NOV:  $77 \pm 4$ ; OV:  $87 \pm 3$  ml/kg  $^{-1}$  min $^{-1}$ ). **Conclusões:** Esses achados evidenciam que a variação hormonal decorrente das diferentes fases do ciclo estral e da privação dos hormônios ovarianos pode induzir alterações no consumo máximo de oxigênio em ratos.

**Palavras-chave:** consumo de oxigênio; ratos; diferenças sexuais; menopausa.

### ABSTRACT

**Introduction:** Literature findings suggest that fluctuations of female sex hormones may change the maximum oxygen consumption ( $\dot{V}O_{2max}$ ). Thus, the aim of this study was to compare the  $\dot{V}O_{2max}$  between male rats (M, n=8), female rats on ovulatory (OV, n=8) or non-ovulatory (NOV, n=8) phases of the estrous cycle and ovariectomized (OS, n=8). **Methods:** The evaluation of oxygen consumption was performed on a treadmill coupled with metabolic box. **Results:** At rest  $\dot{V}O_2$  was similar between groups. The M group had a higher  $\dot{V}O_{2max}$  compared to the NOV group, however it showed similar values when compared to OV group. The  $\dot{V}O_{2max}$  was lower in the ovariectomized group (OS:  $62 \pm 3$  ml/kg  $^{-1}$  min $^{-1}$ ) compared to other groups (M:  $92 \pm 2$ ; NOV:  $77 \pm 4$ ; OV:  $87 \pm 3$  ml/kg  $^{-1}$  min $^{-1}$ ). **Conclusions:** These findings suggest that hormonal variation resulting from different phases of the estrous cycle and ovarian hormone deprivation can induce changes in maximal oxygen uptake in rats.

**Keywords:** oxygen consumption; rats; sex differences; menopause.

### RESUMEN

**Introducción:** Hallazgos de la literatura sugieren que oscilaciones de los hormônios sexuales femeninos pueden alterar el consumo máximo de oxígeno ( $\dot{V}O_{2max}$ ). De esa forma, el objetivo de este estudio fue comparar el  $\dot{V}O_{2max}$  entre ratos machos (M, n=8), hembras en las fases ovulatorias (OV, n=8) o no-ovulatorias (NOV, n=8) del ciclo estral y ooforectomizadas (OS, n=8). **Métodos:** La evaluación del consumo de oxígeno fue realizada en cámara metabólica con caja metabólica acoplada. **Resultados:** En reposo, el  $\dot{V}O_2$  fue semejante entre los grupos estudiados. El grupo M presentó mayor  $\dot{V}O_{2max}$  en relación al grupo NOV, pero valores semejantes a los del grupo OV. El  $\dot{V}O_{2max}$  fue menor en el grupo ooforectomizado (OS:  $62 \pm 3$  ml/kg  $^{-1}$  min $^{-1}$ ) cuando comparado a los demás grupos (M:  $92 \pm 2$ ; NOV:  $77 \pm 4$ ; OV:  $87 \pm 3$  ml/kg  $^{-1}$  min $^{-1}$ ). **Conclusiones:** Estos hallazgos evidencian que la variación hormonal proveniente de las diferentes fases del ciclo estral y de la privación de los hormônios ovarianos puede inducir alteraciones en el consumo máximo de oxígeno en ratos.

**Palabras clave:** consumo de oxígeno; ratos; diferencias sexuales; menopausa.

DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-46522014200001667>

Artigo recebido em 05/03/2014; aprovado em 02/03/2015

### INTRODUÇÃO

O consumo máximo de oxigênio ( $\dot{V}O_{2max}$ ) é um indicador de capacidade aeróbica, cujo valor numérico se relaciona com o nível de eficiência de utilização do oxigênio aeróbico. Seu valor absoluto depende da capacidade física de cada indivíduo, sendo um parâmetro fisiológico que expressa a quantidade de oxigênio que o organismo consegue consumir. O  $\dot{V}O_{2max}$  é o produto do fluxo sanguíneo sistêmico ( débito cardíaco) e da extração sistêmica de oxigênio (diferença arteriovenosa de oxigênio), podendo ser expresso pela equação  $\dot{V}O_{2max} = f_{cardiac} \times (C_{aO_2} - C_{vO_2})$ , onde  $f_{cardiac}$  é o volume sistólico máximo e  $(C_{aO_2} - C_{vO_2})$  a diferença arteriovenosa de  $O_2$  máxima. Essa variável representa a integração que existe entre o sistema cardiovascular,

