

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

**Papel do exercício físico aeróbio na modulação das
disfunções neuroimunes: avaliações em modelo
experimental de sepse e de síndrome metabólica**

São Paulo

2018

Guilherme Lemos Shimojo Ferreira

**Papel do exercício físico aeróbio na modulação das
disfunções neuroimunes: avaliações em modelo
experimental de sepse e de síndrome metabólica**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Ciências da Reabilitação como
requisito para obtenção do grau de
Doutor em Ciências da Reabilitação.

Orientador: Profa. Dra. Kátia De Angelis

São Paulo

2018

Ferreira, Guilherme Lemos Shimojo.

Papel do exercício físico aeróbio na modulação das disfunções neuroimunes: avaliações em modelo experimental de sepse e de síndrome metabólica. / Guilherme Lemos Shimojo Ferreira. 2018.

125 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2018.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Kátia De Angelis.

1. Exercício físico aeróbio. 2. Sepse. 3. Síndrome metabólica. 4. Sistema nervoso autônomo. 5. Disfunções cardiometabólicas.

I. De Angelis, Kátia. II. Título

CDU 615.8

São Paulo, 02 de Agosto de 2018.

TERMO DE APROVAÇÃO

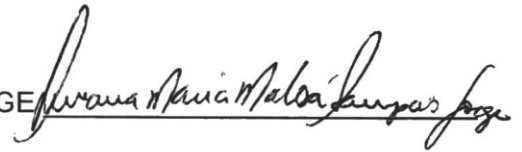
Aluno (a): Guilherme Lemos Shimojo Ferreira

Título da Tese: " Papel do exercício físico aeróbico na modulação das disfunções neuroimunes. Avaliação em modelo experimental de seps e de síndrome metabólica.

Presidente: PROFA. DRA. KATIA DE ANGELIS



Membro: PROFA. DRA. LUCIANA MARIA MALOSÁ SAMPAIO JORGE



Membro: PROF. DR. HUMBERTO DELLÊ



Membro: PROFA. DRA. EDILAMAR MENEZES DE OLIVEIRA



Membro: PROF. DR. BRUNO RODRIGUES



DEDICATORIA

A minha mãe, Maria de Lourdes Regina da Silva Lemos, que desde sempre acreditou em mim mesmo eu sendo terrível na minha adolescência. Minha mãe e meu avô minha base e meu espelho para a vida. Eles me ensinaram sempre a fazer o bem, me ensinaram valores; tornei-me quem eu sou hoje por causa deles! Amo vocês!

Ao meu pai Wilson, aos meus irmãos, Gabriel, Mara, Lilian e Luciano, obrigado por tudo e por todo incentivo e amor que recebo de vocês.

A minha família que não é pequena, obrigado por tudo !

Só o que é bom dura tempo o bastante
pra se tornar inesquecível.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por tudo até aqui.

Entrei no laboratório em 2010, já se passaram 8 anos desde então. Eu agradeço a Profa Kátia De Angelis, por toda orientação concedida a mim! Além de orientadora e professora, ela é meio mãe também. Agradeço por tudo que fez por mim não só na vida acadêmica, mas também na minha vida pessoal. Não faz só por mim, mas por todos, tem sempre algo a ensinar, já levei algumas broncas, puxões de orelha e tudo isso fez parte do meu crescimento, me tornei algo que eu jamais pensei na vida.

Agradeço de forma especial a Camila Mendes Barreto por me apoiar, suportar e estar do meu lado, longe ou perto. Aos meus amigos para vida que fiz dentro do laboratório Renata e Fernando por tudo que me ensinaram e ainda ensinam todos os dias. Aos colegas de laboratório Mário César, Julia Paiva, Marina Raschio, Sarah Freitas, Dani, Amanda, Camila e Ursula Socci.

Não poderia deixar de agradecer o Dr. Luis Ulloa, meu orientador no intercâmbio nos EUA e seus alunos Biju, Mohammed e Patrick que tive o privilégio de acompanhar nos experimentos e pude aprender muito com eles. Ainda no EUA, agradeço demais aos meus pais americanos Patty e Army Armanderiz, por me receberem tão bem em sua casa, por cuidarem de mim e por me fazerem me sentir em casa mesmo estando longe. Aos verdadeiros amigos que fiz, Timur, Chris, Cyrus e Estelle obrigado por todo suporte, apoio e festas.

A UNINOVE e a CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

As integrações das redes neurais representam mecanismos eficientes selecionados pela evolução para coordenar a homeostase fisiológica. É interessante notar que correlações foram demonstradas entre disfunções cardiovasculares e metabólicas com alterações autonômicas e inflamatórias (neuroimunes). O exercício físico é um fator importante para prevenir as disfunções associadas as doenças cardiometabólicas. Assim, estudos recentes enfocam nos mecanismos induzidos pelo exercício para controlar essas disfunções. Neste estudo, avaliamos os efeitos do exercício físico aeróbio agudo ou crônico nas disfunções neuroimunes induzidas por modelo experimental de sepse ou de síndrome metabólica. Para atender a estes objetivos separamos o presente trabalho em 2 estudos. No primeiro estudo, relatamos que uma sessão de exercício de intensidade moderada atenua a inflamação e a disfunção orgânica através da indução de dopamina mediada pela ativação do nervo vago. O exercício aumentou os níveis séricos de dopamina e a adrenalectomia impediu o potencial de exercício de induzir a dopamina e atenuar o TNF. O agonista dopaminérgico D1, o fenoldopam, inibiu a produção de TNF em esplenócitos. Por outro lado, o antagonista-D1, butaclamol, impediu o controle do exercício do TNF. No segundo estudo, o consumo de frutose induziu prejuízo na variabilidade do intervalo de pulso (VAR-IP) desde os 7 dias de protocolo. Adicionalmente, houve um aumento do balanço simpato-vagal em 15, 30 e 60 dias de protocolo em comparação aos demais grupos. O TF preveniu o prejuízo observado na VAR-IP com 7 dias de protocolo, e melhorou o balanço simpato-vagal (FT vs. F). Observamos um prejuízo no balanço redox, na oxidação de proteínas bem como redução da atividade da enzima superóxido dismutase nos grupos F em 7, 15, 30 e 60 dias de protocolo em relação aos grupos C. Somado a isso o consumo de frutose induziu um aumento de oxidação de lipídeos em 30 e 60 dias (F vs. FT). O TF foi eficaz em prevenir esses prejuízos induzidos pelo consumo crônico de frutose. Adicionalmente, o TF preveniu o aumento de mediadores inflamatórios (TNF alfa e IL-6) e de NF-Kappa β observado nos grupos frutose a partir de 15-30 dias de protocolo, bem como aumentou os níveis de IL-10 (anti-inflamatório). Em conjunto nossos achados reforçam o papel do sistema nervoso autônomo na gênese das disfunções cardiometabólicas e evidenciam um importante papel do treinamento físico aeróbio na prevenção dessas alterações. Concluindo, nossos resultados evidenciam que as disfunções neuroimunes ocorrem precocemente em modelos experimentais de sepse ou de síndrome metabólica e que o exercício físico aeróbio de intensidade moderada é eficaz em prevenir/atenuar tais alterações impactando em prevenção de alterações cardiometabólicas clinicamente detectáveis nestas condições. No entanto, estudos futuros são necessários para determinar como diferentes tipos de exercício regulam diferentes redes neuronais e sua contribuição para os benefícios cardiovasculares, metabólicos e imunológicos induzidos pelo exercício físico. Estes estudos poderão permitir a concepção de novas abordagens para o tratamento de doenças neuroimunes e cardiometabólicas.

PALAVRAS CHAVE: Exercício físico aeróbio, sepse, síndrome metabólica, sistema nervoso autônomo, inflamação, estresse oxidativo

ABSTRACT

The integrations of neural networks represent efficient mechanisms selected by evolution to coordinate physiological homeostasis. It is interesting to note that correlations were demonstrated between cardiovascular and metabolic dysfunctions with autonomic and inflammatory (neuroimmune) disorders. Physical exercise is an important approach to prevent dysfunctions associated with diseases. Thus, recent studies focus on mechanisms induced by exercise to control these dysfunctions. In this thesis, we evaluated the effects of acute or chronic aerobic exercise on neuroimmune dysfunctions induced by experimental models of sepsis or metabolic syndrome. To reach these objectives, we divided the present study into 2 studies. In the first study, we reported that an exercise session of moderate intensity attenuates inflammation and organic dysfunction through dopamine induction mediated by activation of the vagus nerve. Exercise increased serum dopamine levels and adrenalectomy hindered the exercise potential of inducing dopamine and attenuating TNF. The D1 dopaminergic agonist, fenoldopam, inhibited TNF production in splenocytes. On the other hand, the D1-antagonist, butaclamol, prevented control of TNF exercise. In the second study, the consumption of fructose induced impairment in the variability of pulse interval (VAR-IP) since the 7-day protocol. In addition, there was an increased sympathovagal balance at 15, 30 and 60 days of protocol compared to the other groups. TF prevented the observed injury in the VAR-IP with 7 days of protocol, and improved the sympatho-vagal balance (FT vs. F). We observed a reduction in redox balance, protein oxidation as well as reduction of superoxide dismutase enzyme activity in the F groups at 7, 15, 30 and 60 days of protocol in relation to groups C. In addition, the consumption of fructose induced an increase of lipid oxidation at 30 and 60 days (F vs. FT). TF was effective in preventing these losses induced by chronic fructose consumption. In addition, TF prevented the increase of inflammatory mediators (TNF alpha and IL-6) and NF-Kappa β observed in the fructose groups from 15-30 days of protocol, as well as increased levels of IL- inflammatory). Together our findings reinforce the role of the autonomic nervous system in the genesis of cardiometabolic dysfunctions and show an important role of aerobic physical training in the prevention of these alterations. In conclusion, our results show that neuroimmune dysfunctions occur early in experimental models of sepsis or metabolic syndrome and that aerobic physical exercise of moderate intensity is effective in preventing / attenuating such alterations, impacting on prevention of clinically detectable cardiometabolic alterations in these conditions. However, future studies are needed to determine how different types of exercise regulate different neural networks and their contribution to the cardiovascular, metabolic and immunological benefits induced by exercise. These studies may allow the design of new approaches for the treatment of neuroimmune and cardiometabolic diseases.

KEY WORDS: Aerobic exercise, sepsis, metabolic syndrome, autonomic nervous system, inflammation, oxidative stress

SUMÁRIO

Resumo
Abstract
Lista de Tabelas
Lista de Figuras
Lista de Abreviaturas

1	CONTEXTUALIZAÇÃO.....	Erro! Indicador não definido.
1.1	Alterações neuroimunes em condições de disfunções fisiológicas ...	20
1.2	Sepse e disfunção neuroimune.....	21
1.3	Disfunções cardiometabólicas e doença cardiovascular.....	23
1.4	Efeitos do exercício físico em disfunções fisiológicas.....	26
2	OBJETIVO	30
2.1	Objetivo Geral	30
2.2	Objetivos específicos	30
3	RESULTADOS.....	31
3.1	Estudo I	32
3.2	Estudo II	54
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
5	REFERÊNCIAS	84
6	ANEXOS	97
6.1	Tabelas Estudo II.....	93
6.2	Parecer do CEUA	100
6.3	Artigos aceitos/submetidos durante o período de doutoramento	101

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 01	Peso corporal, tecido adiposo retroperitoneal e teste de esforço nos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbio (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias de protocolo.....	93
Tabela 02	Triglicerídeos, glicemia e teste de tolerância à insulina nos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbio (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias de protocolo.....	94
Tabela 03	Variáveis hemodinâmicas nos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbio (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias de protocolo.....	95
Tabela 04	Modulação autonômica cardiovascular nos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbio (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias de protocolo.....	96
Tabela 05	Perfil inflamatório nos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbio (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias de protocolo.....	97
Tabela 06	Lipoperoxidação, oxidação de proteínas, enzimas antioxidantes e balanço redox da glutathione nos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbio (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias de protocolo.....	98
Tabela 07	Expressão Proteica de NADPH oxidase e NF- κ B nos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbio (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias de protocolo.....	99

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01** Uma sessão de exercício aeróbio atenua inflamação sistêmica. Camundongos C57BL / 6 (a) Controle (sem exercício) ou exercício (Ex: após nadar por 1 ou 2h) foram desafiados com LPS (LPS; i.p. 10mg / Kg) e os níveis séricos de TNF foram analisados a 1.5h pós-LPS. + p <0,05 vs LPS (One-way ANOVA; n = 4). (b-h) Camundongos controle ou exercício (Ex) foram desafiados com LPS e níveis séricos de (b) glicose, (c) TNF, (d) IL6, (e) IFN γ , (f) HMGB1, (g) TGF β 1 e (h) IL10 foram analisados nos pontos de tempo indicados. * p <0,05 vs controle, Two-way ANOVA; n = 3)..... 39
- Figura 02** Exercício melhora composição química sanguínea. Camundongos C57BL / 6 controle ou exercício (Ex) foram desafiados com LPS e níveis séricos de (a) anion gap (AnGap), (b) potássio (K), (c) cálcio ionizado (iCa), (d) dióxido de carbono total (TCO₂) , (e) azoto ureico (BUN), (f) creatinina (CR), ou (g) razão de azoto ureico no sangue/creatinina (BUN / CR) foram analisados a 3 ou 24 h após LPS. * p <0,05 vs controle (two-way ANOVA; n = 4)..... 42
- Figura 03** Treinamento físico melhorou a sobrevida na endotoxemia. (a) Análise de sobrevida de Kaplan-Meier de camundongos controle ou exercício (Ex: natação por 1h), desafiados com LPS (i.p. 10mg / Kg; n = 10). (b, c) Os camundongos nadaram por 1h (b) ou 2h (c) durante 1 (1d) ou 7 (7d) dias e, em seguida, os camundongos foram desafiados com LPS, 1 hora após a última sessão de exercício. + p <0,05 vs LPS (One-way ANOVA; n = 4). (d) Camundongos submetidos a natação por 1h por dia durante 1 ou 7 dias, foram desafiados com LPS em 1, 24, 48 ou 72h após a última sessão de exercício. Os níveis séricos de TNF foram medidos 1,5h pós-LPS. (* p <0,05 vs controle, Two-way ANOVA; n = 4). (e) Análise de sobrevivência de Kaplan-Meier de camundongos controle (sem exercício) ou exercício (Ex: natação durante 1 h todos os dias durante 7 dias) antes do desafio com LPS (i.p. 10 mg / kg). §p <0,05 vs controle (teste de Survival Log-rank; n = 18)..... 43

Figura 04 Exercício melhora sobrevida na endotoxemia. Camundongos C57BL / 6 (a) Controle ou exercício (Ex: após nadar por 1 h) foram desafiados com LPS (i.p. 10mg / Kg, n = 4) e as concentrações de TNF nos órgãos indicados foram analisadas às 1,5 h pós-LPS. # p <0,05 vs controle (teste t de Student; n = 3). (b) Camundongos foram submetidos à esplenectomia simulada ou cirúrgica (SPX) 3 dias antes do LPS. (c) Os camundongos controle ou exercício (Ex) foram submetidos a cirurgia (c) cervical bilateral (cVGX), (d) vagotomia subdiafragmática total (sVGX), (e) neurectomia cirúrgica do nervo esplênico (SNX) por dois dias antes da LPS. + p <0,05 vs LPS (One-way ANOVA; n = 4). (f) Cultura primária de esplenócitos de camundongos virgens (sem exercício) foi incubada in vitro com soro de controle ou exercício (Ex), por 3 h antes do teste in vitro com LPS. (g) Cultura primária de esplenócitos de camundongos controle ou exercício (Ex) foram desafiados in vitro com LPS. Os níveis de TNF foram analisados nos meios de cultura condicionados às 3 h pós-LPS. (* p <0,05 vs controle, Two-way ANOVA; n = 4)..... 46

Figura 05 Antagonista dopaminérgico D1 impediu o controle do exercício sobre a produção de TNF. (a) Camundongos foram submetidos à adrenalectomia simulada ou cirúrgica (ADX) três dias antes do LPS. Controle ou exercício (Ex: natação por 1h) os camundongos foram desafiados com LPS e as concentrações séricas de TNF foram analisadas às 1,5 h pós-LPS. + p <0,05 vs LPS (One-way ANOVA; n = 4). (b) Os níveis séricos de dopamina (DA) foram analisados em camundongos controle ou exercício (Ex) nos momentos indicados após o exercício. (* p <0,05 vs controle, Two-way ANOVA; n = 3). (c) Camundongos foram submetidos a adrenalectomia simulada ou cirúrgica (ADX) 3 dias antes do LPS. Camundongos controle ou exercício (Ex) foram desafiados com LPS e as concentrações séricas de dopamina (DA) foram analisadas 1h após o LPS. + p <0,05 vs LPS (One-way ANOVA; n = 4). (d) Culturas primárias de esplenócitos de camundongos controle foram tratadas com dopamina (DA), fenoldopam (FE) ou pergolide (PE) durante 1 h antes do desafio com LPS. Os níveis de TNF foram analisados

nos meios de cultura condicionados às 3 h pós-LPS. (* p <0,05 vs controle, Two-way ANOVA; n = 3). (e-f) Os camundongos foram tratados com butaclamol às 2 h (e) antes ou (f) logo após o exercício. Os camundongos controle ou exercício (Ex) descansaram durante 1 h e depois foram desafiados com veículo ou LPS (i.p. 10 mg / kg; n = 4). As concentrações séricas de TNF foram analisadas às 1,5 h pós-LPS. + p <0,05 vs LPS (One-way ANOVA; n = 4)..... 49

Figura 06	Sequência Experimental.....	56
Figura 07	Peso corporal e do tecido adiposo retroperitoneal dos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbio (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias. † p< 0,05 vs. 7 e 15 dias no mesmo grupo; ‡ p< 0,05 vs. 7,15 e 30 dias no mesmo grupo; § p< 0,05 vs. grupo C no mesmo tempo; # p< 0,05 vs. grupo F no mesmo tempo.....	64
Figura 08	Triglicerídeos, glicose e constante de decaimento da glicose (Kitt) dos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbio (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias.	65
Figura 09	Tempo do teste de esforço máximo dos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbio (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias. ‡ p< 0,05 vs. 7,15 e 30 dias no mesmo grupo; § p< 0,05 vs. grupo C no mesmo tempo; # p< 0,05 vs. grupo F no mesmo tempo.....	66
Figura 10	Pressão arterial diastólica, pressão arterial sistólica, pressão arterial média e frequência cardíaca dos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbio (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias.	67
Figura 11	Variabilidade do intervalo de pulso (VAR IP), raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre os intervalos de pulso sucessivos (RMSSD) e balanço simpato-vagal (LF/HF) dos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbio (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias.	68

Figura 12	Banda de baixa frequência da pressão arterial sistólica (BF-PAS) e variabilidade da pressão arterial sistólica (VAR-PAS) dos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbio (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias.....	69
Figura 13	Índice alpha dos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbio (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias.....	70
Figura 14	Fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 6 (IL6) e interleucina 10 (IL10) dos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbio (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias.....	71
Figura 15	Lipoperoxidação (QL), proteínas oxidadas, catalase e superóxido dismutase (SOD) no tecido cardíaco dos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbio (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias.....	72
Figura 16	Razão GSH/GSSG dos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbio (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias.....	73
Figura 17	Subunidade p47 phox da NADPH oxidase no tecido cardíaco dos grupos Controle (C), Frutose (F) e Frutose+treinamento físico aeróbio (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias. Quantificação (A) e Western Blotting (B).....	74
Figura 18	NF- κB no tecido cardíaco dos grupos Controle (C), Frutose (F) e Frutose+treinamento físico aeróbio (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias. Quantificação (A) e Western Blotting (B).....	74

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: graus Celsius

ADX: adrenalectomia

AF: banda de alta frequência

BF: banda de baixa frequência

BSA: albumina

C: grupo controle

CAT: catalase

DM: Diabetes Mellitus

EO: estresse oxidativo

F: grupo frutose

FC: frequência cardíaca

FFT: transformada rápida de Fourier

FT: grupo frutose+treinamento físico aeróbio

GPx: glutathione peroxidase

GSH: glutathione reduzida

GSH/GSSG: razão glutathione reduzida/glutathione oxidada

HF: high frequency band

HMGB1: high mobility group box 1

HRP: peroxidase de rabanete

IFN γ : interferon gama

IL-10: interleucina 10

IL-18: interleucina 18

IL-6: interleucina 6

IP: intervalo de pulso

Kitt: constante de queda da glicose plasmática

LA: limiar lactato

LF: low frequency band

MFEL: máxima fase estável de lactato

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato

NO: óxido nítrico

PA: pressão arterial

PAD: pressão arterial diastólica

PAM: pressão arterial média

PAS: pressão arterial sistólica

PBS: tampão fosfato

PCR: proteína C reativa

PMSF: fenilmetilsulfonil fluoreto

RMSSD: médias das raízes quadradas das diferenças entre intervalos RR sucessivos

RRs: intervalos de pulsos

SHR: ratos espontaneamente hipertensos

SM: síndrome metabólica

SOD: superóxido dismutase

SPX: esplenectomia

sVGX: vagotomia subdiafragmática

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TGF β 1: Transforming growth factor beta 1

TNF : fator de necrose tumoral

VAR-IP: variância do intervalo do pulso

VFC: variabilidade da frequência cardíaca

VGX: vagotomia

VO₂ máx.: consumo máximo de oxigênio

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 Alterações neuroimunes em condições de disfunções fisiológicas

As integrações das redes neurais representam mecanismos eficientes selecionados pela evolução para coordenar a homeostase fisiológica (1-3). O sistema nervoso simpático vem sendo estudado há muitos anos, mas recentemente o potencial do sistema nervoso parassimpático foi descoberto (4, 5).

Neste sentido, uma condição homeostática recentemente identificada, conhecida como reflexo anti-inflamatório colinérgico, parece desempenhar um papel importante nas respostas imunológicas, já que este circuito neural é responsável por converter sinais do cérebro para o baço, de maneira dependente da subunidade $\alpha 7$ do receptor nicotínico de acetilcolina ($\alpha 7nAChR$) diminuindo a síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias (6, 7). A acetilcolina interage com $\alpha 7nAChR$, ativando uma cascata de proteínas que resulta na inibição do NF κ B, diminuindo assim, a síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias(7). O gatilho para ativação deste circuito é a estimulação do nervo vago (8); as fibras ascendentes vagais fazem parte da via *hard-wired*, que informa o Sistema Nervoso Central (SNC) do estado inflamatório dos tecidos, enquanto as fibras descendentes vagais (eferentes do SNC) são responsáveis por modular a resposta inflamatória (9, 10). De fato, estudos com estimulação do nervo vago em modelo experimental de sepse demonstraram redução de várias citocinas inflamatórias sistemicamente, tais como, TNF α e IL-1(9).

É interessante notar que correlações foram demonstradas entre disfunções cardiovasculares e metabólicas com alterações autonômicas e inflamatórias (neuroimunes) em humanos e animais (11-14). Atualmente evidências sugerem que a obesidade visceral e a resistência à insulina aumentam o risco cardiovascular, por mecanismos clássicos (dislipidemia, hipertensão e dismetabolismo da glicose), bem como por alterações na secreção de biomoléculas pelo tecido adiposo, pelos macrófagos infiltrados neste tecido, ou mesmo pelo baço (14-16). De fato, há evidências que a inflamação desempenha um papel importante na gênese de doenças cardiovasculares, incluindo

hipertensão (17) e síndrome metabólica (18). Somado a isso, Van Gaal et al. (2006) (14) em uma elegante revisão publicada na *Nature* concluiu que a resistência à insulina e níveis elevados de inflamação e de estresse oxidativo são caminhos comuns na patogênese da obesidade e doenças cardiovasculares.

1.2 Seps e disfunção neuroimune

Seps é definida pelos sinais clínicos de uma resposta imune à infecção (19, 20). Originalmente, o diagnóstico de seps exige a confirmação de infecção e pelo menos dois dos seguintes sinais clínicos: anormalidades da temperatura corporal (hipotermia ou hipertermia), frequência cardíaca (taquicardia), frequência respiratória (taquipnéia) e contagem de leucócitos (leucocitopenia ou leucocitose). A seps é definida como "grave" quando esses achados ocorrem em associação com sinais de disfunção dos órgãos, como hipoxemia, oligúria, acidose láctica, elevação enzimas hepáticas ou função cerebral alterada (19, 20).

Embora a seps seja normalmente originada por uma infecção e, apesar dos novos antibióticos, a seps grave continua a ser um grande desafio clínico na medicina moderna, matando mais de 250.000 americanos a cada ano (21-24). Além da infecção, a seps grave também é caracterizada pela produção excessiva de citocinas inflamatórias que causam inflamação sistêmica prejudicial. De fato, a inflamação é fundamental para combater infecções, mas ao mesmo tempo é um grande desafio clínico na medicina moderna, contribuindo para múltiplos transtornos.

Novos antibióticos são mais eficazes no controle de infecções, mas não controlam a inflamação deletéria. Entre as citocinas inflamatórias, o Fator de Necrose Tumoral (TNF) é um fator crítico que regula a resposta imune inata para controlar infecções ou traumas (21, 25-29). Entretanto, a produção excessiva de TNF torna-se mais perigosa que a infecção original e causa inflamação sistêmica, choque cardiovascular e falência múltipla de órgãos letal (30-32). A inibição da produção de TNF previne o choque séptico, danos a órgãos e melhora a sobrevivência em endotoxemia experimental, bacteremia e seps (30, 33,

34). O TNF não é produzido apenas durante as infecções, mas também desempenha um papel crítico em vários distúrbios inflamatórios, incluindo a artrite reumatoide (35). Embora o TNF desempenhe um papel crítico na sepse, a sepse é caracterizada pela produção de múltiplos fatores inflamatórios e anti-inflamatórios que contribuem para a falência múltipla de órgãos.

Estudos elegantes do grupo do professor Tracey, demonstraram a importância do nervo vago na resposta inflamatória em cultura de macrófagos bem como em modelos experimentais, identificando que o nervo vago pode modular o sistema imunológico (15, 36). Neste sentido, diversos estudos têm utilizado o modelo de sepse para entender, principalmente, os mecanismos associados as disfunções neuroimunes (1, 4). Um estudo elegante publicado na Nature, apresentou um novo mecanismo anti-inflamatório mediado pelos nervos ciático e vago que modularam a produção de catecolaminas nas glândulas supra-renais. Neste estudo, foi relatado que a ativação do nervo vago e do nervo ciático através de eletroacupuntura foi eficaz em controlar a inflamação sistêmica, através da produção de dopamina na medula supra-renal (4). De fato, β -adrenoceptores e receptores dopaminérgicos tipo D1 sinalizam proteínas Gs, ativam adenilato ciclase, proteínas quinase A e proteínas de ligação ao elemento de resposta cAMP (CREB) podendo inibir o fator de transcrição nuclear NF- κ B e a produção de fatores inflamatórios (37). Assim, esforços recentes se concentram em estudar os mecanismos que regulam a produção desses fatores inflamatórios e sua potencial tradução clínica para o tratamento de doenças infecciosas e inflamatórias.