o sistema respiratório e a demanda energética durante o exercício.<sup>1</sup>

A medida de  $\dot{V}O_{2max}$  é um excelente parâmetro para quantificar a capacidade de aerobismo, bem como o nível de condicionamento físico do atleta e do indivíduo submetido por alguma doença.<sup>2</sup> Assim, o  $\dot{V}O_{2max}$  além de ser um indicador de desempenho é também um indicador de níveis de risco.

Existe um consenso de que as oscilações hormonais contribuem para alterações, principalmente, nos níveis de estrogênio e progesterona, afetam a fisiologia feminina. Adicionalmente, estudos sugerem que o desempenho físico pode variar consideravelmente durante as distintas fases do ciclo menstrual, muito provavelmente em função das variações de temperatura corporal e do metabolismo que acompanham as curvas hormonais.<sup>3-7</sup>

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi comparar o consumo máximo de oxigênio entre ratos machos saudáveis, fêmeas saudáveis nas fases ovulatórias ou não-ovulatórias do ciclo estral e ooforectomizadas.

**MATERIAIS E MÉTODOS**

Foram utilizados 32 ratos Wistar provenientes do biotério da Universidade São Judas Tadeu de São Paulo. 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 livre, sendo que a dieta foi normoprotéica. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade São Judas Tadeu com o parecer número 01/2008. Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais (n=8 em cada grupo): machos saudáveis (M), fêmeas saudáveis nas fases ovulatórias do ciclo estral (OV), fêmeas saudáveis nas fases não-ovulatórias do ciclo estral (NOV), fêmeas ooforectomizadas (OF) e fêmeas ooforectomizadas (OS).

As avaliações do VO<sub>2</sub> foram realizadas nos animais com 3 meses de vida. A caracterização de cada fase do ciclo foi baseada na proporção de três tipos de células na secreção vaginal: epitélios, cornificadas e leucócitos<sup>18</sup>. A secreção vaginal foi coletada com uma pipeta plástica com 10µl de solução salina introduzida superficialmente na vagina da rato. Essa gota de solução salina foi coletada e colocada em uma lâmina de vidro para observação em um microscópio ótico (aumento de 400x). As avaliações foram realizadas nas fases ovulatórias (estro e proestro) e não-ovulatórias (diestro e metestro) do ciclo estral.

**Ooforectomia**

Aproximadamente aos 90 dias de idade, após a certificação da vida reprodutiva, as ratas foram anestesiadas com cloridato de cetamina (50mg/kg Ketalar a 10% ou 100mg/ml, Parv-David) e cloridato de alôxia (17mg/kg Rompum a 2% ou 20mg/ml, Bayer) e colocadas em decúbito dorsal para realização de 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 eídutros, incluindo os vasos sanguíneos. Os ovários foram seccionados e os coágulos removidos. A musculatura e a pele foram suturadas e uma dose de antibiótico foi administrada (Bioravitol, 40.000 UI/kg, Ipi<sup>®</sup>).