1.3 Disfunções cardiometabólicas e doença cardiovascular

O consumo de frutose vem crescendo no mundo ocidental em razão dos produtos industrializados (38, 39). Neste sentido, observou-se um aumento de 40% no consumo de bebidas açucaradas derivadas do xarope de milho nos últimos 30 anos (40). Sabe-se que o aumento no consumo de frutose causa alterações cardiometabólicas tais como, resistência à insulina, hiperglicemia, hipertensão, níveis elevados de triglicérides, dislipidemia e obesidade abdominal (38, 41-43). O conjunto destes fatores pode levar a um quadro clínico de

síndrome metabólica (41), o qual está associado a um aumento importante no desenvolvimento do diabetes e das doenças cardiovasculares (44-46). É importante destacar que a doença cardiovascular é o principal problema de saúde pública no mundo (47, 48), alcançando números mundialmente alarmantes de mortalidade (49).

Estudos clínicos e epidemiológicos têm demonstrado a associação do consumo de frutose com o desenvolvimento da hipertensão arterial (50, 51). De fato, o alto consumo de frutose está associado a níveis elevados de pressão arterial independente do histórico familiar positivo para hipertensão (52). Vale ressaltar que sujeitos com histórico positivo de diabetes ou hipertensão já apresentam alterações na função autonômica cardiovascular (53). A ingestão aguda de frutose em humanos saudáveis aumentou significativamente a frequência cardíaca, a pressão arterial, a variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) e diminuiu a sensibilidade barorreflexa (54). Esses prejuízos associados à elevada ingestão de frutose na dieta são fortes preditores de mortalidade por doença cardiovascular (55, 56). De fato, vale ressaltar que pacientes com síndrome metabólica apresentam uma maior prevalência de acidente vascular encefálico e infarto do miocárdio quando comparados a paciente sem síndrome metabólica (57).

Neste sentido, a utilização de modelos animais é importante para a compreensão da fisiopatologia dessa síndrome (58). Estudos anteriores demonstraram que modelos experimentais submetidos à dieta com elevada quantidade de frutose induzem alterações cardiometabólicas semelhantes às observadas na síndrome metabólica em humanos, como a resistência à insulina, dislipidemia e aumento da pressão arterial (11, 59-63). Estudos desenvolvidos pelo nosso grupo demonstraram que dietas ricas em frutose induziram disfunção do sistema nervoso em animais adultos de ambos os sexos (11, 60, 61, 64, 65). Além disso, demonstramos que somente 8 semanas de sobrecarga de frutose foi suficiente para induzir em camundongos machos alterações cardiovasculares e metabólicas como intolerância à glicose (12), resistência à insulina e hipertensão arterial (65). Corroborando com os resultados obtidos em machos, evidenciamos que a resistência à insulina estava associada à disfunção autonômica (redução do tônus vagal) em ratas adultas fêmeas saudáveis submetidas à sobrecarga de frutose na água de beber (11). Tais dados

evidenciam que a sobrecarga de frutose na dieta de ratos ou camundongos adultos induz disfunções na regulação cardiovascular que foram acompanhadas de aumento da pressão arterial, resistência à insulina, intolerância à glicose e dislipidemia.

Estudos prévios do nosso grupo observaram em camundongos que as disfunções do controle autonômico cardiovascular precedem alterações metabólicas em modelo de consumo de frutose (65). Neste sentido, muitos componentes da síndrome metabólica são caracterizados por um aumento na atividade do sistema nervoso simpático (66, 67). Além disso, a resistência à insulina tem sido considerada um importante fator na gênese da síndrome metabólica (67, 68). Correlações foram demonstradas entre disfunções cardiovasculares, autonômicas e metabólicas em humanos e animais (11-14). Evidências sugerem que a inflamação desempenha um papel importante na gênese de doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão (17, 69) e síndrome metabólica (18). Neste sentido, Leibowitz et al. (2013) (69) sugerem que o sistema imunológico, particularmente a resposta imune adaptativa, podem estar envolvidos no desencadeamento destes processos inflamatórios. Somado a isso, Van Gaal et al. (2006) (14) em uma elegante revisão publicada na *Nature* concluíram que a resistência à insulina e níveis elevados de inflamação e de estresse oxidativo são caminhos comuns na patogênese da obesidade e doenças cardiovasculares.

O aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias tais como: proteína C reativa (PCR), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF alfa) (70, 71) estão associados ao maior risco cardiovascular e ao aumento da morbidade e mortalidade entre a população em geral (70, 72). No entanto, estudos anteriores têm demonstrado que citocinas pró-inflamatórias como TNF alfa aumentam o estresse oxidativo e regulam negativamente suas enzimas antioxidantes (73, 74). O termo estresse oxidativo descreve a condição resultante do desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio (íons/moléculas com elétrons não pareados ou ligações instáveis) e suas enzimas antioxidantes (75). Vale destacar que um número crescente de evidências sugere que a produção aumentada de espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido e o radical hidroxila, participam criticamente da patogênese das doenças coronarianas, hipertensão, aterosclerose e síndrome metabólica (76, 77). Neste

sentido, vale ressaltar que o óxido nítrico quando produzido em excesso tem capacidade de reagir com outros radicais como por exemplo, pelo radical superóxido (75, 78, 79) formando um potente radical oxidante denominado peroxinitrito (75). Sugere-se ainda que o aumento do óxido nítrico e do ânion superóxido em situações de estresse cause alterações na função dos pressorreceptores (80, 81). Dentre muitas evidências, investigadores sugerem que o aumento excessivo de espécies reativas de oxigênio pode ser considerado um dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de doença cardiovascular (82, 83). Desta forma, estudos evidenciam que a síndrome metabólica é caracterizada pelo aumento excessivo de espécies reativas de oxigênio, contribuindo para o desenvolvimento do dano cardíaco (84, 85). Em contrapartida, mecanismos antioxidantes como a enzima superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPx) e o sistema não enzimático tem o papel de manter a homeostase redox (75).

Além disto, o tecido adiposo em excesso é considerado também uma fonte de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF alfa, resultando em uma potente produção de espécies reativas de oxigênio. Em contrapartida, a interleucina-10 (IL-10) previne os danos e alterações causadas pelo TNF alfa (74). Martín -Cordero et al. (2011) (86) sugerem que elevados níveis circulantes de IL-6 e noradrenalina (NA) são a origem das desordens metabólicas e inflamatórias na síndrome metabólica. Somado a isso, foi observado níveis séricos elevados de interleucina 18 (IL-18) em pacientes com síndrome metabólica, mostrando também que essa citocina estava associada com obesidade e resistência à insulina, independente da síndrome metabólica (87, 88). Tais disfunções já foram descritas em outras doenças de natureza inflamatória, com envolvimento de citocinas, catecolaminas e liberação glicocorticoides por meio da ativação do sistema nervoso simpático (89).

Neste sentido, Schlaich et al. (2003) (90) demonstraram que a elevação da atividade simpática, devido um aumento da liberação de norepinefrina predispõe o desenvolvimento e progressão de lesões em órgãos alvo, conferindo um pior prognóstico clínico. Vale destacar que há evidências convincentes de que o desenvolvimento de um grupo diverso de doenças, como hipertensão, diabetes e doença cardíaca isquêmica, é favorecido pelo aumento da atividade simpática neural, resultando em disfunção endotelial, dislipidemia, resistência à insulina,

inflamação e estresse oxidativo (13). Nosso grupo de pesquisa demonstrou que 8 semanas de alto consumo de frutose induz prejuízo no controle autonômico cardíaco, provavelmente devido uma redução do sistema autônomo parassimpático (11).

Em conjunto, estes estudos sugerem que o sistema nervoso autônomo, principalmente o nervo vago, tem um importante papel na modulação da inflamação, e que a frutose é um importante fator no desenvolvimento da síndrome metabólica. Todavia, nos estudos de nosso grupo, bem como de outros grupos (11, 60, 62, 63, 65, 91) o modelo de síndrome metabólica induzido por sobrecarga de frutose foi iniciada na fase adulta dos animais, ficando a dúvida de qual seria o curso temporal das alterações cardiometabólicas desta dieta iniciada logo após o desmame (30 dias de vida) e seguida até a fase adulta (90 dias de vida) em ratos Wistar.

Neste sentido, no presente estudo foi avaliado os mecanismos associados as disfunções neuroimunes em camundongos C57bl/6 desafiados com LPS bem como o curso temporal (7, 15, 30 e 60 dias) das alterações na modulação autonômica cardiovascular e em parâmetros de inflamação, de estresse oxidativo induzidas pela da sobrecarga de frutose iniciada após 30 dias de vida em ratos Wistar. A hipótese do presente estudo é que o nervo vago modula as repostas neuroimunes e que alterações no controle autonômico precedem alterações cardiometabólicas em animais Wistar tratados com frutose. Neste sentido, a disfunção autonômica induziria aumento de fatores inflamatórios e de estresse oxidativo, promovendo alterações cardiometabólicas, como o aumento da pressão arterial e dos triglicerídeos plasmáticos e resistência à insulina.

1.4 Efeitos do exercício físico em disfunções fisiológicas

O exercício físico aeróbio é responsável por adaptações estruturais e funcionais no sistema cardiovascular e no sistema nervoso autônomo (92). Desta forma, já está bem estabelecido os efeitos benéficos do exercício físico como uma abordagem não farmacológica na prevenção e tratamento da hipertensão, da resistência à insulina, no diabetes, na dislipidemia, na obesidade, na síndrome metabólica, na artrite, nos distúrbios pulmonares, nas demência, na

depressão e em vários tipos de câncer (93-96). É interessante notar que uma das principais adaptações do treinamento físico aeróbio é a melhora do sistema nervoso autônomo, podendo, portanto, modular o reflexo colinérgico anti-inflamatório.

O exercício regular proporciona benefícios para prevenir distúrbios metabólicos e imunológicos, mas não é uma opção viável para pacientes com morbidade ou mobilidade limitada, como ocorre na sepse. Assim, estudos recentes enfocam os mecanismos induzidos pelo exercício para controlar a inflamação e sua potencial tradução clínica para o tratamento de distúrbios infecciosos e inflamatórios. A maioria dos estudos sobre exercício tem se concentrado em exercícios regulares de alta intensidade ou de longo prazo que causam estresse metabólico ou mecanismos fisiológicos adaptativos (97-104). Os atletas desenvolvem mecanismos cardiovasculares e imunológicos adaptativos e têm níveis mais baixos de repouso de biomarcadores inflamatórios, incluindo TNF e IL6 (105). O treinamento regular de longo prazo parece regular o sistema imunológico, induzindo mecanismos adaptativos metabólicos e epigenéticos. O exercício regular reduz a massa gordurosa visceral e, assim, previne distúrbios associados à obesidade (18, 106-108). Assim, o treinamento em longo prazo pode prevenir a inflamação, diminuindo a produção de adipocinas, fatores inflamatórios produzidos pelos adipócitos e tecido adiposo (106, 109). Além disso, o treinamento regular também induz modificações epigenéticas adaptativas em tecidos imunes e não imunes, reduzindo a produção de fatores inflamatórios em monócitos, macrófagos (110, 111) e músculo esquelético (111-113). Adicionalmente, há evidências que o treinamento físico reduz mortalidade de pacientes pós infarto do miocárdio provavelmente devido a um aumento do componente vagal e a uma diminuição da atividade simpática, bem como uma melhora da sensibilidade dos pressorreceptores (55, 114).

Em modelos experimentais também foi observado que Wistar e SHR machos submetidos ou não ao consumo crônico de frutose apresentam melhora cardiovascular e autonômica após o treinamento físico aeróbio em esteira (115-118). Além disso, sabe-se que existem diversos benefícios associados ao treinamento físico aeróbio no manejo do risco cardiovascular, tais como redução da resistência à insulina, da dislipidemia, da obesidade e do estresse oxidativo

(64, 65, 91, 116, 119). Estudos mais recentes demonstraram que mudanças no sistema barorreflexo precederam as melhorias cardiovasculares e imunológicas após treinamento aeróbio (98). Desta forma, sugere-se que o treinamento físico aeróbio reduz inflamação e estresse oxidativo mediado principalmente pela melhora da modulação autonômica cardiovascular. Dado a importância da melhora do sistema nervoso autonômico, foi observado em mulheres portadoras de síndrome metabólica melhora da função cardiovascular e redução de marcadores sistêmicos de estresse oxidativo após de 18 sessões de exercício físico aeróbio (120). Um outro estudo também com pacientes portadores de síndrome metabólica, observou que após um período de seis meses de treinamento físico aeróbio associado à dieta ocorreu uma diminuição do índice de massa corporal, dos níveis de triglicérides, de colesterol, de glicose sanguínea, de pressão arterial sistólica e diastólica (121).

O exercício físico também apresenta benefícios na ação anti-inflamatória em indivíduos saudáveis (122, 123), e em idosos (124). Adicionalmente, foi observado em um modelo experimental, que o exercício físico aeróbio realizado em esteira durante 16 semanas não induz somente redução de citocinas pró-inflamatórias, mas também atenua a hiperatividade simpática, melhora mediadores anti-inflamatórios e o eixo vasoprotetor do sistema renina angiotensina no cérebro (99). Estudos prévios também demonstraram que ratos Wistar submetidos à sobrecarga de frutose após 10 semanas de treinamento físico aeróbio apresentam melhora em parâmetros morfofuncionais cardíacos, na modulação autonômica cardíaca e também atenuação das alterações metabólicas (91, 115). Todavia, os mecanismos fisiológicos que contribuem para o controle do exercício, do sistema imunológico e se eles são mediados pela neuromodulação não foram esclarecidas. Adicionalmente, o curso temporal dos efeitos do treinamento físico aeróbio nas alterações cardiometabólicas induzidas pelo consumo de frutose logo após o desmame em ratos Wistar também não foram totalmente elucidadas.

Considerado o exposto, são necessários mais estudos que possam auxiliar no entendimento do papel do exercício físico aeróbio na associação de fatores de risco. Neste sentido, no presente estudo avaliamos os mecanismos fisiológicos desencadeados pelo exercício físico aeróbio (1 ou 7 dias) nas disfunções neuroimunes induzidas por um

modelo experimental de sepse. Adicionalmente, avaliamos o curso temporal (7, 15, 30 e 60 dias) dos eventuais efeitos do treinamento físico aeróbio nas alterações cardiometabólicas, na modulação autonômica cardiovascular e em parâmetros de inflamação e de estresse oxidativo em ratos Wistar submetidos à sobrecarga de frutose desde os 30 dias de vida.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi efeitos do exercício físico aeróbio agudo ou crônico nas disfunções neuroimunes induzidas por modelo experimental de sepse ou de síndrome metabólica.

2.2. Objetivos Específicos

Para atender ao objetivo geral, esta tese foi dividida em dois estudos:

- o estudo 1 teve por objetivo analisar os efeitos do exercício aeróbio de intensidade leve (1 ou 7 dias) nas disfunções neuroimunes induzidas pela endotoxina bacteriana (um modelo de sepse);
- o estudo 2 teve por objetivo avaliar o curso temporal (7, 15, 30 e 60 dias) do desenvolvimento de alterações cardiometabólicas induzidas pela sobrecarga de frutose (um modelo de síndrome metabólica) em ratos Wistar, bem como os efeitos do treinamento físico aeróbio em parâmetros autonômicos, de inflamação e estresse oxidativo.

3. RESULTADOS

Os resultados da presente Tese são apresentados no formato de artigos. O estudo I, intitulado “Indução de dopamina através no nervo vago contribui para o exercício controlar inflamação”, e o estudo II, intitulado “Curso temporal das alterações neuroimunes induzidas pelo consumo crônico de frutose: papel do treinamento físico aeróbio”.

3.1 ESTUDO I: INDUÇÃO DE DOPAMINA ATRAVÉS NO NERVO VAGO CONTRIBUI PARA O EXERCÍCIO CONTROLAR INFLAMAÇÃO

INTRODUÇÃO

A inflamação é fundamental para combater infecções, mas ao mesmo tempo é um grande desafio clínico na medicina moderna, contribuindo para múltiplos transtornos. A sepse grave é um dos exemplos clínicos mais dramáticos desse desafio. Embora a sepse seja normalmente originada por uma infecção e, apesar dos novos antibióticos, a sepse grave continua a ser um grande desafio clínico na medicina moderna, matando mais de 250.000 americanos a cada ano (21-24). Além da infecção, a sepse grave também é caracterizada pela produção excessiva de citocinas inflamatórias que causam inflamação sistêmica prejudicial. Novos antibióticos são mais eficazes no controle de infecções, mas não controlam os efeitos deletérios da inflamação. Entre as citocinas inflamatórias, o Fator de Necrose Tumoral (TNF) é um fator crítico que regula a resposta imune inata para controlar infecções ou traumas (21, 25-29). Entretanto, a produção excessiva de TNF torna-se mais perigosa que a infecção original e causa inflamação sistêmica, choque cardiovascular e falência múltipla de órgãos letal (30-32). A inibição da produção de TNF previne o choque séptico, danos a órgãos e melhora a sobrevivência em endotoxemia experimental, bacteremia e sepse (30, 33, 34). O TNF não é produzido apenas durante as infecções, mas também desempenha um papel crítico em vários distúrbios inflamatórios, incluindo a artrite reumatoide (5,6). Embora o TNF desempenhe um papel crítico na sepse, a sepse é caracterizada pela produção de múltiplos fatores inflamatórios e anti-inflamatórios que contribuem para a falência múltipla dos órgãos. Assim, esforços recentes se concentram em estudar os mecanismos que regulam a produção desses fatores inflamatórios e sua potencial tradução clínica para o tratamento de doenças infecciosas e inflamatórias.

Estudos epidemiológicos mostram que o exercício físico está entre os fatores mais importantes que regulam o sistema imunológico e melhoram a qualidade de vida (18, 106-109, 125-129). O exercício diminui o risco de múltiplas condições de risco, incluindo doenças cardiovasculares, hipertensão, aterosclerose, síndrome metabólica, diabetes, artrite, distúrbios pulmonares,

demência, depressão e vários tipos de câncer (97-104). O exercício regular proporciona benefícios para prevenir distúrbios metabólicos e imunológicos, mas não é uma opção viável para pacientes com morbidade ou mobilidade limitada. Assim, estudos recentes enfocam os mecanismos induzidos pelo exercício para controlar a inflamação e sua potencial tradução clínica para o tratamento de distúrbios infecciosos e inflamatórios. A maioria dos estudos sobre exercício tem se concentrado em exercícios regulares de alta intensidade ou de longo prazo que causam estresse metabólico ou mecanismos fisiológicos adaptativos (97-104). Exercícios anaeróbios intensos podem induzir estresse metabólico e hipoglicemia (18, 106-109, 125). Por outro lado, o treinamento a longo prazo induz a adaptação fisiológica, melhorando a frequência cardíaca de repouso, a arritmia sinusal respiratória, o tônus vagal cardíaco e a regulação imunológica (130, 131). Este aumento do tônus vagal pode estar associado com aumento de catecolaminas. Estudo prévio publicado na *nature* observou o potente efeito anti-inflamatório induzido pelo aumento de dopamina mediado pelo nervo vago (4). Os atletas desenvolvem mecanismos cardiovasculares e imunológicos adaptativos e têm níveis mais baixos de repouso de biomarcadores inflamatórios, incluindo TNF e IL6 (105). O treinamento regular de longo prazo parece regular o sistema imunológico, induzindo mecanismos adaptativos metabólicos e epigenéticos. O exercício regular reduz tecido adiposo visceral e, assim, previne distúrbios associados à obesidade (18, 106-108). Assim, o treinamento em longo prazo pode prevenir a inflamação, diminuindo a produção de adipocinas, fatores inflamatórios produzidos pelos adipócitos e tecido adiposo (106, 109). Além disso, o treinamento regular também induz modificações epigenéticas em tecidos imunes e não imunes, reduzindo a produção de fatores inflamatórios em monócitos, macrófagos (110, 111) e músculo esquelético (111-113). Neste artigo, analisamos se uma sessão de exercício aeróbio de intensidade leve pode regular a inflamação e a resposta imune inata à endotoxina bacteriana sem afetar a glicemia ou antes de induzir adaptações cardiovasculares ou epigenéticas. Também analisamos os mecanismos fisiológicos que contribuem para o controle do exercício do sistema imunológico e se eles são mediados pela neuromodulação.

MATERIAL E MÉTODOS

Produtos Químicos e Reagentes: LPS (E.Coli 0111: B4), cloridrato de dopamina, fenoldopam e pergolide foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (Saint Louis, MO) e dissolvidos em PBS estéril, isento de pirogênios (Gibco®, Life Technologies, Grand Island, NY). As tiras de medição de glicose foram compradas na PharmaTech Solutions, Inc (Westlake village, CA). O butaclamol (15 mg / kg de peso corporal i.p) foi administrado 90 minutos antes ou imediatamente após o exercício. O pentobarbital sódico foi adquirido da Diamondback (Scottsdale, AZ); cetamina da Henry Schein animal health (Dublin, OH); xilazina da saúde animal de Akorn (Lake Forest, IL, EUA) e enrofloxacina da Bayer Health Care (Shawnee Mission, KS, EUA).

Experimento animal: Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela *Institutional Animal Care & Use* da Escola de Medicina de Rutgers, New-Jersey. Todos experimentos com animais foram realizados em camundongos machos C57BL / 6J de 6-8 semanas de idade (~ 25g) da *Charles River Laboratories* (Wilmington, MA). Os animais foram mantidos à temperatura ambiente de 24 °C, humidade do ar 40-70%, ciclo de 12 horas claro / escuro, com acesso livre a comida e água (ad libitum) até à experimentação. Os animais foram distribuídos aleatoriamente para garantir a mesma idade e tamanho da amostra em diferentes grupos para o tratamento experimental. Protocolo de exercício. O protocolo de natação de intensidade leve a moderada foi realizada de forma semelhante à descrita anteriormente (132, 133). Adaptamos uma piscina aquecida para camundongos de 50 cm de comprimento, 40 cm de largura e 20 cm de altura. Para evitar a flutuação durante a natação, bolhas na água foram produzidas por tubos conectados ao sistema de bomba de ar. Um sistema de aquecimento manteve a temperatura da água entre 30 e 32°C. Os Camundongos nadaram uma vez por 1 ou 2h, e descansaram por 1h antes de receberem um desafio de endotoxina. Durante o treinamento, os camundongos nadaram por 1 ou 2h todos os dias durante 1 (controle) ou 7 (treinamento) dias

antes da endotoxemia. Em seguida, foi injetado LPS em 1, 24, 48 ou 72h após o exercício, e os níveis séricos de TNF foram medidos em 1,5 h pós-LPS.

Endotoxemia A endotoxemia foi realizada como descrito anteriormente em Nat Med (134) com as modificações descritas em Nat Med (135). Resumidamente, a endotoxina (E. coli LPS 0111: B4; Sigma Chemical, St. Louis, MO) foi dissolvida em PBS estéril (Gibco®: Life Technologies, Grand Island, NY), e sonicada durante 20 minutos imediatamente antes da utilização. Os animais receberam uma dose de LD50 de LPS (10 mg / kg, i.p.).

Cirurgias. Os animais foram anestesiados com coquetel intraperitoneal de 100 mg / Kg de cetamina; 20 mg / kg de xilazina. A anestesia foi confirmada pela ausência de reflexo da retirada do pé após submetido a pinça do dedo do pé. Cirurgias ablativas foram realizadas 2 dias antes do procedimento experimental. Imediatamente após a cirurgia, todos os animais receberam antibiótico (Enrofloxacin 2,5 mg / kg, s.c.; Baytril®, Bayer Health Care™, Swanee Mission, KA) dissolvido em 0,9% de solução salina normal imediatamente após a cirurgia e a cada 12 horas durante 3 dias. A esplenectomia foi realizada conforme descrito em J Exp Med (36). Os camundongos anestesiados foram submetidos a uma incisão abdominal no epigástrico e no mesogástrico. O baço foi exposto por gentil retração do estômago para o lado. Os três ramos principais da artéria esplênica foram estabilizados com fio de nylon, ligados e cortados. O baço foi removido e a ferida foi suturada. Adrenalectomia: foi realizada conforme descrito anteriormente (136). Uma incisão dorsal da primeira à terceira vértebra lombar foi realizada em animais anestesiados. O músculo latíssimo do dorso foi dissecado e retirado de ambos os lados até os rins ficarem visíveis. A Vagotomia Cervical Cirúrgica (VGX) foi realizada conforme descrito anteriormente (36). Resumidamente, os animais foram submetidos a uma incisão ventral anterior no pescoço para acessar o músculo esternocleidomastóideo. O músculo esternocleidomastóideo foi dissecado para visualizar a artéria carótida e o nervo vago. O tronco vago cervical direito e esquerdo foram ligados com suturas de seda tamanho 4-0 e seccionado. Animais Sham foram submetidos ao mesmo procedimento, mas o nervo não foi seccionado. A vagotomia subdiafragmática (sVNX) foi realizada conforme previamente descrito em Nat Med (135). Os camundongos foram submetidos a uma incisão abdominal cobrindo o epigástrico

e o mesogástrico. O esôfago foi exposto na junção ao estômago. Posteriormente, os dois ramos vagais em ambos os lados da parte dorsal do esôfago foram expostos puxando para baixo e torcendo o estômago e estabilizado com fio de nylon. Ambos os ramos vagais foram então cortados 2 dias antes do experimento. A Neurectomia Esplênica foi realizada conforme descrito anteriormente (136). Resumidamente, incisão abdominal foi feita para explorar e isolar os vasos esplênicos. Após o isolamento dos vasos esplênicos, fibras do nervo esplênico foram observadas e seccionadas com pinças afiadas sob condições assépticas.

Análises de sangue e citocinas. As citocinas séricas e os níveis de glicose no sangue foram analisados nos momentos indicados nos gráficos. As amostras de soro foram obtidas e centrifugadas a 2.000 g durante 15 minutos em 4°C. TNF, IL6, IL10, TGF β 1 and IFN γ foram analisados nos camundongos endotoxêmicos com o respectivo kit de ELISA (Affymetrix Inc, San Diego, CA). As concentrações de TNF nos órgãos foram normalizadas para a concentração de proteína do órgão, conforme medido usando o ensaio de Bradford, conforme descrito(36). HMGB1 foi analisado utilizando o kit ELISA de detecção de HMGB1 (Chondrex Inc., Redmond, WA). As catecolaminas sanguíneas foram determinadas por ELISA (imunoensaios e serviços LDN, Alemanha) a 90 minutos pós-estimulação, como descrevemos (136, 137). A glicose foi analisada a partir do sangue da ponta da cauda do camundongo utilizando o Genstrip (PharmaTech Solutions Inc. Westlake village, CA) e o glicosímetro Onetouch UltraMini (LifeScan Inc., Milpitas, CA). Os valores de absorvência (A_{450}) foram medidos utilizando o leitor de microplacas VERSA max (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) e analisados pelo SoftMax Pro 3.9.1.

Cultura de células do Baço.

O baço dos camundongos foi coletado e as células foram suspensas, preparadas e filtradas através de um filtro de células de 70 μ m. As células esplênicas foram lavadas duas vezes antes da suspensão em meio de cultura. As células do baço foram cultivadas em placas de cultura de poliestireno de 24 poços a 1x10⁶ células/por poço com 1 ml de meio OPTIMEM I para o procedimento experimental. TNF nas células do baço foram analisados

utilizando o kit ELISA da eBioscience, (San Diego, CA), 3 horas após o desafio com LPS, utilizando um leitor de placas Versamax e o software SoftMax Pro (Molecular Devices).

Análise estatística. Todos os testes foram realizados usando o software GraphPad Prism® (GraphPad Software, La Jolla, CA). O tamanho da amostra foi determinado usando valores de desvio padrão e análises de nossos estudos anteriores sobre a estimulação do nervo vago (44, 45). Todos os dados nas figuras são expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Análises estatísticas foram realizadas usando a ANOVA unidirecional com múltiplas comparações por pares com o ajuste de Bonferroni para testes de hipóteses múltiplas. Normalidade e homogeneidade da variância foram confirmadas pela análise de Kolmogorov-Smirnov. A ANOVA foi utilizada para comparar todos os tratamentos e comparações específicas por pares, conforme indicado nas experiências. O teste t de Student (teste U de Mann-Whitney) foi usado para comparar os valores médios entre dois grupos experimentais. Análises estatísticas de sobrevivência foram determinadas usando o teste de Log-rank (Mantel-Cox). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos e representados como: # Teste t de Student, + One-way ANOVA, * Two-way ANOVA, § Teste de Log-rank de Sobrevivência.

RESULTADOS

Uma sessão de exercício físico aeróbio de intensidade moderada atenua inflamação.

Para analisar os efeitos diretos do exercício físico sobre o sistema imune, selecionamos o exercício aeróbio de intensidade leve, que minimiza o estresse fisiológico. Dado que a natação leve minimiza o estresse metabólico (138, 139), analisamos se uma única sessão de natação modula a resposta imune inata à endotoxina bacteriana. A natação por 1 ou 2h antes de receber um desafio de endotoxina induziu efeitos similares, atenuando os níveis séricos de TNF em torno de 30-40% em 1,5h pós-LPS em comparação com camundongos controle sem exercício (**Fig.1a**). Como selecionamos exercícios de intensidade leve para

evitar o estresse fisiológico, analisamos se a natação afetava a glicemia. A natação por 1h não afetou a glicemia antes do desafio séptico nem a resposta glicêmica à endotoxina bacteriana (**Fig.1b**). Quando observamos o curso temporal, observamos que o exercício atenuou os níveis séricos de TNF e não apenas atrasou sua síntese (**Fig. 1c**). Por outro lado, o exercício não afetou os níveis séricos de IL6 (**Fig.1d**). O exercício também atenuou a produção de outros fatores inflamatórios, como IFN γ e HMGB1, que são fatores "tardios" produzidos em 4-6h e 18-24h pós-LPS, respectivamente (**Fig.1e, f**). Por outro lado, a natação por 1h aumentou a produção de citocinas anti-inflamatórias, como TGF1 e IL10, por até 6h pós-LPS (**Fig.1g, h**). Esses resultados mostraram que uma única sessão de natação de intensidade leve modulou as respostas imunes inatas à endotoxina bacteriana sem afetar a glicemia em repouso ou a resposta glicêmica à endotoxina bacteriana.

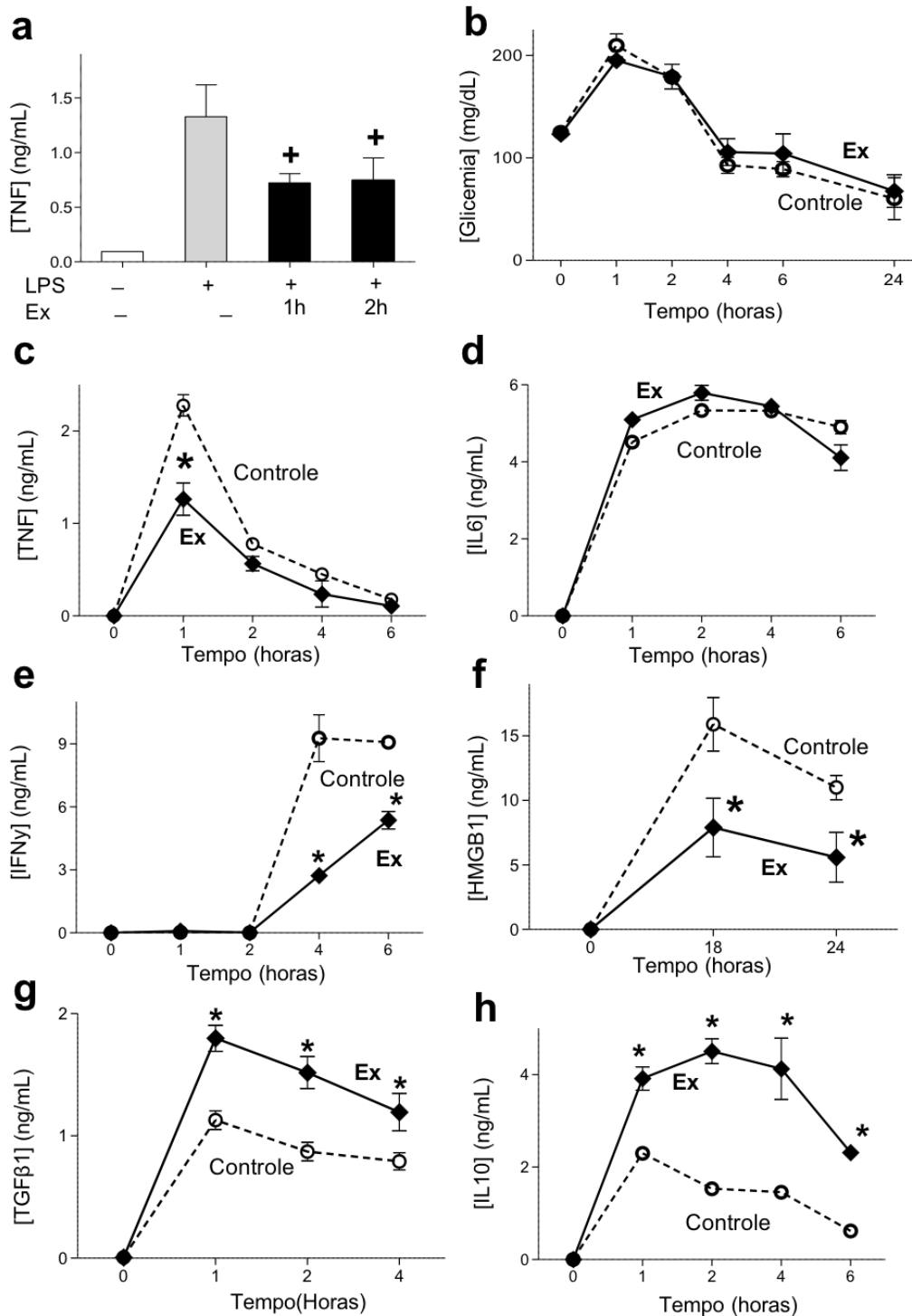


Figura 1. Uma sessão de exercício aeróbio atenua inflamação sistêmica. Camundongos C57BL / 6 (a) Controle (sem exercício) ou exercício (Ex: após nadar por 1 ou 2h) foram desafiados com LPS (LPS; i.p. 10mg / Kg) e os níveis séricos de TNF foram analisados a 1.5h pós-LPS. + $p < 0,05$ vs LPS (One-way ANOVA; $n = 4$). (b-h) Camundongos controle ou exercício (Ex) foram desafiados com LPS e níveis séricos de (b) glicose, (c) TNF, (d) IL6, (e) IFN γ , (f) HMGB1, (g) TGF β 1 e (h) IL10 foram analisados nos pontos de tempo indicados. * $p < 0,05$ vs controle, Two-way ANOVA; $n = 3$).

Exercício melhora componentes químicos do sangue e sobrevida em endotoxemia.

Em seguida, analisamos se o exercício melhora a composição química do sangue e a sobrevida dos camundongos na endotoxemia. Análises químicas do sangue mostraram que os camundongos com ou sem exercício tinham anion gap, natremia e cloremia similares (**Fig. 2a, S1a, b**). A natação por 1h não preveniu a hipocalemia precoce às 3h, mas melhorou significativamente os níveis de potássio às 24h pós-LPS (**Fig. 2b**). O exercício evitou os níveis de hipocalcemia sanguínea, cálcio ionizado e dióxido de carbono total em 3 e 24 horas pós-LPS (**Fig. 2c, d**). O exercício também preveniu a uremia em 24h pós-LPS (**Fig. 2e**). Por outro lado, os camundongos submetidos ao exercício apresentaram níveis de creatinina ligeiramente maiores, mas não estatisticamente significativos, às 24h pós-LPS (**Fig. 2f**). A proporção de nitrogênio ureico/creatinina no sangue sugeriu um efeito benéfico geral do exercício na função renal em 24h pós-LPS (**Fig.2g**). Em seguida, analisamos se o exercício pode melhorar a sobrevida na endotoxemia. Uma sessão de 1h de natação não melhorou a sobrevida na endotoxemia (**Fig.3a**). Dado que a maioria dos camundongos morreram em cerca de 2 dias após o LPS, analisamos se o exercício realizado todos os dias durante 7 dias antes da endotoxemia, poderia diminuir ainda mais a inflamação e melhorar a sobrevivência. Os camundongos nadaram durante 1 ou 2 h todos os dias durante 1 ou 7 dias antes da endotoxemia. Nadar por 1 ou 2h por dia durante 7 dias inibiu os níveis séricos de TNF em cerca de 40%, semelhante ao de uma única sessão de exercício (**Fig. 3b, c**). Em seguida, analisamos se a natação por 7 dias poderia induzir um efeito anti-inflamatório mais duradouro. Os camundongos nadaram durante 1 h por dia durante 1 ou 7 dias. Em seguida, os camundongos foram desafiados com LPS em 1, 24, 48 ou 72h após a última sessão de exercício, e os níveis séricos de TNF foram medidos às 1,5h pós-LPS. A natação por 1h atenuou a produção de TNF mesmo quando o LPS foi injetado às 24h após o exercício (**Fig. 3d**). O treinamento por 7 dias induziu um efeito mais duradouro. A natação todos os dias durante 7 dias atenuou a produção de TNF, mesmo quando o LPS foi injetado às 72h após a última sessão de exercício. Treinar por 7 dias também melhorou a sobrevivência de camundongos em endotoxemia experimental (**Fig.**

3e). A sobrevida foi registrada por duas semanas e nenhuma morte tardia foi observada, sugerindo que o treinamento melhorou a sobrevida e não apenas atrasou a mortalidade.

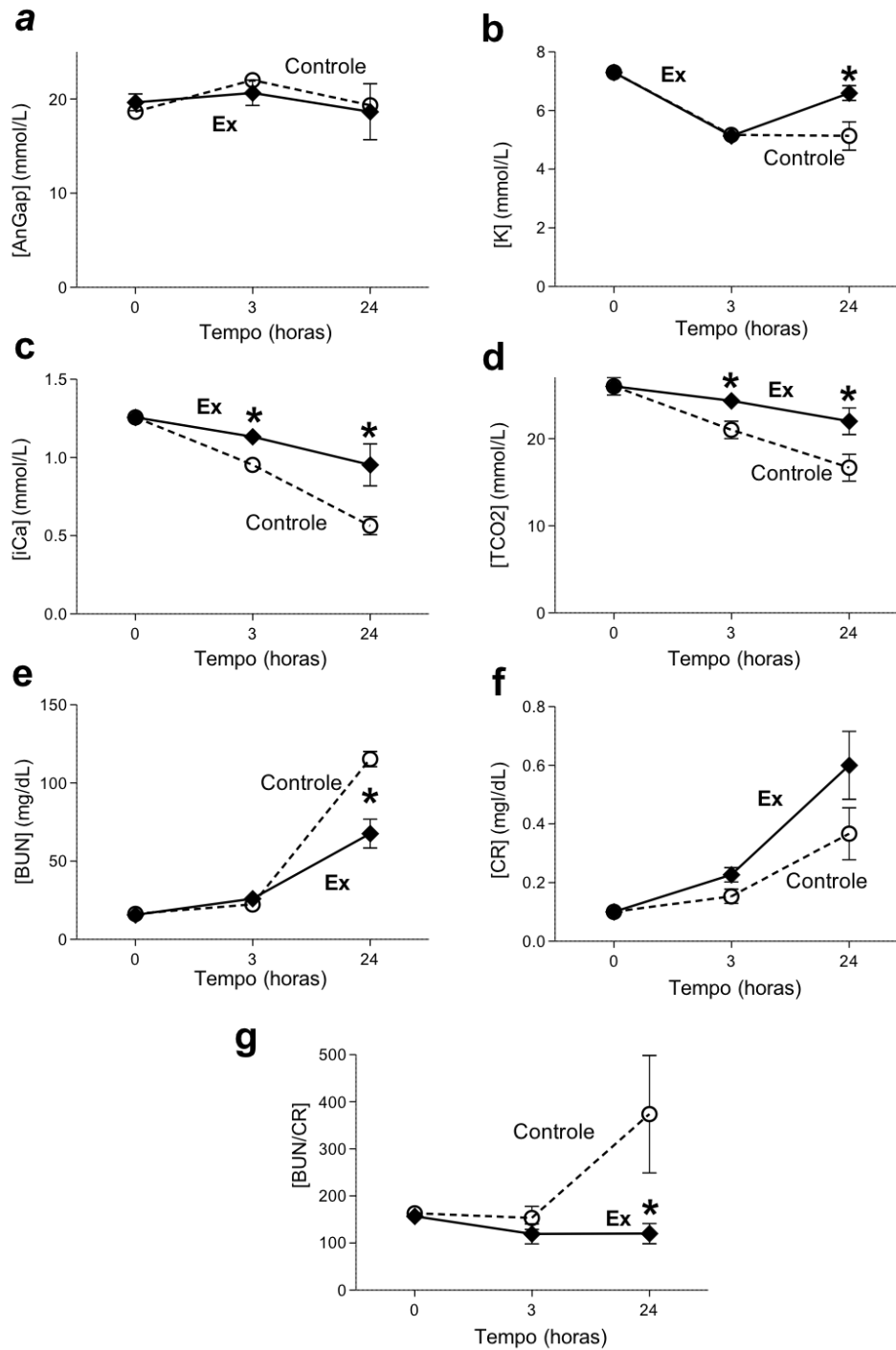


Figura 2. Exercício melhora composição química sanguínea. Camundongos C57BL / 6 controle ou exercício (Ex) foram desafiados com LPS e níveis séricos de (a) anion gap (AnGap), (b) potássio (K), (c) cálcio ionizado (iCa), (d) dióxido de carbono total (TCO₂), (e) Nitrogênio ureico (BUN), (f) creatinina (CR), ou (g) razão de azoto ureico no sangue/creatinina (BUN / CR) foram analisados a 3 ou 24 h após LPS. * $p < 0,05$ vs controle (two-way ANOVA; $n = 4$).

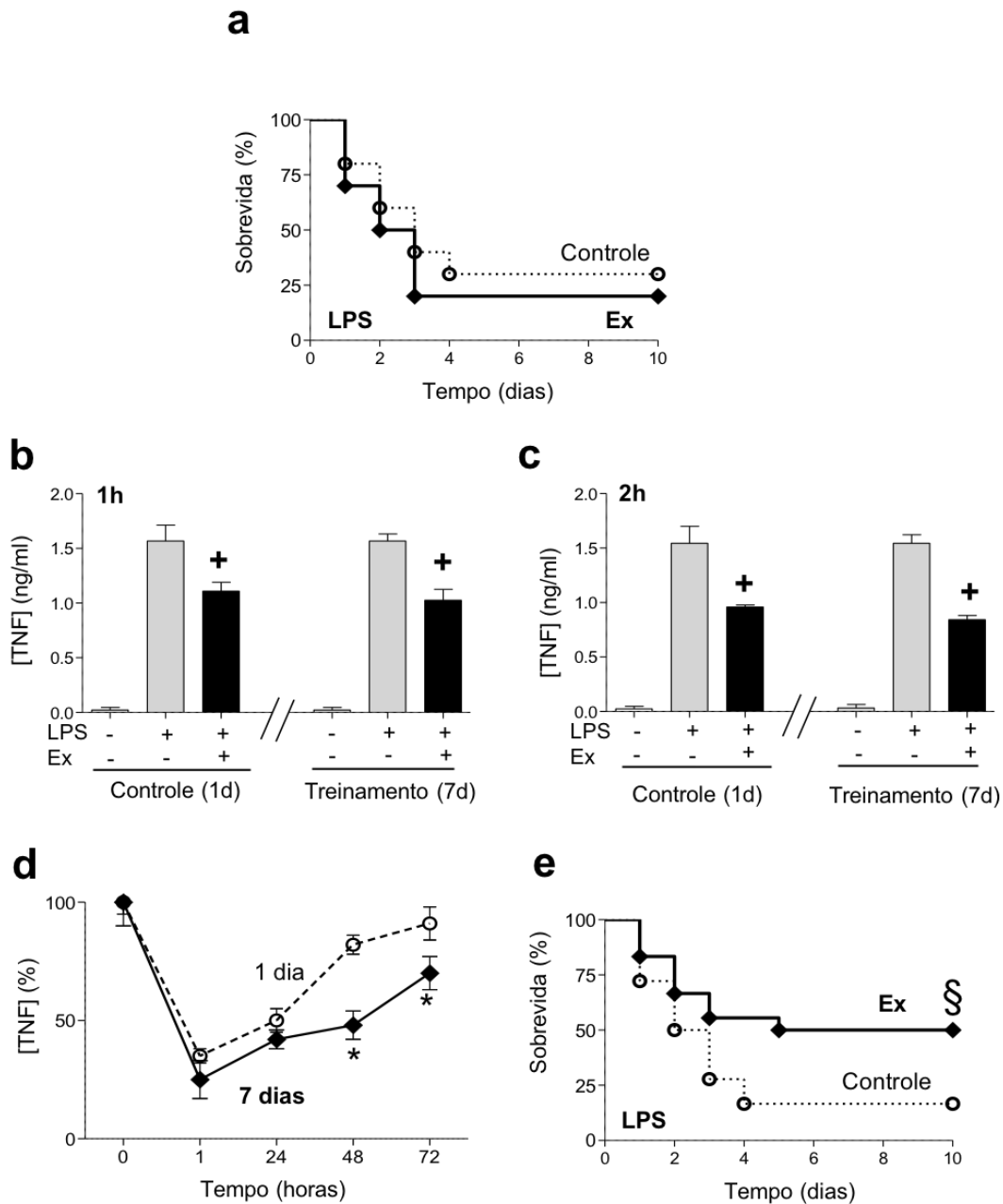


Figura 3. Treinamento físico melhorou a sobrevivência na endotoxemia. (a) Análise de sobrevivência de Kaplan-Meier de camundongos controle ou exercício (Ex: natação por 1h), desafiados com LPS (i.p. 10mg / Kg; n = 10). (b, c) Os camundongos nadaram por 1h (b) ou 2h (c) durante 1 (1d) ou 7 (7d) dias e, em seguida, desafiados com LPS, 1 hora após a última sessão de exercício. + $p < 0,05$ vs LPS (One-way ANOVA; n = 4). (d) Camundongos submetidos a natação por 1h por dia durante 1 ou 7 dias, foram desafiados com LPS em 1, 24, 48 ou 72h após a última sessão de exercício. Os níveis séricos de TNF foram medidos 1,5h pós-LPS. (* $p < 0,05$ vs controle, Two-way ANOVA; n = 4). (e) Análise de sobrevivência de Kaplan-Meier de camundongos controle (sem exercício) ou exercício. § $p < 0,05$ vs controle (teste de Survival Log-rank; n = 18).

Exercício inibe produção de TNF no baço através do nervo vago subdiafragmático.

A fim de focar nos efeitos diretos do exercício sobre a inflamação, analisamos como 1h de natação atenuou os níveis séricos de TNF. A endotoxina bacteriana induziu a produção de TNF em todos os órgãos, mas as maiores concentrações de TNF foram observadas no baço (**Fig. 4a**). Da mesma forma, camundongos submetidos ao exercício apresentaram níveis semelhantes de TNF em todos os outros órgãos, mas cerca de 40% menores de níveis de TNF esplênico do que os camundongos controle sem exercício (**Fig. 4a**). Esses resultados sugerem que o exercício atenua os níveis séricos de TNF por inibir sua produção no baço. Assim, analisamos se o baço é essencial para o potencial anti-inflamatório do exercício, realizando a esplenectomia cirúrgica. A esplenectomia impediu o efeito do exercício, no entanto, o exercício atenuou os níveis séricos de TNF em 40% em camundongos simulados, não esplenectomizados (**Fig. 4b**). Dado que o exercício pode aumentar o tônus vagal (140, 141) e que a estimulação vagal pode inibir a produção de TNF esplênico (15, 16, 36), analisamos se a neuromodulação vagal contribui para os efeitos do exercício. A vagotomia cervical direita unilateral não impediu o potencial antiinflamatório do exercício (**Fig. 3**). Em contrapartida, a vagotomia cervical bilateral impediu o controle do exercício dos níveis séricos de TNF (**Fig. 4c**). Estudamos ainda o papel do nervo vago realizando a vagotomia subdiafragmática. A vagotomia subdiafragmática total impediu o controle do exercício dos níveis séricos de TNF (**Fig. 4d**). Dado que o nervo vago pode ativar o nervo esplênico para controlar a produção de TNF no baço (5, 6, 10, 136), analisamos o papel do nervo esplênico por meio da neurectomia cirúrgica. A neurectomia do nervo esplênico não impediu o controle do exercício dos níveis séricos de TNF (**Fig. 4e**). Então, nós raciocinamos que o nervo vago pode modular a produção de TNF no baço induzindo fatores solúveis em outro órgão. Assim, isolamos cultura primária de esplenócitos de camundongos (sem exercício) e os incubamos com soro de camundongos com ou sem exercício. Em seguida, os esplenócitos foram desafiados in vitro com endotoxina e a produção de TNF foi analisada no meio de cultura condicionado. O soro de camundongos com exercício atenuou a produção de TNF em cultura primária de esplenócitos de camundongos sem exercício (**Fig. 4f**). Como

controle, também isolamos cultura primária de esplenócitos de camundongos com ou sem exercício e os desafiamos in vitro com endotoxina. A cultura primária de esplenócitos de camundongos com ou sem exercício produziu níveis semelhantes de TNF (**Fig. 4g**). Juntos, esses resultados sugeriram que o exercício atenuou a produção de TNF esplênico por meio de fatores séricos regulados pelo nervo vago subdiafragmático.

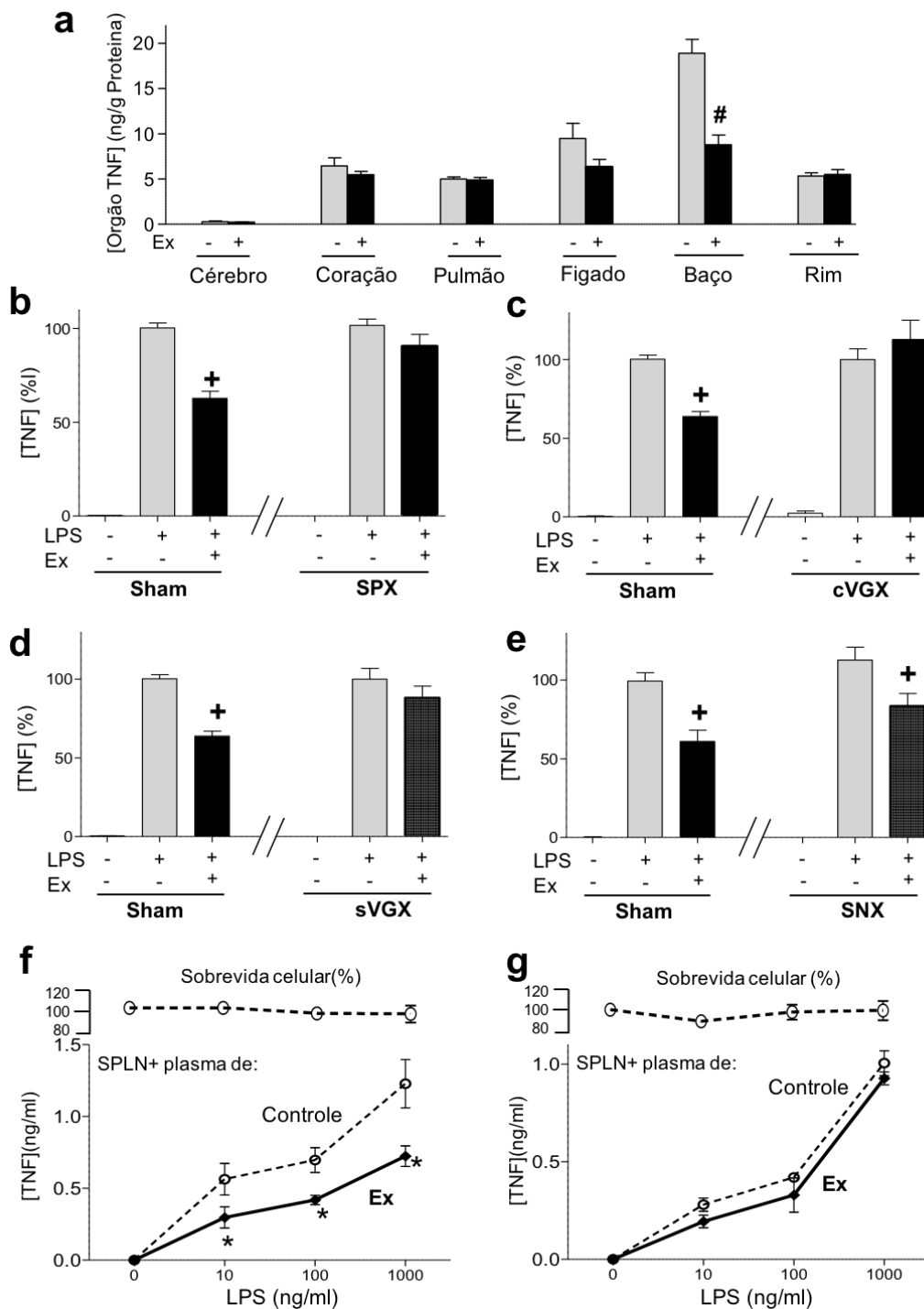


Figura 4. Exercício melhora sobrevida na endotoxemia. Camundongos C57BL / 6 (a) Controle ou exercício desafiados com LPS e as concentrações de TNF nos órgãos indicados foram analisadas 1,5 h pós-LPS. # $p < 0,05$ vs controle. (b) Esplenectomia simulada ou cirúrgica (SPX) (c) cervical bilateral (cVGX), (d) vagotomia subdiafragmática total (sVGX), (e) neurectomia cirúrgica do nervo esplênico (SNX) por dois dias antes da LPS. + $p < 0,05$ vs LPS. (f) Cultura primária de esplenócitos de camundongos virgens (sem exercício) foi incubada in vitro com soro de controle ou exercício (Ex), por 3 h antes do teste in vitro com LPS. (g) Cultura primária de esplenócitos de camundongos controle ou exercício (Ex) desafiados in vitro com LPS. Os níveis de TNF foram analisados nos meios de cultura condicionados às 3 h pós-LPS. (* $p < 0,05$ vs controle, Two-way ANOVA; $n = 4$).