Para realização do protocolo de avaliação do consumo máximo de oxigênio, os animais foram posicionados individualmente na caixa metabólica, sobre a esteira térmica, onde inicialmente foram coletados os valores de repouso. O tempo de observação foi de aproximadamente 30 minutos. Após esse tempo, o teste de esforço foi imediatamente iniciado e consistiu em submeter o animal a corrente elétrica com velocidade inicial de 0,3 km/h por 3 minutos, sendo esta carga incrementada em 0,3 km/h a cada 3 minutos até que o animal atingisse a exaustão. A avaliação da capacidade física máxima foi feita por meio de respirometria aberta somente no SPI. A determinação metabólica de consumo de oxigênio foi de acordo com o método descrito por Brooks & White<sup>19</sup>. O VO<sub>2</sub> foi avaliado por meio de uma caixa metabólica conectada a um sensor de oxigênio (Flow Lab AD Instruments) que analisa continuamente as amostras das frações expiradas de oxigênio (FEO<sub>2</sub>), bem como os valores das concentrações ambientais de oxigênio (FO<sub>2</sub>). Posteriormente, os valores de VO<sub>2</sub> de cada animal foi calculado pela seguinte fórmula matemática: VO<sub>2</sub> (l (dO<sub>2</sub>) kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) = V<sub>E</sub> (l (dO<sub>2</sub>) min<sup>-1</sup>) x (F<sub>E</sub>O<sub>2</sub> - F<sub>O</sub>) x V<sub>C</sub>, onde V<sub>E</sub> é o volume de ventilação de cada animal em l (dO<sub>2</sub>) min<sup>-1</sup>, F<sub>E</sub>O<sub>2</sub> é a fração expirada de O<sub>2</sub>, F<sub>O</sub> é a fração ambiental de O<sub>2</sub>, V<sub>C</sub> é o volume corporal do animal (kg). OVO<sub>2max</sub> foi obtido por meio da equação: VO<sub>2max</sub> = VO<sub>2</sub> - VO<sub>2</sub> de repouso.

**Análise estatística**  
Os resultados são apresentados como média e erro padrão. O teste de análise de variância (ANOVA), seguido do post hoc de Student Newman Keuls foi aplicado para análise dos dados. Valores de p<0,05 foram considerados significativos.

**RESULTADOS**

O peso corporal foi maior no grupo ooforectomizado quando comparado aos demais grupos (tabela 1).

Na figura 1 podemos observar o comportamento do VO<sub>2</sub> durante o repouso e a cada incremento de carga do teste de esforço. Observa-se aumento do consumo de oxigênio em todos os grupos a cada aumento de carga durante o TE, observando tendência à estabilização de VO<sub>2</sub> nas últimas cargas.

Como pode ser observado na tabela 1, o VO<sub>2</sub> de repouso foi similar entre os grupos. No entanto, o VO<sub>2max</sub> e o VO<sub>2</sub> em 100% foram menores nas ratas na fase não-ovulatória e nas ratas ooforectomizadas em relação ao grupo macho. Foi possível observar redução no VO<sub>2max</sub> de 16,3% no grupo não-ovulatório e de 37,6% no grupo ooforectomizado quando comparados ao grupo de macho. Além disso, os valores de VO<sub>2</sub> em 100% também foram menores de ratas ooforectomizadas quando comparado às ratas nas fases ovulatória e não-ovulatória do ciclo estral, apresentando redução significativa no VO<sub>2</sub> em 100% de 19,4% quando comparado ao grupo não-ovulatório e de 26,7% quando comparado ao grupo ovulatório.

O grupo de machos atingiu VO<sub>2max</sub> em uma maior velocidade quando comparado aos grupos de fêmeas (tabela 1).

Tabela 1. Peso corporal, consumo de oxigênio em repouso (VO<sub>2</sub> repouso), consumo máximo de oxigênio (VO<sub>2max</sub>), consumo máximo de energia (EVO<sub>2max</sub>), VO<sub>2</sub> em 100%, VO<sub>2</sub> em 100% e velocidade para atingir VO<sub>2max</sub> avaliadas nos grupos Machos (M), NOV (não-ovulatório, n=8), OV (ovulatório, n=8) e OF (ooforectomizada, n=8).

	M	NOV	OV	OF
Peso corporal (kg)	242±8	269±4	255±7	264±14
VO <sub>2</sub> repouso (ml/kg/min)	35±1	33±1	37±4	34±2
VO <sub>2max</sub> (ml/kg/min)	104±7	73±4*	87±5	62±3**
EVO <sub>2max</sub> (kJ/kg/min)	37±2	48±4*	49±5	38±4**
Velocidade do VO <sub>2max</sub> (km/h)	17±0,05	15±0,1*	16±0,1*	15±0,1*

\*Diferença estatística entre o grupo de machos e fêmeas (ANOVA e post hoc (M vs NOV e M vs OF)).