Antagonista Dopaminérgico D1 previne controle de TNF plasmático através do exercício.

Dado que o nervo vago subdiafragmático inerva as glândulas supra-renais (142, 143) e que o exercício melhora a função renal, analisamos o papel do exercício por meio da adrenalectomia cirúrgica. A adrenalectomia impediu o potencial do exercício de atenuar os níveis séricos de TNF (**Fig. 5a**). De acordo com esses resultados, estudos anteriores também relataram que a estimulação vagal pode induzir a produção de dopamina nas glândulas supra-renais (142, 143). Portanto, analisamos se o exercício pode induzir a produção de dopamina. O exercício aumentou os níveis séricos de dopamina em 2 vezes por até 3 horas (**Fig. 5b**). Também observamos que a adrenalectomia impedia o potencial de exercício de aumentar os níveis séricos de dopamina (**Fig. 5c**). Estes resultados sugerem que o exercício atenua os níveis séricos de TNF na endotoxemia, através da produção de dopamina. Assim, analisamos o potencial da dopamina para inibir a produção de TNF em esplenócitos. A dopamina inibiu a produção de TNF induzida por LPS de cultura primária de esplenócitos de uma maneira dependente da concentração (**Fig. 5d**). Dado que os sinais de dopamina através de receptores dopaminérgicos D1 (D1R, D5R) ou D2-like (D2R, D3R, D4R), nós analisamos agonistas dopaminérgicos específicos incluindo fenoldopam (um agonista altamente seletivo para receptores D1-like) e pergolide (a agonista seletivo para receptores tipo D2) (144-146). O fenoldopam e o pergolide são agonistas dopaminérgicos estáveis e específicos bem caracterizados, com uma afinidade 100 vezes maior para os receptores semelhantes a D1 e D2, respectivamente (135, 145-149). O fenoldopam foi mais eficaz que a dopamina e o pergolide na inibição da produção de TNF induzida por LPS na cultura primária de esplenócitos (**Fig. 5d**). O papel dos receptores D1 dopaminérgicos no exercício também foi confirmado in vivo usando o butaclamol, um antagonista específico do receptor D1 (148, 149). A administração de butaclamol antes do exercício impediu o controle do exercício dos níveis séricos de TNF na endotoxemia (**Fig. 5e**). Como controle, a administração de butaclamol após o exercício não afetou os níveis séricos de TNF (**Fig. 5f**). Juntos, esses resultados sugerem que o exercício induz a produção de dopamina a partir das glândulas

supra-renais para inibir a produção de TNF em esplenócitos via receptores D1-dopaminérgicos.

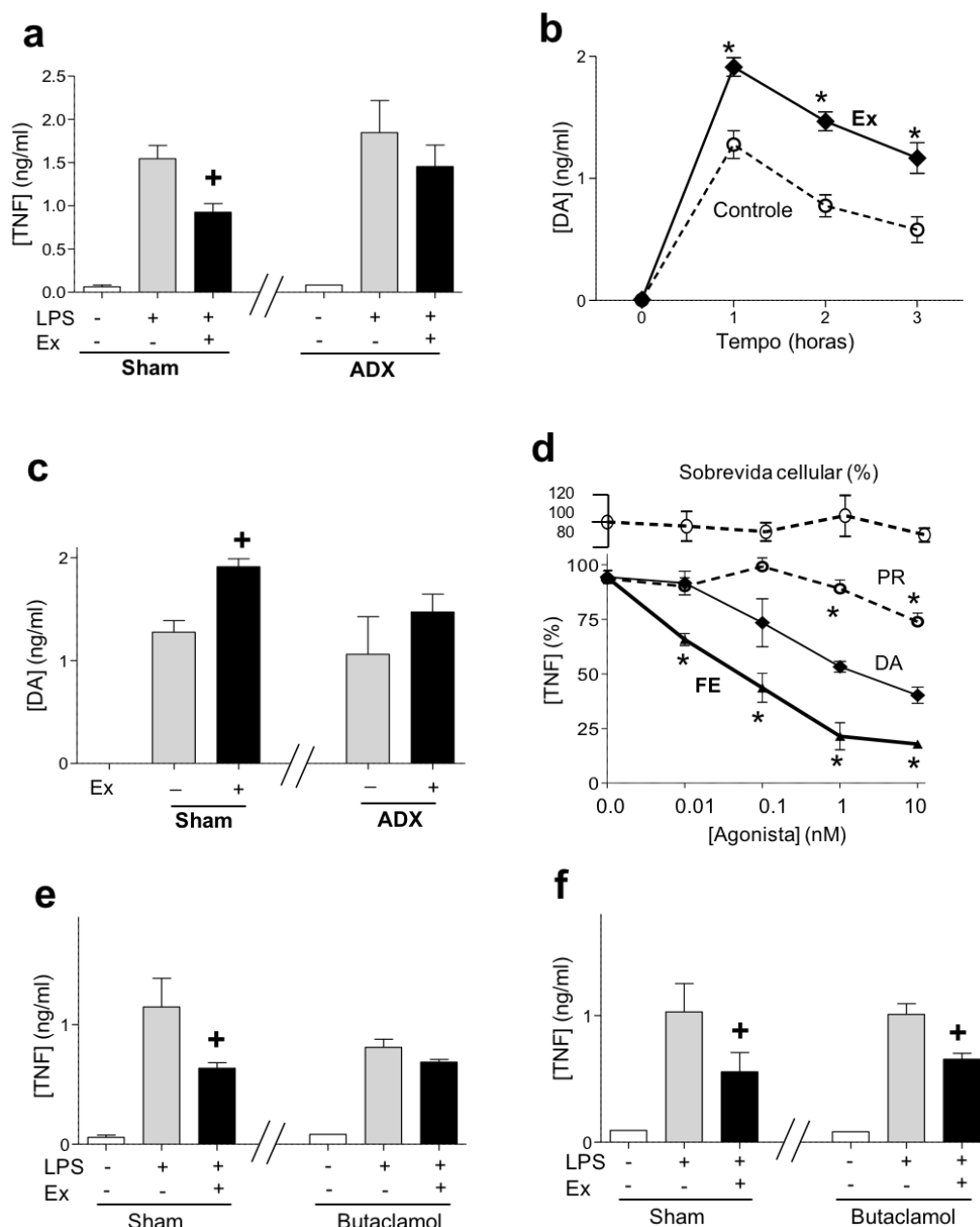


Figura 5. Antagonista dopaminérgico D1 impediu o controle do exercício sobre a produção de TNF. (a) Adrenalectomia simulada ou cirúrgica (ADX). Camundongos controle ou exercício foram desafiados com LPS e as concentrações séricas de TNF foram analisadas às 1,5 h pós-LPS. + $p < 0,05$ vs LPS (One-way ANOVA; $n = 4$). (b) Os níveis séricos de dopamina (DA) (* $p < 0,05$ vs controle, Two-way ANOVA; $n = 3$). (c) Adrenalectomia simulada ou cirúrgica (ADX) 3 dias antes do LPS. Camundongos controle ou exercício (Ex) foram desafiados com LPS e as concentrações séricas de dopamina (DA) foram analisadas 1h após o LPS. + $p < 0,05$ vs LPS (One-way ANOVA; $n = 4$). (d) Culturas primárias de esplenócitos de camundongos controle foram tratadas com dopamina (DA), fenoldopam (FE) ou pergolide (PE) durante 1 h antes do desafio com LPS. Os níveis de TNF foram analisados nos meios de cultura condicionados às 3 h pós-LPS. (* $p < 0,05$ vs controle, Two-way ANOVA; $n = 3$). (e-f) Os camundongos foram tratados com butaclamol às 2 h (e) antes ou (f) logo após o exercício. Os camundongos controle ou exercício (Ex) descansaram durante 1 h e depois foram desafiados com veículo ou LPS (i.p. 10 mg / kg; $n = 4$). As concentrações séricas de TNF foram analisadas às 1,5 h pós-LPS. + $p < 0,05$ vs LPS (One-way ANOVA; $n = 4$)

DISCUSSÃO

A maioria dos estudos prévios sobre exercício concentrou-se em exercícios de alta intensidade ou em longo prazo que causam estresse fisiológico ou mecanismos fisiológicos adaptativos, respectivamente (97-104). Para analisar os efeitos diretos do exercício sobre o sistema imunológico, selecionamos natação de intensidade leve que minimiza o estresse metabólico. Uma sessão de 1h de natação reduziu os níveis séricos de TNF sem afetar a glicemia antes ou durante a endotoxemia. Nossos resultados concordam com estudos prévios que indicam que sessões de natação de intensidade leve minimizam o estresse fisiológico (138, 139). No entanto, nossos resultados são diferentes daqueles relatados em exercícios intensos ou em treinamentos de longo prazo. O exercício intenso pode induzir a hipoglicemia e aumenta os níveis séricos de IL6, induzindo sua produção no músculo esquelético (150, 151). O treinamento de longo prazo em um programa de esteira de quatro semanas reduziu os níveis séricos de TNF e IL6 em ratos endotoxêmicos Wistar-Kyoto (152). Em contrapartida, uma única sessão de 1h de natação não afetou nem a glicemia nem os níveis séricos de IL6 em camundongos endotoxêmicos. Estudos que avaliaram o curso temporal mostraram que o exercício atenuou os níveis séricos de TNF, IFN γ e HMGB1 e não apenas retardou as respostas inflamatórias à endotoxina bacteriana. Embora a inibição "precoce" da produção de TNF possa atenuar a produção de outros fatores inflamatórios, nossos resultados sugerem que o exercício atenuou essas citocinas inflamatórias por meio de um mecanismo independente do TNF. De fato, camundongos TNF-KO endotóxicos têm o mesmo perfil de citocinas que os camundongos do tipo selvagem, com exceção da reduzida atividade do fator estimulador de colônia (153). Além disso, o exercício realmente aumentou a produção de citocinas anti-inflamatórias (TGF β 1 e IL10), mesmo após a produção de TNF. Juntos, nossos resultados indicam que o exercício aeróbico leve atenua a inflamação sem afetar a glicemia antes de induzir a produção de citocinas anti-inflamatórias.

O exercício também atenuou a produção de fatores inflamatórios "tardios", como o HMGB1. O HMGB1 é um exemplo típico de padrão molecular associado a danos (DAMP), e é secretado por macrófagos ativados e por células

danificadas ou necróticas. Assim, a inibição dos níveis séricos de HMGB1 revelou o potencial do exercício aeróbio em prevenir tanto a ativação de macrófagos quanto danos nos tecidos e órgãos. Estudos prévios sobre a função dos órgãos foram realizados somente após treinamento de longo prazo, mostrando que um programa de exercício aeróbio realizado em esteira durante quatro semanas previne lesões hepáticas e pulmonares em ratos endotoxêmicos (152). Da mesma forma, oito semanas de treinamento em esteira reduziram creatina quinase, espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico e níveis de carbonila em ratos machos Wistar submetidos ao desafio endotoxêmico (154). Nestes estudos, os animais foram submetidos a um programa de treinamento de várias semanas que induz a adaptação cardiovascular, reduzindo a frequência cardíaca basal e a pressão arterial (152, 154). Assim, não se sabe se a proteção do órgão se deve ao próprio exercício ou a essas respostas cardiovasculares adaptativas. Nosso estudo mostra que uma única sessão de natação preveniu danos aos órgãos, incluindo hipocalcemia, hipocalcemia, e melhorou a proporção de nitrogênio ureico no sangue para creatinina, sugerindo proteção aos rins. No entanto, estes efeitos não melhoraram a sobrevivência dos ratos na endotoxemia. Dado que a maioria dos animais morreu cerca de 2 dias após o LPS, nós hipotetizamos que uma única sessão de natação pode induzir uma proteção temporal, enquanto o exercício regular por vários dias pode induzir uma proteção mais duradoura. A natação por 1h atenuou a produção de TNF mesmo quando o LPS foi injetado 24 horas após o exercício. No entanto, o protocolo de natação durante 7 dias atenuou a produção de TNF mesmo quando o LPS foi injetado às 72h após a última sessão de exercício, e melhorou a sobrevivência dos camundongos na endotoxemia. Assim, uma sessão de exercício aeróbio por 1h atenuou a inflamação e a disfunção orgânica, mas mecanismos adaptativos durante o exercício regular parecem ser importantes para induzir efeitos duradouros e melhorar a sobrevivência da endotoxemia.

A fim de focar nos efeitos diretos do exercício físico sobre a inflamação, analisamos como 1h de natação atenuou os níveis séricos de TNF. Camundongos endotoxêmicos com exercício apresentaram níveis semelhantes de TNF em todos os órgãos, mas cerca de 40% menor no baço quando comparados ao grupo controle. Quando observamos os efeitos do exercício no

baço vimos que o exercício atenuou níveis séricos de TNF no grupo sham, mas não em camundongos esplenectomizados. Dado que o exercício pode aumentar o tônus vagal (140, 141) e que a estimulação vagal pode inibir a produção de TNF esplênico (15, 16, 36), analisamos se a neuromodulação vagal contribui para os efeitos do exercício. Tanto a vagotomia cervical quanto a subdiafragmática impediram o controle do exercício dos níveis séricos de TNF. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores mostrando que o exercício aumentou o tônus cardiovascular vagal (140, 141). Porém, outros estudos demonstraram que o exercício modula as funções cardiovasculares, mas não vagais (155). Assim, os efeitos do exercício na atividade vagal são controversos, dependendo do estudo e do tipo de exercício físico. No entanto, a maioria dos estudos anteriores se concentrou na regulação vagal do sistema cardiovascular.

Para nosso conhecimento, nossos resultados são a primeira evidência do papel do nervo vago no controle da inflamação pelo exercício físico. Nossos resultados corroboram com vários estudos mostrando que a estimulação vagal atenua a produção de TNF em artrite (156), isquemia / reperfusão (8, 31, 157), hemorragia / ressuscitação (31), recuperação pós-operatória (158), pancreatite (159), endotoxemia (15, 36) e sepse grave (134, 160). Além disso, nossos efeitos são independentes da regulação vagal do sistema cardiovascular, porque também foram prevenidos pela vagotomia subdiafragmática. No entanto, eles eram independentes do nervo esplênico, sugerindo que o nervo vago subdiafragmático pode modular a produção de TNF em macrófagos esplênicos pela indução de fatores solúveis em outro órgão. De fato, o soro de camundongos submetidos ao exercício atenuou a produção de TNF em cultura primária de esplenócitos de camundongos ingênuos sem exercício. Juntos, esses resultados sugeriram que o exercício inibiu a produção de TNF esplênico por meio de fatores séricos regulados pelo nervo vago subdiafragmático. Dado que estudos anteriores do nosso grupo indicaram que o nervo vago induz a produção de dopamina nas glândulas supra-renais (142, 143), analisamos se o exercício induz a produção de dopamina. O exercício aumentou os níveis séricos de dopamina e a adrenalectomia impediu o controle do exercício com relação a TNF. Estudos semelhantes recentes mostraram que o exercício leve pode

induzir a dopamina, que contribui para a via de recompensa mesolímbica durante o exercício (161-163), e aumenta a cognição pela ativação dos receptores dopaminérgicos D1 (164, 165). Adicionalmente, analisamos o potencial da dopamina e dos agonistas D1 para controlar a produção de TNF em esplenócitos. A dopamina inibiu a produção de TNF induzida por LPS de cultura primária de esplenócitos de uma maneira dependente da concentração. O agonista D1, fenoldopam, foi mais eficaz que a dopamina e o pergolide na inibição da produção de TNF em esplenócitos. O papel dos receptores D1 no exercício também foi confirmado in vivo usando butaclamol, um antagonista dopaminérgico padrão tipo 1. A administração de butaclamol impediu o efeito do exercício na produção de TNF. Juntos, esses resultados sugerem que a regulação vagal da dopamina contribui para o controle do exercício da resposta imune inata à endotoxina bacteriana. Estes resultados concordam com os nossos estudos prévios que demonstram que o agonista D1, tal fenoldopam, pode prevenir a inflamação sistêmica, disfunção orgânica e mortalidade na endotoxemia e peritonite polimicrobiana (4).

CONCLUSÃO

Nossos resultados justificam estudos futuros para determinar como diferentes tipos de exercício regulam diferentes redes neuronais e sua contribuição para os benefícios cardiovasculares, metabólicos e imunológicos induzidos pelo exercício. Estes estudos permitirão a concepção de novas abordagens para o tratamento de doenças infecciosas e inflamatórias.

3.2 ESTUDO II - CURSO TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES NEUROIMUNES INDUZIDAS PELO CONSUMO CRÔNICO DE FRUTOSE: PAPEL DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO

O consumo de frutose vem crescendo no mundo ocidental em razão dos produtos industrializados (38, 39). Neste sentido, observou-se um aumento de 40% no consumo de bebidas açucaradas derivadas do xarope de milho nos últimos 30 anos (40). Sabe-se que o aumento no consumo de frutose causa alterações cardiometabólicas tais como, resistência à insulina, hiperglicemia, níveis elevados de triglicérides, dislipidemia e obesidade abdominal (38). Estes fatores desafiam a medicina moderna por um aumento na prevalência de distúrbios cardiometabólicos, incluindo diabetes, hipertensão e síndrome metabólica (42, 166, 167). Representando uma grande preocupação social e clínica, devido o aumento de morbidade e mortalidade e a redução da qualidade e a expectativa de vida (168). Um número crescente de pesquisadores estuda os mecanismos subjacentes para projetar estratégias preventivas e terapêuticas para esses fatores de risco.

Muitos componentes da síndrome metabólica são caracterizados por um aumento na atividade do sistema nervoso simpático (66, 67). O sistema nervoso simpático vem sendo estudado há muitos anos, mas recentemente o potencial do sistema nervoso parassimpático foi descoberto (4, 5). Nosso grupo de pesquisa demonstrou que 8 semanas de alto consumo de frutose induz prejuízo no controle autonômico cardíaco, provavelmente devido uma redução do sistema autônomo parassimpático (11). Uma elegante revisão publicada na *Nature* demonstram que a resistência à insulina e níveis elevados de inflamação e de estresse oxidativo são caminhos comuns na patogênese da obesidade e doenças cardiometabólicas (14). Portanto, estes resultados demonstram um importante papel da modulação autonômica, já que o sistema nervoso autônomo modula as respostas inflamatórias, o estresse oxidativo e o sistema cardiovascular.

O treinamento físico aeróbio é responsável por adaptações estruturais e funcionais no sistema cardiovascular e no sistema nervoso autônomo (92). Desta forma, já está bem estabelecido os efeitos benéficos do exercício físico como uma abordagem não farmacológica na prevenção e tratamento da hipertensão,

da resistência à insulina, no diabetes, na dislipidemia, na obesidade e na síndrome metabólica (94-96). Estudos prévios demonstraram em animais SHR que mudanças no sistema barorreflexo e na modulação autonômica precederam as melhorias cardiovasculares e imunológicas após treinamento aeróbio (98, 116). No entanto, ainda não está claro o curso temporal desses eventos e se as alterações autonômicas, avaliadas pela sensibilidade do barorreflexo, precedem a disfunção cardiovascular e metabólica ou se são uma consequência. Portanto, no presente estudo foi avaliado o curso temporal (7, 15, 30 e 60 dias) do desenvolvimento de alterações cardiometabólicas induzidas pela sobrecarga de frutose em ratos Wistar, bem como o papel do treinamento físico aeróbio.

MATERIAIS E MÉTODOS

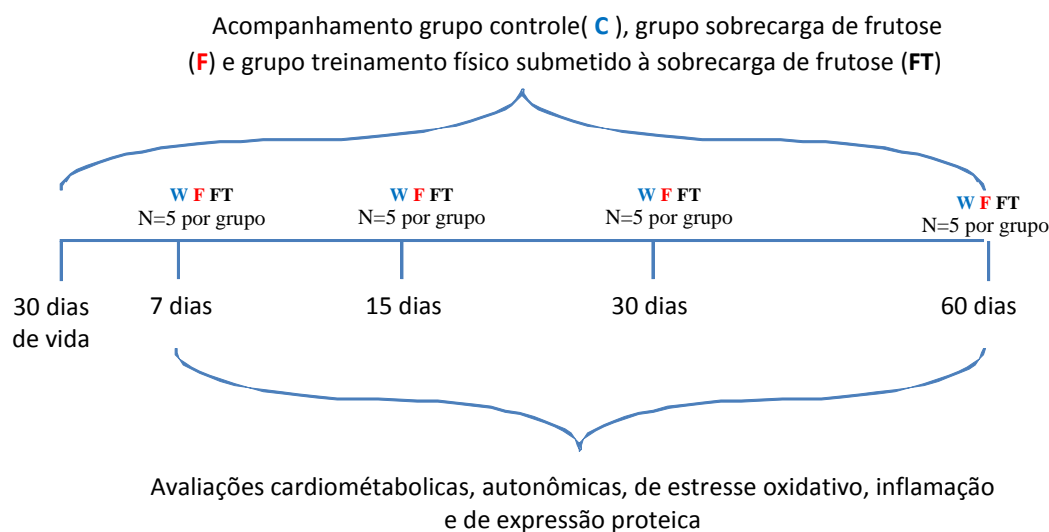
Amostra e Grupos

O presente trabalho foi submetido à aprovação do CEUA- UNINOVE (AN0011/2015). Foram utilizados para a realização dos experimentos ratos machos Wistar, pesando inicialmente entre 50-60 gramas (com aproximadamente 30 dias de vida). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada, entre 22 e 25°C, ciclo claro-escuro (12 horas) e com livre acesso a água e alimentação no Biotério da Universidade Nove de Julho.

Os animais foram divididos nos seguintes grupos*:

- ✓ Grupo I- **Wistar (C)**: acompanhados desde o desmame até 90 dias de vida;
- ✓ Grupo II- **Wistar submetido ao consumo de frutose (F)**: animais submetidos à sobrecarga de frutose a partir de 30º dia de vida até o 90º dia de vida;
- ✓ Grupo III- **Wistar submetido ao consumo de frutose e ao treinamento físico aeróbio (FT)**: animais submetidos à sobrecarga de frutose e ao treinamento físico aeróbio a partir de 30º dia de vida até o 90º dia de vida.

*** os grupos experimentais acima descritos foram divididos em subgrupos (n=5 em cada grupo) que foram avaliados após 7, 15, 30 e 60 dias de sobrecarga de frutose conforme esquema abaixo.**



PROCEDIMENTOS

Sobrecarga de Frutose

Os grupos foram submetidos a ingestão de frutose na água de beber (D-frutose, 100g/L) (11, 62). O tratamento foi iniciado após 30 dias de vida e seguiu até o final do protocolo.

Treinamento Físico Aeróbio e Teste de esforço

Com 30 dias de vida dos animais, foi iniciado o treinamento físico aeróbio. No entanto, antes de iniciar o protocolo de treinamento todos os animais foram adaptados na esteira por 4 dias durante 10 minutos na velocidade de 0,3 km/h e então foi realizado o teste de esforço inicial. A adaptação foi realizada antes de todos os testes de esforço. Após a realização do teste de esforço máximo os grupos sedentários foram colocados algumas vezes por semana na esteira para simular o ambiente do grupo treinado, porém a esteira permaneceu desligada. O teste de esforço constitui-se de um protocolo que varia a velocidade em 0,3 km/h a cada 3 minutos, até que a velocidade máxima suportada pelos animais seja atingida. Esta velocidade é determinada quando o rato não consegue mais correr ao incremento da velocidade estipulada. Este protocolo de teste de esforço apresenta correlação significativa com a medida do consumo direto de oxigênio em ratos machos (169) o que nos confere validade e fidedignidade para prescrição e controle do treinamento físico por meio desta avaliação. O teste de

esforço foi realizado em 7, 15, 30 e 60 dias de protocolo. Os ratos do grupo treinado foram expostos ao protocolo de exercício físico na esteira ergométrica 5 vezes por semana com duração de 7, 15, 30 ou 60 dias. O treino foi baseado de acordo com o resultado do teste de esforço, sendo estipulado em 40-60% da velocidade máxima alcançada no teste de esforço. O tempo de exercício físico foi aumentando progressivamente atingindo 1 hora por dia no final da 2 semana, sendo este tempo mantido até o final do protocolo (169).

Medida da Glicemia Sanguínea

Os animais foram submetidos a jejum de 4 horas e, após foi retirada uma gota de sangue da cauda para análise da glicose pelo glicosímetro (Accucheck, Roche).

Determinação das Concentrações Sanguíneas de Triglicerídeos

As concentrações sanguíneas de triglicerídeos foram determinadas após 4 horas de jejum através de uma gota de sangue obtida de um pequeno corte na cauda do animal com o uso do aparelho (Accutrend, Roche).

Canulação e Registro de Pressão Arterial

Na manhã seguinte do último dia de treinamento físico ou acompanhamento, os ratos foram anestesiados (i.p.) com cloridrato de cetamina (50mg/Kg, Ketalar a 10% ou 100mg/ml, Parke-Davis) e cloridrato de xilazina (12mg/Kg, Rompum a 2% ou 20mg/ml, Bayer) e colocados em decúbito dorsal para que se realize uma pequena incisão na região do pescoço para implantação de uma cânula na artéria carótida em direção ao ventrículo esquerdo, para registro direto da PA e na veia jugular para administração das drogas. 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 serem preenchidas com solução fisiológica e mantidas ocluídas com pinos de aço inoxidável (81, 91, 119).

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[®] Scientific, Litchfield, CT, EUA) que, por sua vez, foi conectado a um pré-amplificador (STEMTECH BPMT-2, Quintron Instrument[®] 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, 2Kz, 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 PA sistólica (PAS), PA diastólica (PAD), PA média (PAM) e FC. Os valores de FC foram derivados do sinal pulsátil da PA.

Avaliação da Sensibilidade dos Pressorreceptores

Para 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. Na sequência os animais permaneceram em condição de repouso por 15 minutos, a sensibilidade dos pressorreceptores foi testada através da infusão de fenilefrina e de nitroprussiato de sódio. Fenilefrina e nitroprussiato foram infundidos randomicamente entre os animais, iniciando-se a sessão com um ou outro fármaco. Para análise da sensibilidade dos pressorreceptores, o pico máximo ou mínimo da PAM será comparado aos valores de PAM do período controle. Da mesma forma, a variação máxima da FC será comparada com os valores de FC do período controle, imediatamente antes da injeção das drogas, para posterior quantificação das respostas. A sensibilidade barorreflexa será avaliada pelo índice calculado através da divisão da variação da FC pela variação da PAM (81, 119).

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* (FFT). 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 e alta frequência. 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 α , metodologia que analisa a correlação temporal e linear entre o intervalo RR e a variabilidade da PAS (170, 171).

Teste de Resistência à Insulina

No mesmo dia em que foram feitas as avaliações hemodinâmicas os animais foram submetidos ao jejum de 2 horas, anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg), e receberão uma injeção endovenosa de insulina (0,75 U/kg peso corporal). A glicose plasmática foi medida a partir de amostras de sangue obtidas da veia caudal utilizando-se de um glicosímetro (Accucheck, Roche) nos tempos 0, 4, 8, 12 e 16 min após a injeção de insulina. Os valores de glicemia dos minutos 4 a 16 foram usados para calcular a constante de queda da glicose plasmática (Kitt) de acordo com a descrição de Bonora et al. (1989) (172).

Eutanásia dos Animais

No dia seguinte ao término das avaliações metabólicas, os animais de todos os grupos foram submetidos à eutanásia por decapitação e os tecidos foram retirados e congelados para avaliações bioquímicas.

Estresse Oxidativo e Enzimas Antioxidantes

No presente projeto foi avaliado o estresse oxidativo cardíaco por técnicas que se baseiam na avaliação de produtos de oxidação de biomoléculas (lipoperoxidação: QL iniciada por tert butil e dano à proteína: técnica das carbonilas), pelo potencial de oxidação/redução (razão glutathiona oxidada/glutathiona reduzida e capacidade antioxidante total), e pela avaliação de

promotores (produção de espécies reativas de oxigênio: NADPH) ou inibidores (antioxidantes enzimáticos: CAT e SOD) de dano. Desta forma, buscamos através de diferentes técnicas avaliar de forma mais ampla (173) o estresse oxidativo nos grupos avaliados.

Preparação dos Tecidos- Após as avaliações citadas acima, os tecidos 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 μ L/mL de KCl adicionado. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 3000rpm, em centrífuga refrigerada entre 0 e 4°C , congelados em freezer a -70°C para futuras dosagens (174).

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 (175).

Medida de Lipoperoxidação (LPO)- Quimiluminescência iniciada por t-BOOH (QL) - O método consisti em adicionar um hidroperóxido orgânico de origem sintética (o hidroperóxido de tert-butil – t-BOOH) ao homogeneizado de tecido, para avaliar a capacidade de resposta produzida pela amostra. A quimiluminescência foi medida em um contador beta (TriCrab 2800TR, PerkinElmer) com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio. As determinações foram realizadas em câmara escura, em frascos de vidro mantidos na penumbra para evitar a fosforescência ativada pela luz fluorescente. O meio de reação no qual foi realizado o ensaio consiste em 3,5 mL de uma solução tampão de fosfatos 20 mmol/L, contendo KCl 140 mmol/L (pH 7,4), à qual foi adicionado 0,5 mL de homogeneizado. Após esse momento, foi realizada uma leitura inicial, considerada como a emissão basal de luz pelo homogeneizado. O hidroperóxido de tert-butila foi usado na concentração de 400 mmol/L, dos quais foram adicionados 30 μ L no meio de reação para obter-se uma concentração final de 3 mmol/L. Foi medida a emissão de luz e desta foi descontada a emissão basal do homogeneizado para fins de cálculo (176).

Dosagem de Carbonilas (Dano a proteínas)- O ensaio para detecção das carbonilas é uma das técnicas utilizadas para a determinação de proteínas modificadas oxidativamente (177). A técnica se baseia na reação das proteínas oxidadas do plasma sanguíneo com 2,4 dinitro fenil hidrazina (DNPH) em meio ácido, seguido de sucessivas lavagens com ácidos e solventes orgânicos e incubação final com guanidina. Desta forma, a absorvância 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 absorvância lida em 280nm no espectrofotômetro.

Razão GSH/GSSG- Para avaliação da razão redox foi utilizada aproximadamente 100 mg de tecido cardíaco. Glutaciona Oxidada: Foi adicionado à amostra de tecido ácido perclórico, a qual foi colocada em eppendorf, homogenizada e centrifugada, posteriormente foi neutralizado com bicarbonato potássico (CO₃HK). Desta extrairá uma alíquota de 60mL + 60 mL DNTB + 60 mL GSSH e 60 mL NADPH. A leitura foi realizada em espectrofotômetro 414 nm. Uma vez neutralizada com CO₃HK foi adicionado 5 ml de 2 vinil piridina e deixará repousar por uma hora a temperatura ambiente. Logo se repetirá o processo anterior. A diferença entre a primeira e a segunda leitura é a GSSG (Tietze, 1969). Glutaciona Total: A glutaciona total mede a reação de óxido redução entre GSH e GSSG. O meio de reação no qual foi realizado o ensaio consiste em uma solução de tampão fosfato 300 mM (Na₂HPO₄.1H₂O), e uma solução de DTNB (ácido ditionitrobenzóico). No momento do ensaio, foi adicionado 1 mL de tampão fosfato, 100µL de DTNB, zera-se o espectro e foi acrescentado 250 µL amostra (Beutler et al., 1963).

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

Catalase (CAT)- A taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio é diretamente proporcional à atividade da CAT. Desta forma, o consumo de H₂O₂ pode ser utilizado como uma medida de atividade da enzima CAT. O ensaio consiste em medir a diminuição da absorvância a 240nm, comprimento de onda

onde há a maior absorção pelo peróxido de hidrogênio, utilizando-se cubetas de quartzo. Para a realização das medidas foi usada uma solução tampão constituída de fosfatos a 50 mmol/L em pH 7,4. Foram adicionados 9 μ L deste tampão e 10 μ L de amostra de tecido na cubeta do espectrofotômetro, sendo esta mistura descontada contra um branco de tampão fosfato. A seguir Foram adicionados 35 μ L de peróxido de hidrogênio (0,3 mol/L) e foi monitorada a diminuição da absorbância no espectrofotômetro (178).

Superóxido Dismutase (SOD)- A técnica utilizada é 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 μ L de homogeneizado, 973 μ L de tampão Tris-Fosfato a 50 mmol/L (pH 8,2), 8 μ L de pirogalol a 24 mmol/L, 4 μ L de CAT a 30 μ mol/L. Esta curva foi obtida sendo utilizada como branco. Também foi realizado 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.

Marcadores Inflamatórios

As dosagens de interleucinas (IL6 e IL10) e TNF foram realizadas em microplacas (96 poços) sensibilizadas com o anticorpo para a proteína de interesse, aderido à parede dos poços da placa por um substrato imunoabsorvente. Foi realizado o bloqueio prévio de ligações inespecíficas e posterior incubação das amostras experimentais, contendo a proteína (antígeno) a ser dosada. Foi realizada a incubação com anticorpo ligado a enzima marcada com peroxidase, e posterior reação com cromógeno. Na mesma placa, foi realizada a curva-padrão, utilizada para o cálculo da quantidade de proteína por poço. A absorbância será medida em aparelho leitor de ELISA.

Expressão proteica de NADPH e NFκB

A expressão proteica da subunidade p47 phox da NADPH oxidase e do NF-κβ foi realizada por Western Blot. Para tal, alíquotas dos homogenatos (100μg) de tecido foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de sulfato dodecil de sódio (SDS-PAGE) (Mini-PROTEAN Tetra Cell, BioRad). Os níveis proteicos de GFP e GAPDH (normalizador) foram avaliados por *Western blot*. Foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida (SDSPAGE, 10%). Posteriormente, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*Amersham Biosciences, USA*), que sofreu bloqueio de ligações inespecíficas (solução com caseína a 5%) e posteriormente foi incubada com o anticorpo primário. A membrana foi lavada 3x10min com TBS-T, incubada por 2 horas com os respectivos anticorpos secundários, exposta a filme de PVC mediante reação de quimiluminescência (ECL), e os *blots* foram analisados no sistema ChemiDoc MP Imager e o software ImageLab segundo recomendações . GAPDH foi utilizada como proteína normalizadora.

Análise Estatística

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão. O teste de Levene foi utilizado para verificar a homogeneidade das amostras. O teste de análise de variância (ANOVA) foi devidamente aplicado para análise dos dados, seguido do post hoc de Student Newman Keuls. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

Avaliações Metabólicas

No início do protocolo (30 dias de vida), os grupos (C, F e FT) apresentaram peso corporal semelhante. Todos os grupos (C, F e FT) aumentaram peso corporal ao longo do protocolo (15 dias vs. 7 dias; 30 dias vs. 7 e 15 dias e 60 dias de protocolo vs. 7, 15 e 30 dias). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos com relação ao peso corporal (Figura 7A).

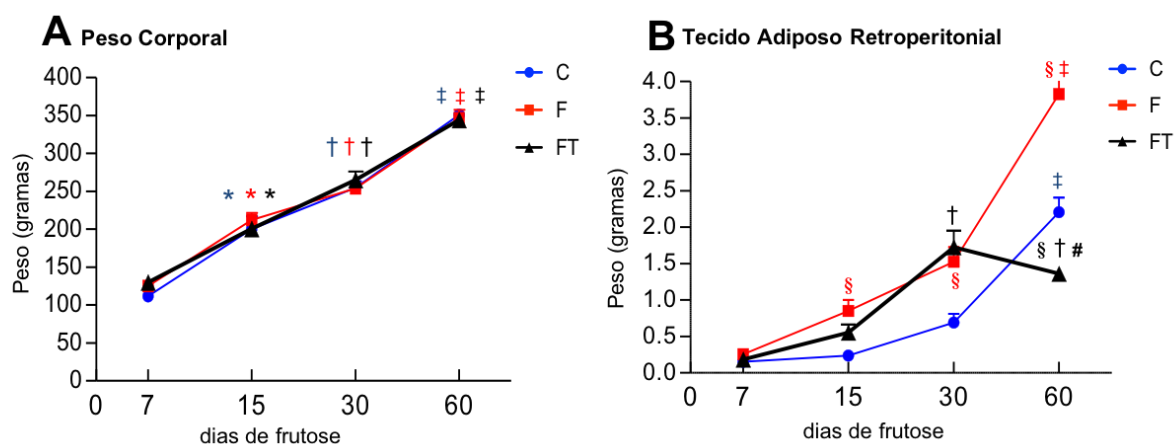


Figura 7. Peso corporal e do tecido adiposo retroperitoneal dos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbico (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias. † $p < 0,05$ vs. 7 e 15 dias no mesmo grupo; ‡ $p < 0,05$ vs. 7,15 e 30 dias no mesmo grupo; § $p < 0,05$ vs. grupo C no mesmo tempo; # $p < 0,05$ vs. grupo F no mesmo tempo.

Os grupos sedentários (C e F) apresentaram aumento de tecido adiposo branco retroperitoneal ao longo do curso temporal (15 dias vs. 7 dias; 30 dias vs. 7 e 15 dias e 60 dias de protocolo vs. 7, 15 e 30 dias). O grupo submetido ao treinamento físico e a sobrecarga de frutose apresentou um aumento do tecido adiposo branco retroperitoneal até os 30 dias de protocolo (30 dias vs. 7 e 15 dias). A sobrecarga de frutose induziu um aumento significativo de tecido adiposo branco retroperitoneal no grupo F (7, 15, 30 e 60 dias) em relação ao grupo controle. O treinamento físico combinado foi eficaz em reduzir o peso do tecido adiposo em 60 dias dos animais submetidos à sobrecarga de frutose (FT vs. C e F) (Figura 7B).

O grupo F apresentou aumento de triglicerídeos ao longo do curso temporal em 30 e 60 dias de protocolo (30 e 60 dias vs. 7 e 15 dias). De forma semelhante o grupo FT60 apresentou um aumento quando comparado aos grupos FT7 e FT15. Além disso, foi observado um aumento dos níveis séricos de triglicerídeos no grupo submetido ao consumo frutose em 30 dias em relação ao grupo controle (Figura 8A). Com relação a glicemia, o grupo submetido ao treinamento físico reduziu a glicemia em 60 dias quando comparado ao grupo FT7 (Figura 8B).

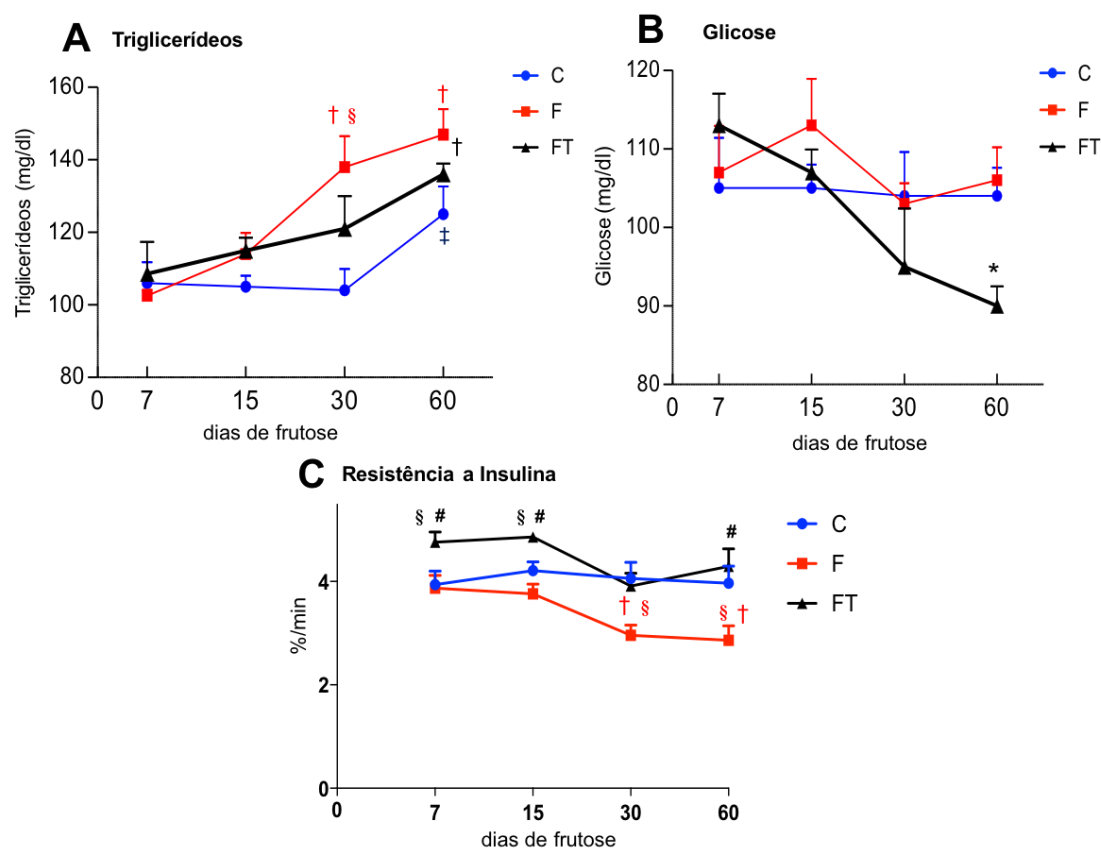


Figura 8. Triglicerídeos, glicose e constante de decaimento da glicose (Kitt) dos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbio (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias. † $p < 0,05$ vs. 7 e 15 dias no mesmo grupo; ‡ $p < 0,05$ vs. 7, 15 e 30 dias no mesmo grupo; § $p < 0,05$ vs. grupo C no mesmo tempo; # $p < 0,05$ vs. grupo F no mesmo tempo.

Com relação a resistência a insulina, o grupo submetido ao treinamento físico aeróbio apresentou um aumento em 7 e 15 dias quando comparado aos grupos C e F. Em contrapartida, o grupo submetido ao consumo crônico de frutose apresentou um prejuízo nesta variável em 30 e 60 dias quando comparados aos demais grupos (Figura 8C).

Capacidade Física

De forma esperada, o grupo submetido ao treinamento físico aeróbio apresentou um aumento de resistência aeróbia avaliada através do teste de esforço máximo. O grupo FT apresentou uma maior capacidade física em relação ao mesmo grupo nos demais tempos (7, 15 e 30 dias). Adicionalmente, os grupos submetidos ao treinamento físico aeróbio (15, 30 e 60 dias) apresentaram um aumento na capacidade física em relação aos seus respectivos controles sedentários (C e F) em 15, 30 e 60 dias (Figura 9).

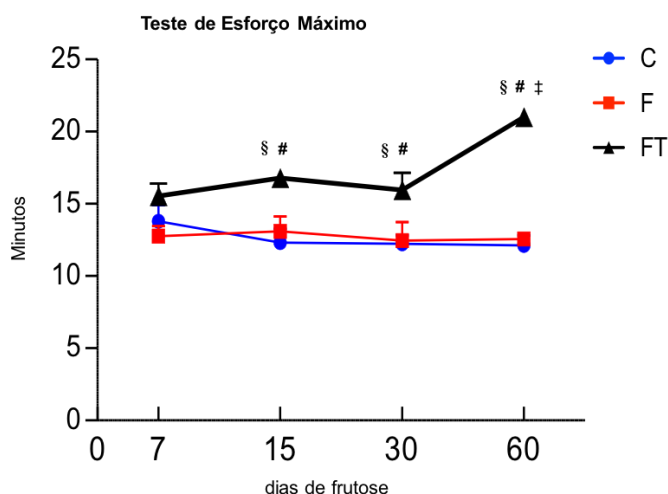


Figura 9. Tempo do teste de esforço máximo dos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbio (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias. ‡ $p < 0,05$ vs. 7, 15 e 30 dias no mesmo grupo; § $p < 0,05$ vs. grupo C no mesmo tempo; # $p < 0,05$ vs. grupo F no mesmo tempo.

Avaliações Hemodinâmicas

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos em relação a pressão arterial sistólica e frequência cardíaca (Figura 10 B-D). No entanto, todos os grupos apresentaram um aumento nos níveis pressóricos de PAD e PAM em 60 dias de protocolo quando comparados aos seus respectivos grupos em 7 dias (C60 vs. C7, F60 vs. F7 e FT60 vs. FT7) (Figura 10 A-C).

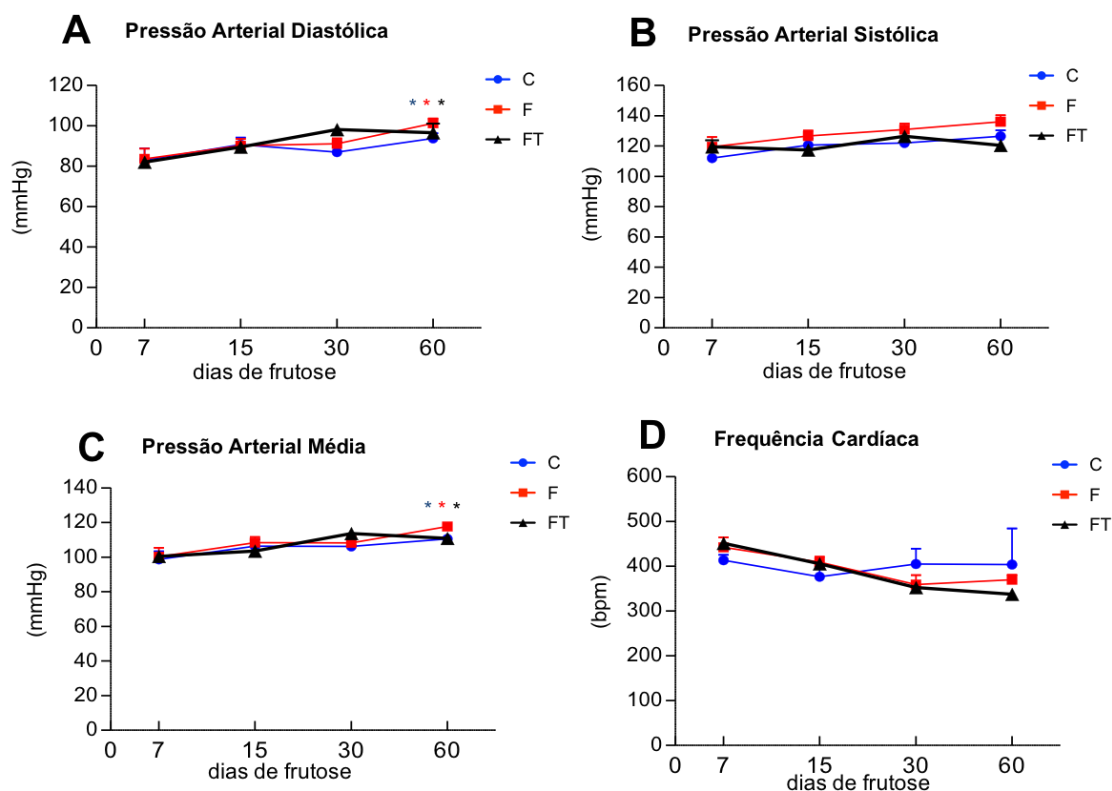


Figura 10. Pressão arterial diastólica, pressão arterial sistólica, pressão arterial média e frequência cardíaca dos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbio (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias. * $p < 0,05$ vs. 7 dias no mesmo grupo.

Avaliação da Modulação Autonômica Cardiovascular

Na variância do intervalo de pulso (VAR-IP) os grupos sedentários (C e F) apresentaram um aumento ao longo do curso temporal (C30 vs. C7 e F60 vs. F7). O grupo submetido ao treinamento físico aeróbio FT apresentou um aumento ao longo do protocolo (15 dias vs. 7 dias; 30 dias vs. 7 e 15 dias e 60 dias de protocolo vs. 7, 15 e 30 dias). O grupo F7 apresentou uma redução da VAR-IP quando comparado aos grupos C7 e FT7. Em contrapartida, o grupo submetido ao treinamento físico aeróbio aumentou de forma importante essa variável em 60 dias em relação aos demais grupos (Figura 11A). Com relação ao RMSSD houve um aumento no grupo controle em 60 dias em relação a 7 e 15 de protocolo. O treinamento físico apresentou um aumento ao longo do protocolo (15 dias vs. 7 dias; 30 dias vs. 7 e 15 dias e 60 dias de protocolo vs. 7, 15 e 30 dias). O grupo submetido ao consumo de frutose apresentou uma redução em 60 dias quando comparado ao grupo C60 e FT60 (Figura 11B).

O balanço simpato-vagal (LF/HF) estava aumentado no grupo F60 em relação a 15 e 7 dias no mesmo grupo. O grupo submetido ao consumo crônico apresentou um aumento no LF/HF em 15, 30 e 60 dias em relação aos grupos controles nos mesmos tempos (Figura 11C).

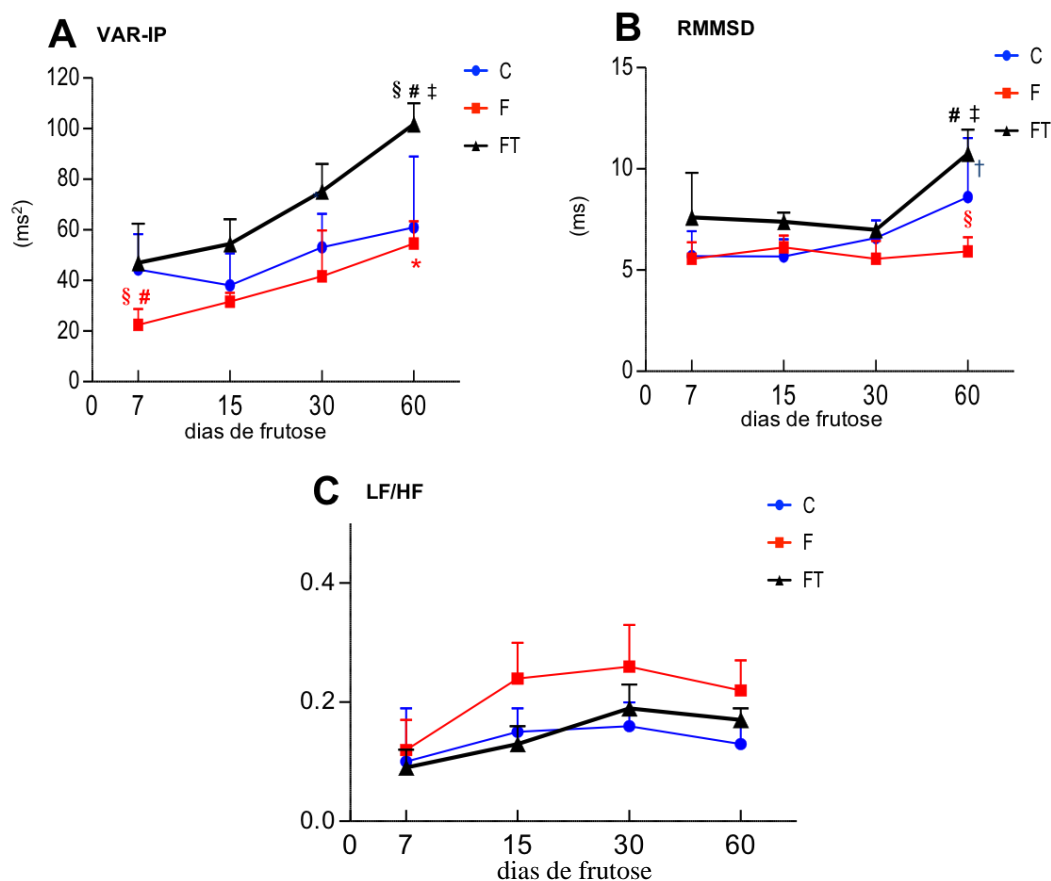


Figura 11. Variabilidade do intervalo de pulso (VAR IP), raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre os intervalos de pulso sucessivos (RMSSD) e balanço simpato-vagal (LF/HF) dos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbico (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias. † $p < 0,05$ vs. 7 e 15 dias no mesmo grupo; ‡ $p < 0,05$ vs. 7, 15 e 30 dias no mesmo grupo; § $p < 0,05$ vs. grupo C no mesmo tempo; # $p < 0,05$ vs. grupo F no mesmo tempo.