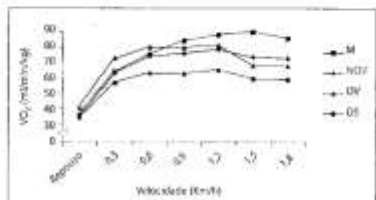


Figura 1. Consumo de oxigênio (VO<sub>2</sub>) durante o teste de esforço realizado nos grupos de ratos machos (M, n=8), ratas fêmeas nas fases não-ovulatórias (NOV, n=8) e ovulatórias do ciclo estral (OV, n=8) e ratas fêmeas ooforectomizadas (OF, n=8).

**DISCUSSÃO**

O teste de esforço físico (TE) é um dos exames não-invasivos mais utilizados para avaliar pacientes com doença cardiovascular. O TE tem por objetivo submeter o paciente a estresse físico, com finalidade de avaliar a resposta clínica, hemodinâmica, eletrocardiográfica e metabólica ao esforço. Essa avaliação permite detectar esquema miocárdico, avaliar as alterações metabólicas, hemodinâmicas, esforço-induzidas, permitindo o diagnóstico e prognóstico das doenças cardiovasculares, bem como a prescrição de exercícios<sup>20</sup>. Vale lembrar que o consumo de oxigênio representa, hoje, não só um indicador de desempenho, mas um marcador prognóstico em cardiopatas<sup>21</sup>. Recentemente, demonstramos correlação positiva entre a velocidade atingida no teste de esforço e o consumo de oxigênio em ratos<sup>22</sup>.



Como o  $VO_{2max}$  é frequentemente expressado em quilogramas de peso corporal (ml/kg/min), mudanças no peso corporal podem afetar o  $VO_{2max}$ <sup>15</sup>. No presente estudo, o peso corporal foi maior nas ratas ooforectomizadas em relação aos demais grupos, o que já era esperado, pois diversos estudos demonstram que ratas após a privação dos hormônios ovarianos apresentam aumento significativo do peso corporal<sup>16</sup>.

Vale ressaltar que os valores obtidos de  $VO_{2max}$  (de  $VO_{2max}$  e  $VO_{2max}$ ) no presente estudo estão de acordo com dados encontrados na literatura para ratas adultas normais<sup>14,16</sup>.

É conhecido que homens possuem maior  $VO_{2max}$  que mulheres<sup>17,18</sup>. Essa diferença é resultado de maiores concentrações de hemoglobina, além de um volume sanguíneo maior em homens, o que resulta em mais  $O_2$  transportado aos tecidos<sup>19</sup>. No presente estudo, o grupo de ratas machos apresentou maior  $VO_{2max}$  quando comparado aos grupos ovariectomizado e ooforectomizado, corroborando com dados presentes na literatura, observados em homens e mulheres.

Lebrun<sup>20</sup> publicou uma revisão de literatura na qual analisou os efeitos do ciclo menstrual no desempenho atlético. Nessa revisão, a maioria dos achados relatou uma melhora de desempenho na fase pós-menstrual. Burnows et al.<sup>21</sup>, em outra revisão, desta vez sobre treinamento para corrida de longa duração, sugeriram que o ciclo menstrual, bem como o uso de contraceptivos orais, não afetam o desempenho das atletas. Da mesma forma, Jansz De Jonge<sup>22</sup> também não encontrou diferenças durante as diferentes fases do ciclo menstrual para as medidas de lactato, concentração de hemoglobina e  $VO_{2max}$ . Por outro lado, Charkouian & Johnson<sup>23</sup> demonstraram que o desempenho físico pode variar consideravelmente durante as distintas fases do ciclo menstrual. Além disso, Lebrun et al.<sup>24</sup> observaram diferença, tanto para o  $VO_{2max}$  relativo quanto para o  $VO_{2max}$  absoluto nas diferentes fases do ciclo, sendo que durante a fase lútea foi observada redução da capacidade aeróbica. No presente estudo, observamos um aumento de 1,5% no  $VO_{2max}$  nas ratas durante as fases ovulatórias quando comparado às fases não-ovulatórias, no entanto, sem diferença estatística. Vale lembrar que a fase não-ovulatória em ratas corresponde à fase lútea em mulheres, período em que os níveis de estrogênio e progesterona estão elevados<sup>25</sup>.