Com relação a Banda de baixa frequência da pressão arterial sistólica (BF-PAS) o grupo F30 apresentou um aumento em relação aos grupos 7 e 15 dias no mesmo grupo o que não foi observado em 60 dias. O consumo de frutose induziu um aumento desta variável em relação ao grupo controle em todos os tempos. Entretanto, o treinamento foi eficaz em prevenir esse prejuízo não apresentando diferença com relação o grupo controle e reduzindo esta variável em 7, 15, 30 e 60 dias quando comparado ao grupo frutose (Figura 12B).

A variabilidade da pressão arterial sistólica (VAR-PAS) apresentou-se elevada no grupo F30 (F30 vs. F7 e F15) e no grupo F60 (F60 vs. F7 dias). O grupo FT60 dias apresentou uma maior VAR-PAS em relação FT7 e FT15 dias. O consumo de frutose induziu um aumento da VAR-PAS em 7, 15, 30 e 60 dias com relação ao grupo controle. No entanto, foi observado uma redução desta variável no grupo treinado em relação ao grupo frutose sedentário em todos os tempos (Figura 12A).

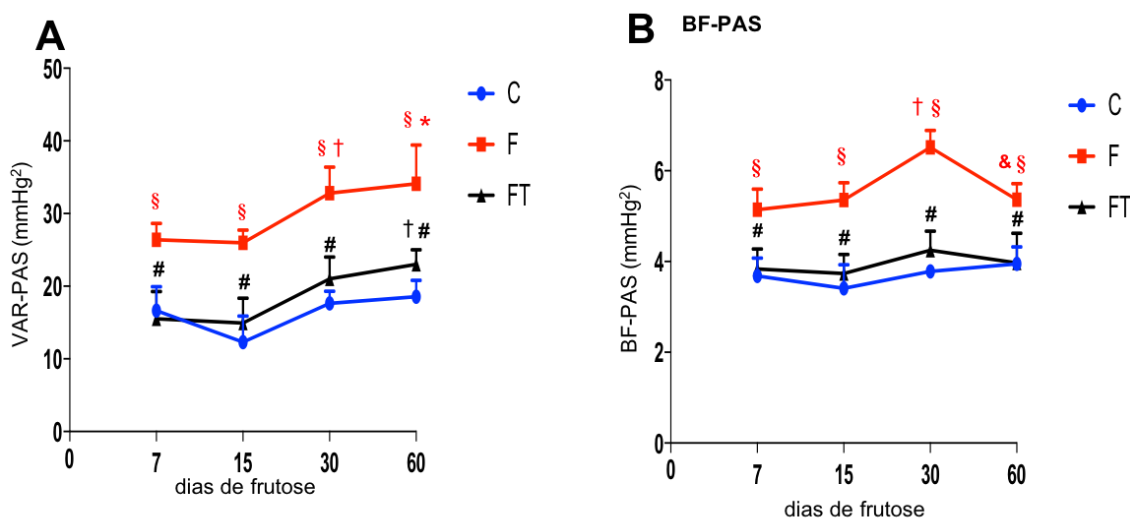


Figura 12. Banda de baixa frequência da pressão arterial sistólica (BF-PAS) e variabilidade da pressão arterial sistólica (VAR-PAS) dos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbico (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias.* $p < 0,05$ vs.7 dias no mesmo grupo; † $p < 0,05$ vs. 7 e 15 dias no mesmo grupo; § $p < 0,05$ vs. grupo C no mesmo tempo; # $p < 0,05$ vs. grupo F no mesmo tempo.

O grupo FT60 dias apresentou um aumento do índice alpha com relação ao grupo F7, 15 e 30 dias. O consumo de frutose induziu uma redução nesse parâmetro em 7,15, 30 e 60 dias quando comparado ao grupo controle nos respectivos tempos. O grupo submetido ao treinamento físico aeróbico preveniu esse prejuízo apresentando valores maiores que o grupo frutose em todos os tempos. Além disso, observamos um aumento adicional no índice alpha em 60 dias no grupo treinado quando comparado aos grupos controles (C e F) (Figura 13).

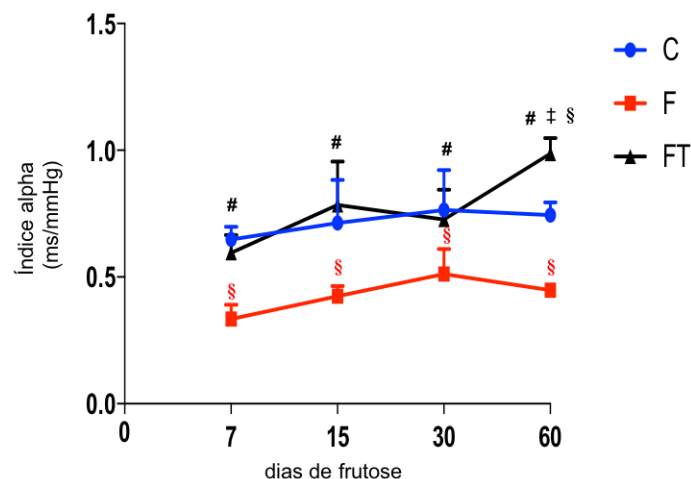


Figura 13. Índice alpha dos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbico (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias. ‡ $p < 0,05$ vs. 7, 15 e 30 dias no mesmo grupo; § $p < 0,05$ vs. grupo C no mesmo tempo; # $p < 0,05$ vs. grupo F no mesmo tempo.

Mediadores Inflamatórios

Como observado na Figura 14A, o grupo F apresentou um aumento de TNF cardíaco em 30 e 60 dias em relação a 7 e 15 dias. O grupo FT apresentou um aumento de TNF cardíaco em 30 dias e 60 dias de protocolo quando comparado 7 e 15 dias. O consumo de frutose induziu um aumento de TNF cardíaco em 30 e 60 dias quando comparado ao grupo controle e frutose treinado nos mesmos tempos.

Além disto, o grupo F apresentou valores aumentados de IL-6 ao longo do curso temporal (60 dias de protocolo vs. 7, 15 e 30 dias). Assim como o grupo FT apresentou níveis elevados de IL-6 em 30 dias quando comparado a 15 e 7 dias. Os grupos F e FT em 30 dias apresentaram níveis elevados de IL-6 cardíaco quando comparado ao grupo C30. No entanto, em 60 dias de protocolo, o grupo F apresentou níveis elevados de IL-6 cardíaco em relação ao grupo C60. Em contrapartida, o grupo FT reduziu esses valores em 60 dias quando comparado ao grupo F60 (Figura 14B).

Com relação aos níveis de IL-10 no tecido cardíaco os grupos F e FT apresentaram um aumento ao longo do curso temporal (60 dias de protocolo vs. 7, 15 e 30 dias). O grupo FT apresentou um aumento em 30 e 60 dias quando comparado aos grupos controle (C e F) nos mesmos tempos (Figura 14C).

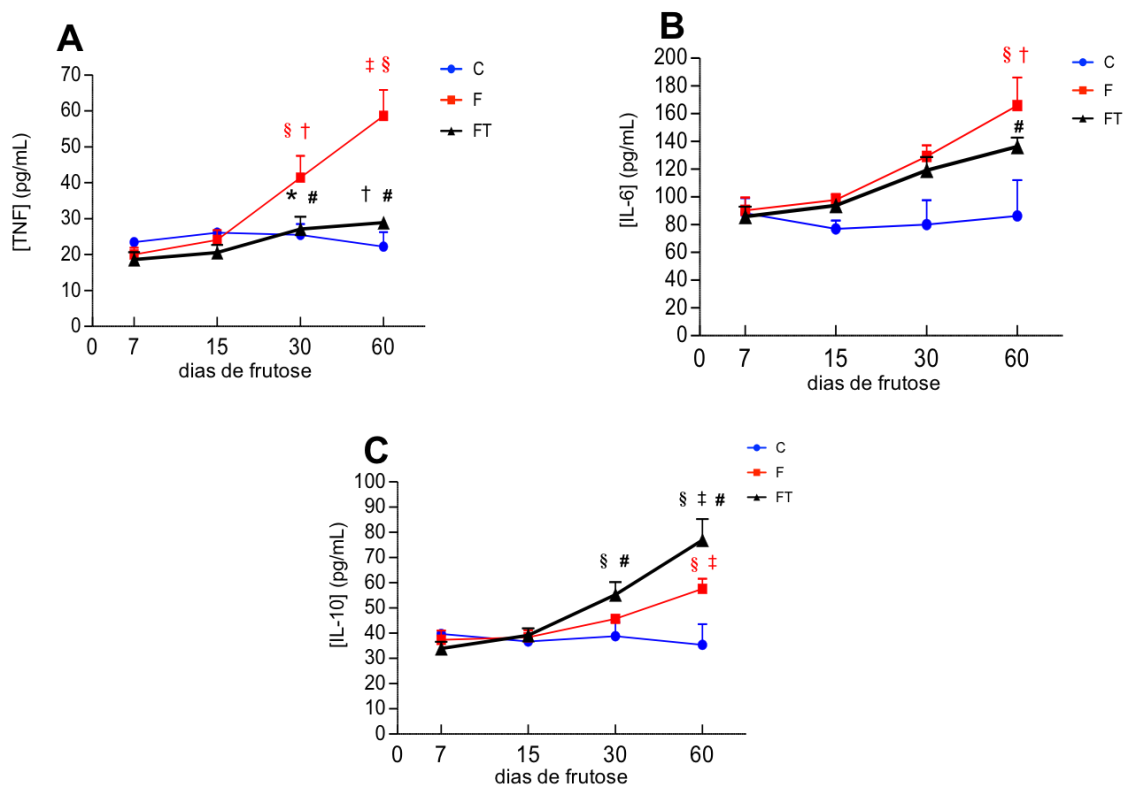


Figura 14. Tumor necrosis fator alpha (TNF), interleucina 6 (IL6) e interleucina 10 (IL10) dos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbio (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias. * $p < 0,05$ vs 7; † $p < 0,05$ vs. 7 e 15 dias no mesmo grupo; ‡ $p < 0,05$ vs. 7, 15 e 30 dias no mesmo grupo; § $p < 0,05$ vs. grupo C no mesmo tempo; # $p < 0,05$ vs. grupo F no mesmo tempo.

Estresse Oxidativo e Enzimas Antioxidantes

Com relação as enzimas antioxidantes, foi observado um aumento de catalase no grupo FT60 em relação a 7, 15 e 30 dias. O grupo FT7 apresentou um aumento de catalase com relação ao grupo F7. Adicionalmente, o grupo treinado foi eficaz em aumentar os valores de catalase em 15, 30 e 60 dias quando comparado aos grupos controles (C e F) (FT15 vs. C15, FT30 vs. C30 e FT60 vs. C60 e F60). A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no coração foi maior no grupo FT60 em relação a 7, 15 e 30 dias. O grupo submetido ao consumo de frutose apresentou valores menores de atividade da

SOD quando comparado aos grupos C em todos os tempos. Em contrapartida, o grupo FT não apresentou esse prejuízo (Figura 15A-B).

Houve aumento da lipoperoxidação no grupo F30 e F60 dias quando comparado a 7 e 15 dias de protocolo. O grupo FT60 dias reduziu lipoperoxidação em relação a 7, 15 e 30 dias de protocolo. Adicionalmente, foi observado uma redução desta variável nos grupos FT30 e FT60 quando comparados a F30 e F60. Na oxidação de proteínas, os grupos frutose em 15, 30 e 60 dias apresentaram uma redução quando comparado ao grupo F7. Além disso, o grupo submetido ao consumo de frutose apresentou níveis maiores de oxidação de proteína em todos os tempos quando comparados ao grupo controle e frutose treinado (Figura 15 C-D).

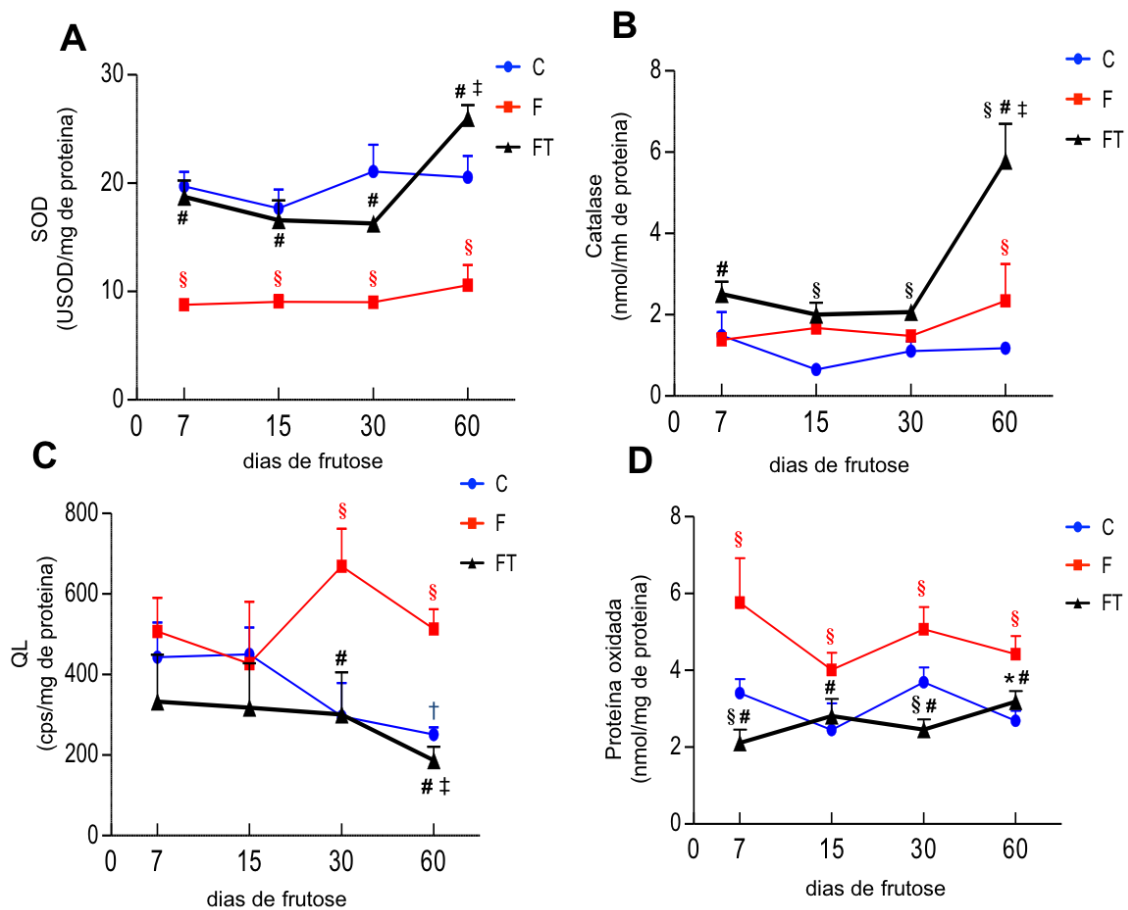


Figura 15. Lipoperoxidação (QL), proteínas oxidadas, catalase e superóxido dismutase (SOD) no tecido cardíaco dos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbio (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias. * $p < 0,05$ vs 7; † $p < 0,05$ vs. 7 e 15 dias no mesmo grupo; ‡ $p < 0,05$ vs. 7, 15 e 30 dias no mesmo grupo; § $p < 0,05$ vs. grupo C no mesmo tempo; # $p < 0,05$ vs. grupo F no mesmo tempo.

O grupo FT60 dias apresentou um aumento da razão GSH/GSSG com relação aos grupos F7,15 e 30 dias. O consumo de frutose induziu uma redução nesse parâmetro em 7, 15, 30 e 60 dias quando comparado ao grupo controle nos respectivos tempos. O grupo FT7 e FT15 dias apresentaram também uma redução da razão GSH/GSSG quando comparado ao grupo controle. No entanto, observamos que o treinamento foi eficaz em induzir um aumento dessa variável em 7, 15 e 30 dias quando comparado ao grupo frutose. O grupo FT60 apresentou um aumento adicional, apresentando valores maiores em relação ao grupo frutose e controle de 60 dias (Figura 16).

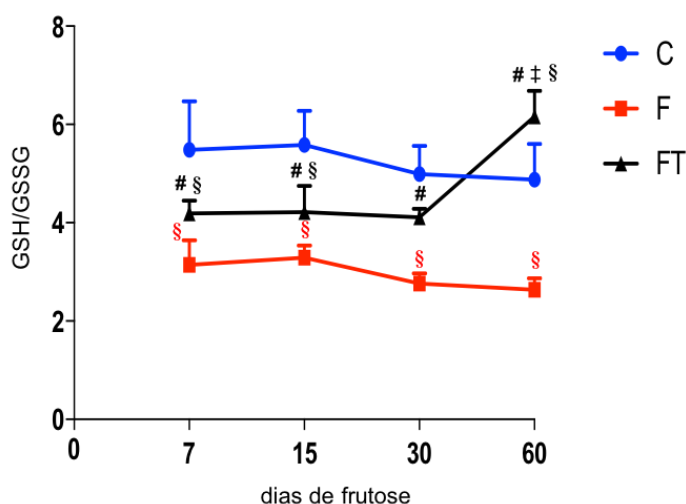


Figura 16. Razão GSH/GSSG dos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbico (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias. ‡ p< 0,05 vs. 7,15 e 30 dias no mesmo grupo; § p< 0,05 vs. grupo C no mesmo tempo; # p< 0,05 vs. grupo F no mesmo tempo.

Expressão Proteica de NADPH oxidase e NF- κ B

Com relação a expressão da subunidade p47 phox da NADPH oxidase no tecido cardíaco, houve uma diminuição em 30 dias no grupo C em relação a 15 dias no mesmo grupo. O grupo F apresentou maiores valores em 30 dias em relação aos tempos de 7 e 15 dias, o que aconteceu em 60 dias somente em relação ao tempo de 15 dias no mesmo grupo. O grupo F também aumentou a expressão proteica de p47 phox em 30 e 60 dias em relação ao grupo C. Além

disso, o grupo FT reduziu essa expressão nos tempos 30 e 60 dias em relação ao grupo F (Figura 17).

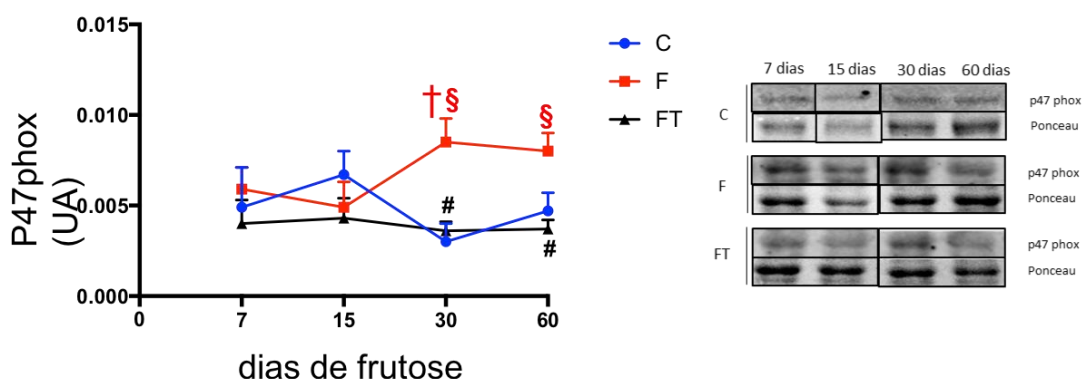


Figura 17. Subunidade p47 phox da NADPH oxidase no tecido cardíaco dos grupos Controle (C), Frutose (F) e Frutose+treinamento físico aeróbico (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias. Quantificação (A) e Western Blotting (B). † $p < 0,05$ vs. 7 e 15 dias no mesmo grupo □ $p < 0,05$ vs. 15 dias no mesmo grupo; § $p < 0,05$ vs. grupo C no mesmo tempo; # $p < 0,05$ vs. grupo F no mesmo tempo.

Com relação a expressão NF- κ B no tecido cardíaco, houve um aumento em 7, 15, 30 e 60 dias no grupo F em relação ao grupo FT. Observamos também um aumento de NK- κ B em 30 e 60 dias no grupo F quando comparado ao grupo C. O grupo FT apresentou-se reduzido em 7, 15, 30 e 60 dias quando comparado aos demais grupos. (Figura 18).

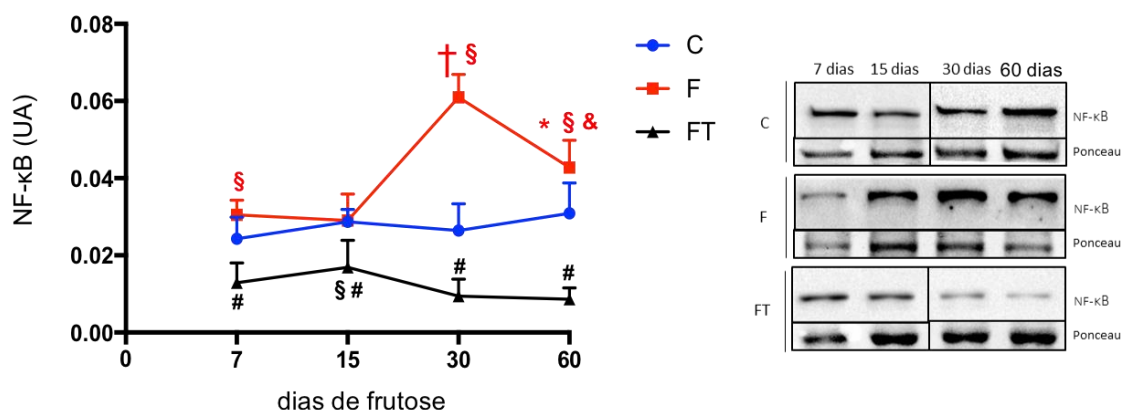


Figura 18. NF- κ B no tecido cardíaco dos grupos Controle (C), Frutose (F) e Frutose+treinamento físico aeróbico (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias. Quantificação (A) e Western Blotting (B). * $p < 0,05$ vs. 7 dias no mesmo grupo; † $p < 0,05$ vs. 7 e 15 dias no mesmo grupo; & $p < 0,05$ vs. 30 dias no mesmo grupo § $p < 0,05$ vs. grupo C no mesmo tempo; # $p < 0,05$ vs. grupo F no mesmo tempo.

DISCUSSÃO

A crescente prevalência da síndrome metabólica requer pesquisas para desenhar estratégias preventivas ou terapêuticas. Dado que estudos demonstram o potencial do sistema nervoso em inibir a inflamação (9) e o estresse oxidativo, supomos que alterações no sistema nervoso autônomo precederiam disfunções metabólicas e hemodinâmicas. Relatamos recentemente em um modelo de ratos SHR que alterações no sistema barorreflexo precederam melhoras cardiovasculares (redução da pressão arterial e bradicardia) após treinamento físico aeróbio (116). No entanto, os animais SHR já apresentam hiperatividade simpática desde o desmame. Ficando a dúvida, se as alterações autonômicas que precederam alterações metabólicas são decorrentes do consumo crônico de frutose ou dependente do modelo experimental de ratos SHR. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o curso temporal das alterações neuroimunes induzidas pelo consumo crônico de frutose bem como o papel do treinamento físico aeróbio na prevenção de complicações cardiometabólicas, na modulação autonômica cardiovascular, de inflamação e de estresse oxidativo em ratos Wistar.

Nossos resultados evidenciam dois importantes achados. Primeiro, demonstramos que com apenas 7 dias de consumo de frutose houve prejuízo na sensibilidade insulínica, no controle autonômico cardíaco (redução da variabilidade do intervalo de pulso e do barorreflexo espontâneo) e vascular (aumento da BF-PAS e da VAR-PAS). Além disso, observamos um prejuízo do perfil oxidativo caracterizado por uma redução da enzima SOD e da razão GSH/GSSG bem como um aumento de proteínas oxidadas. Adicionalmente, foi observado que 7 dias de consumo de frutose foi o suficiente para aumentar a expressão do fator de transcrição nuclear NF- κ B. Essas disfunções foram seguidas por redução do índice RMSSD e um aumento do balanço simpato-vagal, aumento de IL-6 e TNF- α (citocinas pro-inflamatórias) no coração, bem como uma redução de IL-10 (citocina anti-inflamatória). Fatores estes que podem estar associados ao aumento de lesão à proteínas e lipídeos nesse tecido, que provavelmente se associam ao aparecimento das disfunções

metabólicas, hemodinâmicas e de capacidade funcional a partir de 30 dias de protocolo nos animais submetidos ao consumo de frutose. Segundo, e mais importante, o treinamento físico aeróbio preveniu o desenvolvimento da disfunção autonômica neste modelo, o que provavelmente promoveu alterações neuroimunes e de perfil de estresse oxidativo favoráveis, culminado em marcante atenuação das disfunções cardiometabólicas em Wistar submetidos ao consumo de frutose.

Alterações metabólicas em conjunto podem favorecer uma diminuição na capacidade física de exercício, que possui alta relação com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Não observamos prejuízo na capacidade física dos animais submetidos ao consumo de frutose. Corroborando com Farah et al. (2016) que não mostraram alteração na atividade motora realizada em camundongos adultos submetidos à sobrecarga de frutose. Em contrapartida, está muito bem estabelecido que o treinamento físico aeróbio aumenta a capacidade física (64, 179, 180). Na literatura, a melhora da capacidade física é vista como um marcador da eficiência do protocolo de treinamento físico; essa melhora tem sido amplamente relatada após o treinamento em ratos controle, diabéticos, velhos e hipertensos (180-182). No presente estudo, não foi observado prejuízo na capacidade física dos animais submetidos ao consumo de frutose, porém, de forma esperada os animais submetidos ao treinamento físico aeróbio apresentaram um aumento na sua capacidade física, avaliada pelo teste de esforço máximo. Assim, novos estudos devem ser realizados para elucidar os mecanismos subjacentes a essa adaptação induzida pelo consumo de frutose durante o desenvolvimento infantil.

Com relação aos parâmetros hemodinâmicos e a frequência cardíaca não houve diferenças entre os grupos estudados. Contudo, todos os grupos apresentaram pressão arterial diastólica e média mais elevada aos 60 dias de protocolo em relação a 7 dias de protocolo. Redes neurais como sistema nervoso autonômico apresentam mecanismos eficientes selecionados pela evolução para controlar a homeostase. Neste sentido, a variabilidade da frequência cardíaca vem sendo utilizada como uma ferramenta importante para se obter índices da modulação do sistema nervoso simpático e parassimpático bem como dos barorreceptores (183). Vale lembrar que o barorreflexo um importante controlador de PA momento a momento é constituído por mecanorreceptores

sensíveis às deformações da parede vascular(184). Além do controle reflexo, o barorreflexo também desempenha o controle tônico sobre a atividade simpática (inibição) e parassimpática (estimulação). Portanto, a modulação inadequada da atividade simpática e parassimpática pela disfunção do barorreflexo, pode gerar disfunções no controle da função cardiovascular (185).

A variabilidade da frequência cardíaca é uma importante ferramenta para avaliar indicativos da modulação autonômica cardiovascular tanto em animais como humanos. No presente estudo, foi observado um prejuízo na modulação autonômica em 7 dias de frutose caracterizado por uma redução da VAR-IP bem como um aumento da VAR-PAS e do simpático vascular (que se manteve até 60 dias). Adicionalmente, com 15 dias de sobrecarga de frutose os animais apresentaram um aumento no balanço simpato-vagal que se manteve até 60 dias de vida, bem como, uma redução do índice RMSSD um representativo da modulação parassimpática em 60 dias. Corroborando com estudos prévios que demonstraram um prejuízo na modulação autonômica como aumento do balanço simpato-vagal e redução do índice RMSSD após sobrecarga de frutose em ratos Wistar e SHR (Moraes e Bernardes). Desta forma, estes dados sugerem que o consumo crônico de frutose parece ter realmente um papel negativo no controle autonômico cardiovascular.

Em contrapartida, diversos estudos vêm demonstrando o papel benéfico do treinamento físico aeróbio na modulação autonômica cardíaca em diferentes modelos experimentais (116, 179, 186). No presente estudo, nós observamos que o treinamento físico aeróbio preveniu o desenvolvimento da disfunção autonômica neste modelo experimental. Caracterizados por um aumento da VAR-IP e do índice RMSSD em 60 dias, redução do balanço simpato-vagal, VAR-PAS bem como do simpático vascular desde os 7 dias de vida. De forma semelhante, o grupo submetido ao treinamento físico aeróbio apresentou maior índice alpha, indicativo da melhora da sensibilidade barorreflexa. Corroborando com resultados prévios do nosso grupo, no qual, treinamento físico aeróbio realizado durante 10 semanas foi eficaz em prevenir os prejuízos na modulação autonômica bem como melhorar sensibilidade barorreflexa após consumo crônico de frutose (115). Adicionalmente, foi observado em ratos SHR com privação dos hormônios ovarianos, que tanto o treinamento físico aeróbio quanto resistido melhorou a sensibilidade barorreflexa tanto para respostas

bradicárdicas ou taquicárdicas, contudo somente o treinamento aeróbio foi eficaz em melhorar o índice alfa (179).

A regulação do sistema imune inato é essencial para a sobrevivência e a evolução selecionou múltiplos mecanismos fisiológicos para controlar a inflamação. Entre eles, o sistema nervoso central desempenha um papel crítico na coordenação da homeostase fisiológica e no controle da inflamação. Sendo assim, fomos avaliar o perfil inflamatório destes animais após consumo crônico de frutose, haja visto, a disfunção autonômica observada no grupo submetido ao consumo de frutose e a relação do sistema nervoso central com inflamação. No presente estudo, observamos um aumento dos níveis cardíacos de TNF e IL6 em 30 e 60 dias. O que pode ser parcialmente explicada pela redução de IL10 no grupo submetido ao consumo crônico de frutose em 60 dias. Conti et al. (2014) também observaram aumento TNF em ratas SHR com privação de hormônios ovarianos, que consumiram frutose quando comparadas ao grupo controle. O treinamento físico aeróbio por sua vez preveniu o aumento de TNF e IL6, devido principalmente ao aumento da IL10 e também a melhora da modulação autonômica cardiovascular. Shimojo et al. (2015) (186) demonstraram que o treinamento físico combinado de 8 semanas aumenta o tônus vagal em modelo experimental. Portanto, podemos assim especular, que assim como a estimulação do nervo vago reduz inflamação, o exercício físico aumenta tônus vagal e por consequência reduz inflamação.

Sabe-se que há uma direta ligação entre inflamação e estresse oxidativo. De fato, o consumo excessivo de frutose causa disfunções metabólicas, pela inflamação e estresse oxidativo, que estão relacionados com o risco cardiovascular (187). No presente estudo observamos que o consumo de frutose também induziu aumento de lesão a lipídeos e proteínas (QL e Carbonilas), bem como reduziu a atividade da enzima SOD e apresentou um balanço redox prejudicado. De fato, modelos experimentais com sobrecarga de frutose têm demonstrado aumento de estresse oxidativo (64, 188). Em contrapartida, o treinamento físico aeróbio foi eficaz em melhorar esses prejuízos, além de melhorar o balanço redox em 60 dias quando comparado ao grupo controle, uma importante análise que demonstra a melhor relação entre pró e antioxidantes. A glutathiona (GSH) está entre os antioxidantes mais importantes nas células, um importante indicador utilizado para se avaliar o estado redox é a razão de

GSH/GSSG. No entanto, o consumo contínuo de frutose em camundongos induziu estresse oxidativo, devido principalmente a redução da razão GSH/GSSG (189). Em concordância com esses resultados, nos observamos uma redução da razão GSH/GSSG desde os 7 dias de protocolo que se manteve reduzido ao longo do curso temporal. Em contrapartida, o grupo submetido ao treinamento físico aeróbio preveniu este prejuízo. Portanto, essa maior capacidade antioxidante no grupo submetido ao treinamento aeróbio está provavelmente relacionada com uma melhora acentuada no balanço redox da glutathiona no coração. Assim, com base nestes resultados, o treinamento físico induz um melhor equilíbrio redox em ratos submetidos ao consumo crônico de frutose, associado à redução adicional nos níveis de dano lipídico e protéico, provavelmente levando à prevenção de disfunções cardíacas e autonômicas.

Tendo em vista o aumento de inflamação e estresse oxidativo após consumo crônico de frutose, nós avaliamos a expressão proteica da subunidade p47 phox da NADPH oxidase e o fator de transcrição nuclear NF- κ B. No presente estudo foi observado um aumento da subunidade p47 phox da NADPH oxidase no tecido cardíaco em 30 e 60 dias, o que não foi observado após treinamento físico aeróbio. Com relação a expressão do NF- κ B 7 dias de frutose foi o suficiente para aumentar a expressão deste fator de transcrição que se manteve elevado em 30 e 60 dias. Em contrapartida, o treinamento físico aeróbio foi eficaz de reduzir esse prejuízo associado a inflamação e estresse oxidativo, desde os 7 dias de protocolo.

O peso corporal apresentou um aumento ao longo do protocolo em todos os grupos estudados. Apesar do grupo F não demonstrar aumento de peso adicional ao longo do curso temporal, como observado previamente em ratos Wistar (190) e em camundongos (191) o grupo submetido ao consumo crônico de frutose apresentou um aumento de tecido adiposo retroperitoneal. Corroborando com estudos prévios, no qual o consumo crônico de frutose induz a um aumento no depósito de tecido adiposo visceral (192). Em contrapartida, o treinamento físico aeróbio tem sido recomendado para reduzir os fatores de risco associados com cardiometabólicos e é clinicamente relevante contra os efeitos negativos da dieta ocidental. Neste sentido, no presente estudo, o treinamento físico aeróbio foi capaz de reduzir o tecido adiposo retroperitoneal em 60 dias. Essa redução também foi observada em animais submetidos ao treinamento

físico aeróbio, após 8 semanas de protocolo (64). No entanto, nenhuma alteração foi observada com relação o peso corporal após o treinamento físico aeróbio. Este resultado corrobora com estudos prévios no qual treinamento físico aeróbio ao final de 8 semanas não reduziu o peso corporal dos animais com sobrecarga de frutose iniciada logo após o desmame (64).

Tendo em vista que alterações na adiposidade podem estar associadas as características lipogênicas da frutose. O passo seguinte foi avaliar os níveis de triglicérides bem como os de glicose destes animais. O grupo submetido ao consumo crônico de frutose apresentou níveis elevados de triglicérides em 30 e 60 dias. Esse achado é bem estabelecido tanto em estudos com animais (11, 64, 188) como em estudos com humanos (192, 193). Porém, nenhuma alteração foi observada após treinamento físico aeróbio quando comparado ao grupo controle. Sugerindo que o treinamento físico aeróbio foi eficaz em controlar os níveis. Corroborando com um estudo que não observou alteração dos níveis de triglicérides após treinamento físico aeróbio, resistido e combinado com sobrecarga de frutose (194).

Parâmetros metabólicos como triglicerídeos e deposição de tecido adiposo possuem íntima relação com a níveis séricos de insulina e resistência a esse hormônio. Portanto, o próximo passo foi avaliar a resistência insulínica nos grupos estudados. O consumo de frutose foi capaz de induzir desde os 7 dias de frutose resistência à insulina. Estudos prévios relatam que o alto consumo de frutose pode estar associado com 3 características patológicas associadas a síndrome metabólica, tais como, adiposidade visceral, dislipidemia e resistência à insulina (192). No entanto, o treinamento físico aeróbio foi eficaz de prevenir essa disfunção, como também melhorar a sensibilidade à insulina em 60 dias. Esta melhora da sensibilidade à insulina já foi demonstrada previamente em ratos machos Wistar após a sobrecarga de frutose associado treinamento físico aeróbio por 10 semanas (115).

Desta forma, os resultados do presente estudo sugerem que a disfunção neuroimune parece ser o gatilho para o desenvolvimento das disfunções cardiometabólica associadas ao consumo de frutose, as quais parecem ser prevenidas pelo treinamento físico aeróbio. Em conjunto nossos achados reforçam o papel do sistema nervoso autônomo na gênese das disfunções

cardiometabólicas e evidenciam um importante papel do treinamento físico combinado na prevenção dessas alterações.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados do estudo I evidenciaram que um sessão de exercício físico aeróbio atenuou os níveis séricos de TNF, IFN γ e HMGB1 e não apenas retardou as respostas inflamatórias em modelo experimental de sepse por LPS. Embora a inibição "precoce" da produção de TNF possa atenuar a produção de outros fatores inflamatórios, nossos resultados sugerem que o exercício atenuou essas citocinas inflamatórias por meio de um mecanismo independente do TNF. Além disso, o exercício realmente aumentou a produção de citocinas anti-inflamatórias (TGF β 1 e IL10). Nosso estudo também observou que uma única sessão de natação preveniu danos aos órgãos, incluindo hipocalcemia, hipocalcemia, e melhorou a proporção de nitrogênio ureico/creatinina no sangue, sugerindo proteção aos rins. No entanto, estes efeitos do exercício agudo não melhoraram a sobrevivência dos ratos na endotoxemia. Dado que uma única sessão de natação pode induzir uma proteção temporal, enquanto o exercício pode induzir uma proteção mais duradoura. Nos observamos que de fato, submeter os camundongos a natação todos os dias durante 7 dias atenuou a produção de TNF mesmo quando o LPS foi injetado às 72h após o último exercício, e melhorou a sobrevivência dos ratos na endotoxemia. Para nosso conhecimento, nossos resultados são a primeira evidência do papel do nervo vago no controle da inflamação pelo exercício físico. O exercício atenuou os níveis séricos de TNF ao inibir sua produção no baço através de um mecanismo mediado pelo nervo vago subdiafragmático. Adicionalmente, o exercício aumentou os níveis séricos de dopamina. Observamos ainda que a dopamina inibiu a produção de TNF induzida por LPS de cultura primária de esplenócitos. Juntos, esses resultados sugerem que a regulação vagal da dopamina contribui para o controle do exercício da resposta imune inata à sepse em modelo experimental.

Com relação ao estudo II, nossos resultados evidenciam que com apenas 7 de consumo de frutose houve prejuízo no controle autonômico da circulação e estresse oxidativo, que foi seguida por aumento de inflamação. Estes fatores se mantiveram aumentados durante o curso temporal, que provavelmente se associam ao aparecimento das disfunções cardiometabólicas. Adicionalmente,

o treinamento físico combinado impediu o desenvolvimento da disfunção autonômica neste modelo, o que provavelmente promoveu alterações neuroimunes e de perfil de estresse oxidativo favoráveis, culminado em marcante atenuação das disfunções cardiometabólicas em SHR submetidos ao consumo de frutose. Em conjunto nossos achados reforçam o papel do sistema nervoso autônomo na gênese das disfunções cardiometabólicas e evidenciam um importante papel do treinamento físico combinado na prevenção dessas alterações.

Concluindo, nossos resultados evidenciam que as disfunções neuroimunes ocorrem precocemente em modelos experimentais de sepse ou de síndrome metabólica e que o exercício físico aeróbio de intensidade moderada é eficaz em prevenir/atenuar tais alterações impactando em prevenção de alterações cardiometabólicas clinicamente detectáveis nestas condições. No entanto, estudos futuros são necessários para determinar como diferentes tipos de exercício regulam diferentes redes neuronais e sua contribuição para os benefícios cardiovasculares, metabólicos e imunológicos induzidos pelo exercício físico. Estes estudos poderão permitir a concepção de novas abordagens para o tratamento de doenças neuroimunes e cardiometabólicas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

1. Ulloa L, Deitch EA. Neuroimmune perspectives in sepsis. *Critical Care (London, England)*. 2009;13(2):133.
2. Kanashiro A, Sonogo F, Ferreira RG, Castanheira FV, Leite CA, Borges VF, et al. Therapeutic potential and limitations of cholinergic anti-inflammatory pathway in sepsis. *Pharmacological Research*. 2017;117:1-8.
3. Ulloa L, Torres-Rosas R, Quiroz-Gonzalez S. From Neuronal Stimulation to Functional Organization And Immunomodulation. *Trends in Molecular Medicine*. 2017(Accepted).
4. Torres-Rosas R, Yehia G, Pena G, Mishra P, del Rocio Thompson-Bonilla M, Moreno-Eutimio MA, et al. Dopamine mediates vagal modulation of the immune system by electroacupuncture. *Nature Medicine*. 2014;20(3):291-5.
5. Pena G, Cai B, Ramos L, Vida G, Deitch EA, Ulloa L. Cholinergic regulatory lymphocytes re-establish neuromodulation of innate immune responses in sepsis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2011;187(2):718-25.
6. Rosas-Ballina M, Ochani M, Parrish WR, Ochani K, Harris YT, Huston JM, et al. Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(31):11008-13.
7. Payolla TB, Lemes SF, de Fante T, Reginato A, Mendes da Silva C, de Oliveira Micheletti T, et al. High-fat diet during pregnancy and lactation impairs the cholinergic anti-inflammatory pathway in the liver and white adipose tissue of mouse offspring. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2016;422:192-202.
8. Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, DiRaimo R, Susarla S, Czura CJ, et al. Cholinergic antiinflammatory pathway inhibition of tumor necrosis factor during ischemia reperfusion. *Journal of Vascular Surgery*. 2002;36(6):1231-6.
9. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature*. 2002;420(6917):853-9.
10. Rosas-Ballina M, Olofsson PS, Ochani M, Valdes-Ferrer SI, Levine YA, Reardon C, et al. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science (New York, NY)*. 2011;334(6052):98-101.
11. Brito JO, Ponciano K, Figueroa D, Bernardes N, Sanches IC, Irigoyen MC, et al. Parasympathetic dysfunction is associated with insulin resistance in fructose-fed female rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2008;41(9):804-8.
12. Farah Vde M, De Angelis K, Joaquim LF, Candido GO, Bernardes N, Fazan R, Jr., et al. Autonomic modulation of arterial pressure and heart rate variability in hypertensive diabetic rats. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*. 2007;62(4):477-82.
13. Hellstrom HR. The altered homeostatic theory: A hypothesis proposed to be useful in understanding and preventing ischemic heart disease, hypertension, and diabetes--including reducing the risk of age and atherosclerosis. *Medical Hypotheses*. 2007;68(2):415-33.
14. Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*. 2006;444(7121):875-80.
15. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*. 2000;405(6785):458-62.
16. Huston JM, Ochani M, Ochani K, Puerta MG, Ashok M, Rosas-Ballina M, et al. Splenectomy improves survival in experimental polymicrobial sepsis. *Journal of American College Surgeons*. 2006;203(3):S30-S.
17. Leibowitz A, Schiffrin EL. Immune mechanisms in hypertension. *Current Hypertension Reports*. 2011;13(6):465-72.
18. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444(7121):860-7.
19. Abraham E, Matthay MA, Dinarello CA, Vincent JL, Cohen J, Opal SM, et al. Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: time for a reevaluation. *Critical Care Medicine*. 2000;28(1):232-5.
20. Matot I, Sprung CL. Definition of sepsis. *Intensive care medicine*. 2001;27 Suppl 1:S3-9.
21. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *The New England Journal of Medicine*. 2003;348(16):1546-54.
22. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *The New England Journal of Medicine*. 2013;369(9):840-51.
23. Ulloa L, Tracey KJ. The "cytokine profile": a code for sepsis. *Trends in Molecular Medicine*. 2005;11(2):56-63.

24. Ulloa L. The vagus nerve and the nicotinic anti-inflammatory pathway. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2005;4(8):673-84.
25. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical Care Medicine*. 2001;29(7):1303-10.
26. Angus DC. Caring for the critically ill patient: challenges and opportunities. *Jama*. 2007;298(4):456-8.
27. Sands KE, Bates DW, Lanken PN, Graman PS, Hibberd PL, Kahn KL, et al. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group. *JAMA*. 1997;278(3):234-40.
28. Hershey TB, Kahn JM. State Sepsis Mandates - A New Era for Regulation of Hospital Quality. *The New England Journal of Medicine*. 2017;376(24):2311-3.
29. Ulloa L, Deitch EA. Neuroimmune perspectives in sepsis. *Critical Care*. 2009;13(2).
30. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*. 1987;330(6149):662-4.
31. Cai B, Chen F, Ji Y, Kiss L, DeJonge W, Szabo C, et al. Alpha7 cholinergic-agonist prevents systemic inflammation and improves survival during resuscitation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2009;13(9B):3774-85.
32. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: Signal 0s that Spur Autophagy and Immunity. *Immunological Reviews*. 2012;249(1):158-75.
33. Eskandari MK, Bolgos G, Miller C, Nguyen DT, DeForge LE, Remick DG. Anti-tumor necrosis factor antibody therapy fails to prevent lethality after cecal ligation and puncture or endotoxemia. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1992;148(9):2724-30.
34. Remick D, Manohar P, Bolgos G, Rodriguez J, Moldawer L, Wollenberg G. Blockade of tumor necrosis factor reduces lipopolysaccharide lethality, but not the lethality of cecal ligation and puncture. *Shock (Augusta, Ga)*. 1995;4(2):89-95.
35. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *The New England Journal of Medicine*. 2003;348(2):138-50.
36. Huston JM, Ochani M, Rosas-Ballina M, Liao H, Ochani K, Pavlov VA, et al. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *The Journal of Experimental Medicine*. 2006;203(7):1623-8.
37. Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS. Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacological Reviews*. 2004;56(3):331-49.
38. Pereira RM, Botezelli JD, da Cruz Rodrigues KC, Mekary RA, Cintra DE, Pauli JR, et al. Fructose Consumption in the Development of Obesity and the Effects of Different Protocols of Physical Exercise on the Hepatic Metabolism. *Nutrients*. 2017;9(4).
39. Barreiros RC, Bossolan G, Trindade CEP. Fructose em humanos: efeitos metabólicos, utilização clínica e erros inatos associados. *Revista de Nutrição*. 2005;377-89.
40. Havel PJ. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutrition Reviews*. 2005;63(5):133-57.
41. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009;120(16):1640-5.
42. Basciano H, Federico L, Adeli K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutrition & Metabolism*. 2005;2(1):5.
43. Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2002;76(5):911-22.
44. Han TS, Lean ME. A clinical perspective of obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *JRSM Cardiovascular Disease*. 2016;5:2048004016633371.
45. Vidigal Fde C, Ribeiro AQ, Babio N, Salas-Salvado J, Bressan J. Prevalence of metabolic syndrome and pre-metabolic syndrome in health professionals: LATINMETS Brazil study. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2015;7:6.
46. Gami AS, Witt BJ, Howard DE, Erwin PJ, Gami LA, Somers VK, et al. Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;49(4):403-14.
47. Gerczuk PZ, Kloner RA. 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*. 2012;59(11):969-78.

48. Kaur J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiology Research and Practice*. 2014;2014:943162.
49. WHO recognizes oral diseases in action plan for noncommunicable diseases. *Journal (Canadian Dental Association)*. 2013;79:d113.
50. Perez-Pozo SE, Schold J, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Johnson RJ, Lillo JL. Excessive fructose intake induces the features of metabolic syndrome in healthy adult men: role of uric acid in the hypertensive response. *International Journal of Obesity* (2005). 2010;34(3):454-61.
51. Nguyen S, Choi HK, Lustig RH, Hsu CY. Sugar-sweetened beverages, serum uric acid, and blood pressure in adolescents. *The Journal of Pediatrics*. 2009;154(6):807-13.
52. Jalal DI, Smits G, Johnson RJ, Chonchol M. Increased fructose associates with elevated blood pressure. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2010;21(9):1543-9.
53. Foss CH, Vestbo E, Froland A, Gjessing HJ, Mogensen CE, Damsgaard EM. Autonomic neuropathy in nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects is associated with urinary albumin excretion rate and 24-h ambulatory blood pressure: the Fredericia Study. *Diabetes*. 2001;50(3):630-6.
54. Brown CM, Dulloo AG, Yepuri G, Montani JP. Fructose ingestion acutely elevates blood pressure in healthy young humans. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2008;294(3):R730-7.
55. 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(8):945-9.
56. Montano N, Porta A, Cogliati C, Costantino G, Tobaldini E, Casali KR, et al. Heart rate variability explored in the frequency domain: a tool to investigate the link between heart and behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2009;33(2):71-80.
57. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabetic Medicine*. 2006;23(5):469-80.
58. Fellmann L, Nascimento AR, Tibirica E, Bousquet P. Murine models for pharmacological studies of the metabolic syndrome. *Pharmacology & Therapeutics*. 2013;137(3):331-40.
59. Morris M, Araujo IC, Pohlman RL, Marques MC, Rodwan NS, Farah VM. Timing of fructose intake: an important regulator of adiposity. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*. 2012;39(1):57-62.
60. Farah V, Elased KM, Chen Y, Key MP, Cunha TS, Irigoyen MC, et al. Nocturnal hypertension in mice consuming a high fructose diet. *Autonomic neuroscience : Basic & Clinical*. 2006;130(1-2):41-50.
61. Cunha TS, Farah V, Paulini J, Pazzine M, Elased KM, Marcondes FK, et al. Relationship between renal and cardiovascular changes in a murine model of glucose intolerance. *Regulatory Peptides*. 2007;139(1-3):1-4.
62. Suzuki M, Nomura C, Odaka H, Ikeda H. Effect of an insulin sensitizer, pioglitazone, on hypertension in fructose-drinking rats. *Japanese Journal of Pharmacology*. 1997;74(4):297-302.
63. Teff KL, Elliott SS, Tschop M, Kieffer TJ, Rader D, Heiman M, et al. Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2004;89(6):2963-72.
64. Farah D, Nunes J, Sartori M, Dias DD, Sirvente R, Silva MB, et al. Exercise Training Prevents Cardiovascular Derangements Induced by Fructose Overload in Developing Rats. *PloS One*. 2016;11(12):e0167291.
65. De Angelis K, Senador DD, Mostarda C, Irigoyen MC, Morris M. Sympathetic overactivity precedes metabolic dysfunction in a fructose model of glucose intolerance in mice. *American journal of Physiology Regulatory, Integrative And Comparative Physiology*. 2012;302(8):R950-7.
66. Seravalle G, Grassi G. Sympathetic Nervous System, Hypertension, Obesity and Metabolic Syndrome. *High blood pressure & cardiovascular prevention : the official journal of the Italian Society of Hypertension*. 2016;23(3):175-9.
67. Grassi G. Sympathetic overdrive and cardiovascular risk in the metabolic syndrome. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2006;29(11):839-47.
68. Smith MM, Minson CT. Obesity and adipokines: effects on sympathetic overactivity. *The Journal of Physiology*. 2012;590(8):1787-801.
69. Leibowitz A, Rehman A, Paradis P, Schiffrin EL. Role of T regulatory lymphocytes in the pathogenesis of high-fructose diet-induced metabolic syndrome. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2013;61(6):1316-21.
70. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor- α and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation*. 2000;101(18):2149-53.