Além das flutuações hormonais decedentes das diferentes fases

do ciclo, há um período na vida da mulher denominado climatério. O climatério é caracterizado pela diminuição da atividade ovariana, a qual ocorre de forma lenta, com redução progressiva dos níveis circulantes de hormônios sexuais femininos<sup>26</sup>. É um período que continua após a menopausa e segue até a senescência<sup>27</sup>. Durante este período há mudanças na composição corporal da mulher, incluindo aumento das adipócitos totais e redistribuição da gordura abdominal<sup>28,29</sup>, o que está associado ao aumento do risco de aterosclerose, aumentando, assim, o risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares<sup>27</sup>.

Nosso grupo vem estudando os efeitos da privação dos hormônios ovarianos em modelo experimental, bem como o papel do treinamento e da terapia estrogênica em parâmetros cardiovasculares e de estresse oxidativo<sup>30</sup>. No presente estudo, a privação dos hormônios ovarianos induziu redução do  $VO_{2max}$  em relação aos demais grupos estudados, sugerindo como se observa em mulheres menopausadas, que a privação crônica dos hormônios ovarianos induz redução da capacidade aeróbica<sup>31</sup>. Por outro lado, em um modelo experimental de menopausa, Huet et al.<sup>32</sup> não observaram diferença na capacidade de exercício, avaliado pelo teste de esforço máximo em estera, entre ratas saudáveis e ooforectomizadas.

Em conjunto, os achados do presente estudo sugerem que as flutuações hormonais decedentes das diferentes fases do ciclo estável e da privação dos hormônios ovarianos podem induzir mudanças no  $VO_{2max}$ . No entanto, estudos futuros devem estabelecer os mecanismos envolvidos em tais alterações do consumo máximo de oxigênio.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 2005/00329-2, 2005/0795-5, 2011/16441-2, 2012/20141-5), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CNPq/PVE: 88881.062178/2014/1).

Todos os autores declaram não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

REFERÊNCIAS

1. Allgauer H, Garcia E, Balci S, Kaya C, Mavretic R, Meli MM, et al. Estrógenos, androgênios e Correlação do Estado Hormonal e Sinal de Temperatura em Esclerose. *Imunidade do CNPq*. Rio de Janeiro: 2010;14(2):54-64.
2. Quinn SC, Jozwik JB. Fisiologia do exercício físico e aplicação aos cuidados primários e secundários. São Paulo: Manole; 2009.
3. Epling J, Gershwin ME, Shapiro R, Guo Z, Behr D, Becker DM, et al. Effect of testosterone and estradiol on pulmonary and arterial blood flow in rats: implications for the function of the heart. *Am J Physiol*. 2008;295(2):R285-93.
4. Lange R, Day L. Female reproductive cycle. *Br Med J*. 2005;330(7504):1014-18.
5. Sauer R, Hoops AH, Burnows DR. Changes in muscle energy metabolism and fatigability during the human menstrual cycle. *J Physiol*. 1996;485(2):331-37.
6. Toralbayeva SA, Mardon M. Hormonal influence of menstrual cycle and testosterone on performance in noncompetitive heat stress. *Eur J Appl Physiol*. 1995;70(3):30-35.
7. Charkouian B, Johnson JM. Female reproductive hormones and thermoregulatory control of skin blood flow. *Exp Physiol*. 2002;87(1):1-7.
8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17274446>
9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17274446>
10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17274446>
11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17274446>
12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17274446>
13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17274446>
14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17274446>
15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17274446>
16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17274446>
17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17274446>
18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17274446>
19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17274446>
20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17274446>
21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17274446>
22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17274446>
23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17274446>
24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17274446>
25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17274446>
26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17274446>
27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17274446>
28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17274446>
29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17274446>
30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17274446>
31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17274446>
32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17274446>