71. Park HT, Cho SH, Cho GJ, Shin JH, Hong SC, Kim T, et al. Relationship between serum adipocytokine levels and metabolic syndrome in menopausal women. *Gynecological Endocrinology : The Official Journal Of The International Society Of Gynecological Endocrinology*. 2009;25(1):27-31.
72. Pradhan AD, Manson JE, Rossouw JE, Siscovick DS, Mouton CP, Rifai N, et al. Inflammatory biomarkers, hormone replacement therapy, and incident coronary heart disease: prospective analysis from the Women's Health Initiative observational study. *JAMA*. 2002;288(8):980-7.
73. Kaur K, Sharma AK, Dhingra S, Singal PK. Interplay of TNF-alpha and IL-10 in regulating oxidative stress in isolated adult cardiac myocytes. *Journal Of Molecular And Cellular Cardiology*. 2006;41(6):1023-30.
74. 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. *American Journal Of Physiology Heart And Circulatory Physiology*. 2007;293(6):H3524-31.
75. Campos JC, Gomes KM, Ferreira JC. Impact of exercise training on redox signaling in cardiovascular diseases. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2013;62:107-19.
76. Dantas APV, Carvalho MHCd. Efecto protector de los estrógenos en el sistema cardiovascular. *Antioxid Calid Vida*. 2000;7(28):6-11.
77. Bello-Klein A, Bock PM, Travacio M, Senna SM, Llesuy S, de Bittencourt PI, Jr., et al. Myocardial oxidative stress and antioxidants in hypertension as a result of nitric oxide synthase inhibition. *Cardiovascular Toxicology*. 2001;1(1):43-50.
78. Rubanyi GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *Journal Of Cardiovascular Pharmacology*. 1993;22 Suppl 4:S1-14.
79. Gryglewski RJ, Moncada S, Palmer RM. Bioassay of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from porcine aortic endothelial cells. 1985. *British Journal Of Pharmacology*. 1997;120(4 Suppl):494-503; discussion 491-3.
80. Chowdhary S, Vaile JC, Fletcher J, Ross HF, Coote JH, Townend JN. Nitric oxide and cardiac autonomic control in humans. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2000;36(2):264-9.
81. De Angelis Lobo d'Avila K, Gadonski G, Fang J, Dall'Ago P, Albuquerque VL, Peixoto LR, et al. Exercise reverses peripheral insulin resistance in trained L-NAME-hypertensive rats. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 1999;34(4 Pt 2):768-72.
82. Churchill EN, Murriel CL, Chen CH, Mochly-Rosen D, Szweda LI. Reperfusion-induced translocation of deltaPKC to cardiac mitochondria prevents pyruvate dehydrogenase reactivation. *Circulation Research*. 2005;97(1):78-85.
83. Yogalingam G, Hwang S, Ferreira JC, Mochly-Rosen D. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) phosphorylation by protein kinase Cdelta (PKCdelta) inhibits mitochondria elimination by lysosomal-like structures following ischemia and reoxygenation-induced injury. *The Journal Of Biological Chemistry*. 2013;288(26):18947-60.
84. Carvajal K, El Hafidi M, Banos G. Myocardial damage due to ischemia and reperfusion in hypertriglyceridemic and hypertensive rats: participation of free radicals and calcium overload. *Journal of Hypertension*. 1999;17(11):1607-16.
85. Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sciences*. 2009;84(21-22):705-12.
86. Martin-Cordero L, Garcia JJ, Hinchado MD, Ortega E. The interleukin-6 and noradrenaline mediated inflammation-stress feedback mechanism is dysregulated in metabolic syndrome: effect of exercise. *Cardiovascular Diabetology*. 2011;10:42.
87. Florez H, Castillo-Florez S, Mendez A, Casanova-Romero P, Larreal-Urdaneta C, Lee D, et al. C-reactive protein is elevated in obese patients with the metabolic syndrome. *Diabetes Research And Clinical Practice*. 2006;71(1):92-100.
88. Yamaguchi Y, Yoshikawa N, Kagota S, Nakamura K, Haginaka J, Kunitomo M. Elevated circulating levels of markers of oxidative-nitrative stress and inflammation in a genetic rat model of metabolic syndrome. *Nitric oxide : Biology and Chemistry*. 2006;15(4):380-6.
89. Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;966:290-303.
90. Schlaich MP, Kaye DM, Lambert E, Sommerville M, Socratous F, Esler MD. Relation between cardiac sympathetic activity and hypertensive left ventricular hypertrophy. *Circulation*. 2003;108(5):560-5.
91. Mostarda C, Moraes-Silva IC, Salemi VM, Machi JF, Rodrigues B, De Angelis K, et al. Exercise training prevents diastolic dysfunction induced by metabolic syndrome in rats. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*. 2012;67(7):815-20.

92. Rodrigues B, Lira FS, Consolim-Colombo FM, Rocha JA, Caperuto EC, De Angelis K, et al. Role of exercise training on autonomic changes and inflammatory profile induced by myocardial infarction. *Mediators of Inflammation*. 2014;2014:702473.
93. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001;285(19):2486-97.
94. Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, Hamalainen H, Ilanne-Parikka P, et al. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *The New England Journal Of Medicine*. 2001;344(18):1343-50.
95. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *American Heart Journal*. 1999;138(5 Pt 2):S419-20.
96. Pedersen BK, Saltin B. Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. *Scandinavian Journal Of Medicine & Science In Sports*. 2006;16 Suppl 1:3-63.
97. Milani RV, Lavie CJ, Mehra MR. Reduction in C-reactive protein through cardiac rehabilitation and exercise training. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;43(6):1056-61.
98. Masson GS, Costa TS, Yshii L, Fernandes DC, Soares PP, Laurindo FR, et al. 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.
99. Agarwal D, Haque M, Sriramula S, Mariappan N, Pariaut R, Francis J. Role of proinflammatory cytokines and redox homeostasis in exercise-induced delayed progression of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2009;54(6):1393-400.
100. Kim JS, Lee YH, Kim JC, Ko YH, Yoon CS, Yi HK. Effect of exercise training of different intensities on anti-inflammatory reaction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biology of Sport*. 2014;31(1):73-9.
101. Fallon KE, Fallon SK, Boston T. The acute phase response and exercise: court and field sports. *British Journal Of Sports Medicine*. 2001;35(3):170-3.
102. Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal Of Applied Physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2005;98(4):1154-62.
103. Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Patents on Inflammation and Allergy Drug Discovery*. 2009;3(1):73-80.
104. Bagby GJ, Sawaya DE, Crouch LD, Shepherd RE. Prior exercise suppresses the plasma tumor necrosis factor response to bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 1994;77(3):1542-7.
105. Nieman DC, Dumke CL, Henson DA, McAnulty SR, Gross SJ, Lind RH. Muscle damage is linked to cytokine changes following a 160-km race. *Brain, Behavior, And Immunity*. 2005;19(5):398-403.
106. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews Immunology*. 2011;11(2):85-97.
107. Mathis D, Shoelson SE. Immunometabolism: an emerging frontier. *Nature Reviews Immunology*. 2011;11(2):81-.
108. Nieman DC. Clinical implications of exercise immunology. *Journal of Sport and Health Science*. 2012;1(1):12-7.
109. Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nature Reviews Immunology*. 2011;11(9):607-15.
110. Flynn MG, McFarlin BK. Toll-like receptor 4: link to the anti-inflammatory effects of exercise? *Exercise and sport sciences reviews*. 2006;34(4):176-81.
111. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiological Reviews*. 2008;88(4):1379-406.
112. Yeh SH, Chuang H, Lin LW, Hsiao CY, Eng HL. Regular tai chi chuan exercise enhances functional mobility and CD4CD25 regulatory T cells. *British Journal Of Sports Medicine*. 2006;40(3):239-43.
113. Wang J, Song H, Tang X, Yang Y, Vieira VJ, Niu Y, et al. Effect of exercise training intensity on murine T-regulatory cells and vaccination response. *Scandinavian Journal Of Medicine & Science In Sports*. 2012;22(5):643-52.
114. Hull SS, Jr., Vanoli E, Adamson PB, Verrier RL, Foreman RD, Schwartz PJ. Exercise training confers anticipatory protection from sudden death during acute myocardial ischemia. *Circulation*. 1994;89(2):548-52.
115. Moraes-Silva IC, Mostarda C, Moreira ED, Silva KA, dos Santos F, de Angelis K, et al. Preventive role of exercise training in autonomic, hemodynamic, and metabolic parameters in rats under high risk of

- metabolic syndrome development. *Journal of Applied Physiology* (Bethesda, Md : 1985). 2013;114(6):786-91.
116. Bernardes N, da Silva Dias D, Stoyell-Conti FF, de Oliveira Brito-Monzani J, Malfitano C, Caldini EG, et al. Baroreflex Impairment Precedes Cardiometabolic Dysfunction in an Experimental Model of Metabolic Syndrome: Role of Inflammation and Oxidative Stress. *Scientific Reports*. 2018;8(1):8578.
 117. Silva GJ, Brum PC, Negrao CE, Krieger EM. Acute and chronic effects of exercise on baroreflexes in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* (Dallas, Tex : 1979). 1997;30(3 Pt 2):714-9.
 118. Coimbra R, Sanchez LS, Potenza JM, Rossoni LV, Amaral SL, Michelini LC. Is gender crucial for cardiovascular adjustments induced by exercise training in female spontaneously hypertensive rats? *Hypertension* (Dallas, Tex : 1979). 2008;52(3):514-21.
 119. Irigoyen MC, Paulini J, Flores LJ, Flues K, Bertagnolli M, Moreira ED, et al. Exercise training improves baroreflex sensitivity associated with oxidative stress reduction in ovariectomized rats. *Hypertension* (Dallas, Tex : 1979). 2005;46(4):998-1003.
 120. Eleuterio-Silva MA, Sa da Fonseca LJ, Velloso EP, da Silva Guedes G, Sampaio WO, da Silva WF, et al. Short-term cardiovascular physical programme ameliorates arterial stiffness and decreases oxidative stress in women with metabolic syndrome. *Journal of Rehabilitation Medicine*. 2013;45(6):572-9.
 121. Dragusha G, Elezi A, Dragusha S, Gorani D, Begolli L. Treatment benefits on metabolic syndrome with diet and physical activity. *Bosnian Journal Of Basic Medical Sciences*. 2010;10(2):169-76.
 122. Pedersen BK, Fischer CP. Beneficial health effects of exercise--the role of IL-6 as a myokine. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2007;28(4):152-6.
 123. Flynn MG, McFarlin BK, Markofski MM. The Anti-Inflammatory Actions of Exercise Training. *American Journal Of Lifestyle Medicine*. 2007;1(3):220-35.
 124. Pedersen BK, Bruunsgaard H. Possible beneficial role of exercise in modulating low-grade inflammation in the elderly. *Scandinavian Journal Of Medicine & Science In Sports*. 2003;13(1):56-62.
 125. Gleeson M. Overview: Exercise immunology. *Immunology and Cell Biology*. 2000;78:483.
 126. Pedersen BK, Saltin B. Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 2006;16(S1):3-63.
 127. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA*. 2001;286(3):327-34.
 128. Gleeson M, McFarlin B, Flynn M. Exercise and Toll-like receptors. *Exercise Immunology Review*. 2006;12:34-53.
 129. Pedersen BK, Saltin B. Exercise as medicine - evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scandinavian Journal Of Medicine & Science In Sports*. 2015;25 Suppl 3:1-72.
 130. van Lien R, Goedhart A, Kupper N, Boomsma D, Willemsen G, de Geus EJ. Underestimation of cardiac vagal control in regular exercisers by 24-hour heart rate variability recordings. *International journal of psychophysiology : official journal of the International Organization of Psychophysiology*. 2011;81(3):169-76.
 131. Ekblom B, Kilbom Å, Soltysiak J. Physical Training, Bradycardia, and Autonomic Nervous System. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 1973;32(3):251-6.
 132. Evangelista FS, Brum PC, Krieger JE. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2003;36:1751-9.
 133. Trevellin E, Scorzeto M, Olivieri M, Granzotto M, Valerio A, Tedesco L, et al. Exercise training induces mitochondrial biogenesis and glucose uptake in subcutaneous adipose tissue through eNOS-dependent mechanisms. *Diabetes*. 2014;63(8):2800-11.
 134. Wang H, Liao H, Ochani M, Justiniani M, Lin XC, Yang LH, et al. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nature Medicine*. 2004;10(11):1216-21.
 135. Torres-Rosas R, Yehia G, Pena G, Mishra P, Del Rocio Thompson-Bonilla M, Moreno-Eutimio MA, et al. Dopamine mediates vagal modulation of the immune system by electroacupuncture. *Nature Medicine*. 2014;20:291-5.
 136. Vida G, Peña G, Deitch EA, Ulloa L. Alpha7-nicotinic receptor mediates vagal induction of splenic norepinephrine. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2011;186(7):4340-6.
 137. Vida G, Pena G, Kanashiro A, Del Rocio Thompson-Bonilla M, Palange D, Deitch EA, et al. β 2-Adrenoreceptors of regulatory lymphocytes are essential for vagal neuromodulation of the innate immune system. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2011;25(12):4476-85.
 138. Grimonprez A, Raedt R, Portelli J, Dauwe I, Larsen LE, Bouckaert C, et al. The antidepressant-like effect of vagus nerve stimulation is mediated through the locus coeruleus. *Journal of Psychiatric Research*. 2015;68:1-7.

139. Krahl SE, Senanayake SS, Pekary AE, Sattin A. Vagus nerve stimulation (VNS) is effective in a rat model of antidepressant action. *Journal of Psychiatric Research*. 2004;38(3):237-40.
140. Bonaz B, Sinniger V, Pellissier S. The Vagus Nerve in the Neuro-Immune Axis: Implications in the Pathology of the Gastrointestinal Tract. *Frontiers in Immunology*. 2017;8:1452.
141. Carnevali L, Sgoifo A. Vagal modulation of resting heart rate in rats: the role of stress, psychosocial factors, and physical exercise. *Frontiers in Physiology*. 2014;5:118.
142. Torres-Rosas R, Yehia G, Pena G, Mishra P, Thompson-Bonilla MD, Moreno-Eutimio MA, et al. Dopamine mediates vagal modulation of the immune system by electroacupuncture. *Nature Medicine*. 2014;20(3):291-5.
143. Ulloa L, Torres-Rosas R, Quiroz-Gonzalez S. From Neuronal Stimulation to Functional Organization And Immunomodulation. *Trends in Molecular Medicine*. 2017(Accepted).
144. Gingrich JA, Caron MG. Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annual Review of Neuroscience*. 1993;16:299-321.
145. Grenader A, Healy DP. Fenoldopam is a partial agonist at dopamine-1 (DA1) receptors in LLC-PK1 cells. *The Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics*. 1991;258(1):193-8.
146. Weber RR, McCoy CE, Ziemniak JA, Frederickson ED, Goldberg LI, Murphy MB. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of intravenous fenoldopam, a dopamine1-receptor agonist, in hypertensive patients. *British Journal Of Clinical Pharmacology*. 1998;25(1):17-21.
147. Tiberi M, Caron MG. High agonist-independent activity is a distinguishing feature of the dopamine D1B receptor subtype. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(45):27925-31.
148. Deneff C, Manet D, Dewals R. Dopaminergic stimulation of prolactin release. *Nature*. 1980;285(5762):243-6.
149. Gorissen H, Laduron P. Solubilisation of high-affinity dopamine receptors. *Nature*. 1979;279(5708):72-4.
150. Starkie R, Ostrowski SR, Jauffred S, Febbraio M, Pedersen BK. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production in humans. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003;17(8):884-6.
151. Keller C, Steensberg A, Pilegaard H, Osada T, Saltin B, Pedersen BK, et al. Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2001;15(14):2748-50.
152. Chen HI, Hsieh SY, Yang FL, Hsu YH, Lin CC. Exercise training attenuates septic responses in conscious rats. *Medicine and Science In Sports And Exercise*. 2007;39(3):435-42.
153. Marino MW, Dunn A, Grail D, Inglese M, Noguchi Y, Richards E, et al. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(15):8093-8.
154. Coelho CW, Jannig PR, Souza AB, Fronza H, Jr., Westphal GA, Petronilho F, et al. Exercise training prevents skeletal muscle damage in an experimental sepsis model. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*. 2013;68(1):107-14.
155. Neto OB, de Sordi CC, da Mota GR, Marocolo M, Chriguer RS, da Silva VJD. Exercise training improves hypertension-induced autonomic dysfunction without influencing properties of peripheral cardiac vagus nerve. *Autonomic Neuroscience : Basic & Clinical*. 2017;208:66-72.
156. Koopman FA, Chavan SS, Miljko S, Grazio S, Sokolovic S, Schuurman PR, et al. Vagus nerve stimulation inhibits cytokine production and attenuates disease severity in rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(29):8284-9.
157. Altavilla D, Guarini S, Bitto A, Mioni C, Giuliani D, Bigiani A, et al. Activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway reduces NF-kappaB activation, blunts TNF-alpha production, and protects against splanchnic artery occlusion shock. *Shock (Augusta, Ga)*. 2006;25(5):500-6.
158. Grech D, Li Z, Morcillo P, Kalyoussef E, Kim DD, Bekker A, et al. Intraoperative Low-frequency Electroacupuncture under General Anesthesia Improves Postoperative Recovery in a Randomized Trial. *Journal of Acupuncture And Meridian Studies*. 2016;9(5):234-41.
159. Van Westerloo DJ, Giebelen IA, Florquin S, Bruno MJ, Larosa GJ, Ulloa L, et al. The vagus nerve and nicotinic receptors modulate experimental pancreatitis severity in mice. *Gastroenterology*. 2006;130(6):1822-30.
160. van Westerloo DJ, Giebelen IA, Florquin S, Daalhuisen J, Bruno MJ, de Vos AF, et al. The cholinergic anti-inflammatory pathway regulates the host response during septic peritonitis. *Journal Infectious Disease*. 2005;191(12):2138-48.
161. Robison LS, Swenson S, Hamilton J, Thanos PK. Exercise Reduces Dopamine D1R and Increases D2R in Rats: Implications for Addiction. *Medicine and Science In Sports And Exercise*. 2018.

162. Rosso AL, Metti AL, Glynn NW, Boudreau RM, Rejeski WJ, Bohnen N, et al. Dopamine-Related Genotypes and Physical Activity Change During an Intervention: The Lifestyle Interventions and Independence for Elders Study. *Journal of American Geriatric Society*. 2018.
163. Mitchell UH, Obray JD, Hunsaker E, Garcia BT, Clarke TJ, Hope S, et al. Peripheral Dopamine in Restless Legs Syndrome. *Frontiers in Neurology*. 2018;9:155.
164. McMorris T. Developing the catecholamines hypothesis for the acute exercise-cognition interaction in humans: Lessons from animal studies. *Physiology & Behavior*. 2016;165:291-9.
165. McMorris T. Reappraisal of the acute, moderate intensity exercise-catecholamines interaction effect on speed of cognition: role of the vagal/NTS afferent pathway. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2016;120(6):657-8.
166. Otto MC, Afshin A, Micha R, Khatibzadeh S, Fahimi S, Singh G, et al. The Impact of Dietary and Metabolic Risk Factors on Cardiovascular Diseases and Type 2 Diabetes Mortality in Brazil. *PloS One*. 2016;11(3):e0151503.
167. Beltran-Sanchez H, Harhay MO, Harhay MM, McElligott S. Prevalence and trends of metabolic syndrome in the adult U.S. population, 1999-2010. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(8):697-703.
168. Guilbert JJ. The world health report 2002 - reducing risks, promoting healthy life. *Education for Health (Abingdon, England)*. 2003;16(2):230.
169. 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. *Cardiovascular Diabetology*. 2007;6:38.
170. Soares PP, da Nobrega AC, Ushizima MR, Irigoyen MC. Cholinergic stimulation with pyridostigmine increases heart rate variability and baroreflex sensitivity in rats. *Autonomic Neuroscience : Basic & Clinical*. 2004;113(1-2):24-31.
171. Heeren MV, De Sousa LE, Mostarda C, Moreira E, Machert H, Rigatto KV, et al. Exercise improves cardiovascular control in a model of dyslipidemia and menopause. *Maturitas*. 2009;62(2):200-4.
172. Bonora E, Moghetti P, Zaccanaro C, Cigolini M, Querena M, Cacciatori V, et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *The Journal Of Clinical Endocrinology And Metabolism*. 1989;68(2):374-8.
173. Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Progress in Lipid Research*. 2004;43(3):200-27.
174. Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori Journal*. 1985;71(3):241-9.
175. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal Of Biological Chemistry*. 1951;193(1):265-75.
176. Gonzalez Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radical Biology & Medicine*. 1991;10(2):93-100.
177. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology*. 1994;233:357-63.
178. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *The Biochemical Journal*. 1973;134(3):707-16.
179. da Palma RK, Moraes-Silva IC, da Silva Dias D, Shimojo GL, Conti FF, Bernardes N, et al. Resistance or aerobic training decreases blood pressure and improves cardiovascular autonomic control and oxidative stress in hypertensive menopausal rats. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2016;121(4):1032-8.
180. Sanches IC, Conti FF, Sartori M, Irigoyen MC, De Angelis K. Standardization of resistance exercise training: effects in diabetic ovariectomized rats. *International Journal Of Sports Medicine*. 2014;35(4):323-9.
181. Sanches IC, de Oliveira Brito J, Candido GO, da Silva Dias D, Jorge L, Irigoyen MC, et al. Cardiometabolic benefits of exercise training in an experimental model of metabolic syndrome and menopause. *Menopause (New York, NY)*. 2012;19(5):562-8.
182. Bertagnolli M, Campos C, Schenkel PC, de Oliveira VL, De Angelis K, Bello-Klein A, et al. Baroreflex sensitivity improvement is associated with decreased oxidative stress in trained spontaneously hypertensive rat. *Journal of Hypertension*. 2006;24(12):2437-43.
183. Rothwell PM. Limitations of the usual blood-pressure hypothesis and importance of variability, instability, and episodic hypertension. *Lancet (London, England)*. 2010;375(9718):938-48.
184. Irigoyen MC, De Angelis K, Schaan BDA, Fiorino P, Michelini LC. Exercício físico no diabetes melito associado à hipertensão arterial sistêmica. *Revista Brasileira de Hipertensão vol*. 2003;10:2.

185. Irigoyen MC, Moreira ED, Ida F, Pires M, Cestari IA, Krieger EM. Changes of renal sympathetic activity in acute and chronic conscious sinoaortic denervated rats. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 1995;26(6):1111-6.
186. Shimojo GL, Palma RK, Brito JO, Sanches IC, Irigoyen MC, De Angelis K. Dynamic resistance training decreases sympathetic tone in hypertensive ovariectomized rats. *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 2015;48(6):523-7.
187. Bernardes N, Ayyappan P, De Angelis K, Bagchi A, Akolkar G, da Silva Dias D, et al. Excessive consumption of fructose causes cardiometabolic dysfunctions through oxidative stress and inflammation. *Canadian Journal Of Physiology And Pharmacology*. 2017;95(10):1078-90.
188. Conti FF, Brito Jde O, Bernardes N, Dias Dda S, Sanches IC, Malfitano C, et al. Cardiovascular autonomic dysfunction and oxidative stress induced by fructose overload in an experimental model of hypertension and menopause. *BMC Cardiovascular Disorders*. 2014;14:185.
189. Jarukamjorn K, Jearapong N, Pimson C, Chatuphonprasert W. A High-Fat, High-Fructose Diet Induces Antioxidant Imbalance and Increases the Risk and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice. *Scientifica*. 2016;2016:5029414.
190. Castro MC, Massa ML, Arbelaez LG, Schinella G, Gagliardino JJ, Francini F. Fructose-induced inflammation, insulin resistance and oxidative stress: A liver pathological triad effectively disrupted by lipoic acid. *Life Sciences*. 2015;137:1-6.
191. Jurgens H, Haass W, Castaneda TR, Schurmann A, Koebnick C, Dombrowski F, et al. Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice. *Obesity Research*. 2005;13(7):1146-56.
192. Stanhope KL, Havel PJ. Fructose consumption: potential mechanisms for its effects to increase visceral adiposity and induce dyslipidemia and insulin resistance. *Current Opinion In Lipidology*. 2008;19(1):16-24.
193. Egli L, Lecoultre V, Theytaz F, Campos V, Hodson L, Schneiter P, et al. Exercise prevents fructose-induced hypertriglyceridemia in healthy young subjects. *Diabetes*. 2013;62(7):2259-65.
194. Botezelli JD, Coope A, Ghezzi AC, Cambri LT, Moura LP, Scariot PP, et al. Strength Training Prevents Hyperinsulinemia, Insulin Resistance, and Inflammation Independent of Weight Loss in Fructose-Fed Animals. *Scientific Reports*. 2016;6:31106.

6. ANEXOS

6.1 Tabelas referentes aos resultados do Estudo II

Tabela 1: Peso corporal, tecido adiposo retroperitoneal e teste de esforço nos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbio (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias de protocolo.

Dias	7	15	30	60
Variáveis				
Peso corporal (gramas)				
C	117±4	200±5*	255±8†	351±5 ‡
F	125±3	212±4 *	254±6†	346±11‡
FT	130±5	204±6 *	265±11†	344±1‡
Tecido adiposo (gramas)				
C	0,15±0,07	0,23±0,06	0,69±0,12†	2,20±0,20 ‡
F	0,25±0,03	0,85±0,15§	1,52±0,20§	3,83±0,82‡§
FT	0,18±0,04	0,55±0,07	1,82±0,23†	1,36±0,08§†#
Teste de esforço (minutos)				
C	13,7±1,1	12,3±0,9	12,2±0,9	12,1±0,7
F	11,6±0,9	13,1±1,0	12,4±1,2	12,5±0,4
FT	15,5±0,8	16,5±0,9§#	15,9±1,2§#	21,1±0,1§#‡

Valores representam média ± erro padrão da média. * p<0,05 vs. 7 dias no mesmo grupo; † p< 0,05 vs. 7 e 15 dias no mesmo grupo; ‡ p< 0,05 vs. 7,15 e 30 dias no mesmo grupo; § p< 0,05 vs. grupo C no mesmo tempo; # p< 0,05 vs. grupo F no mesmo tempo.

Tabela 2: Triglicerídeos, glicemia e teste de tolerância à insulina nos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbico (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias de protocolo.

Dias	7	15	30	60
Variáveis				
Triglicerídeos (mg/dl)				
C	106±5,8	108±8,1	106±7,4	122±7,6 †
F	102±1,6	114±5,9	138±8,5§†	147±7,0†
FT	108±8,8	115±3,5	121±9,0	136±3,0†
Glicemia (mg/dl)				
C	105±0,8	105±3,0	104±5,9	104±3,5
F	107±5,9	113±5,9§	103±2,6	106±4,2
FT	113±4,0	107±2,9§	95±7,4	90±2,5*
ITT (%/min)				
C	3,9±0,26	4,2±0,17	4,1±0,31	3,9±0,33
F	3,8±0,25	3,7±0,19	2,9±0,20§†	2,8±0,28§†
FT	4,7±0,20#§	4,8±0,04#§	3,9±0,25#	4,2±0,34#

Valores representam média ± erro padrão da média. * p<0,05 vs. 7 dias no mesmo grupo; † p< 0,05 vs. 7 e 15 dias no mesmo grupo; ‡ p< 0,05 vs. 7,15 e 30 dias no mesmo grupo; § p< 0,05 vs. grupo C no mesmo tempo; # p< 0,05 vs. grupo F no mesmo tempo.

Tabela 3: Variáveis hemodinâmicas nos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbio (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias de protocolo.

Dias	7	15	30	60
Variáveis				
Pressão arterial diastólica (mmHg)				
C	83±5,8	90±3,4	87±5,0	93±2,4 *
F	83±5,1	90±2,2	91±2,7	101±2,3*
FT	82±2,4	89±1,9	98±1,1	96±4,4*
Pressão arterial sistólica (mmHg)				
C	112±4,4	120±4,3	122±3,1	126±3,9
F	119±6,5	126±3,4§	130±3,7	136±4,3
FT	119±4,2	117±2,7§	126±3,5	120±2,4
Pressão arterial média (mmHg)				
C	98±4,6	106±3,8	106±3,9	110±0,5 *
F	100±5,2	108±3,2§	108±3,7	117±2,5*
FT	100±3,1	103±2,3§	113±1,4	110±2,6*
Frequência cardíaca (bpm)				
C	412±12,3	376±22,7	404±34,1	403±80,5
F	441±22,4	409±11,8	358±21,1	370±10,6
FT	451±7,7	405±11,6	352±6,9	337±8,9

Valores representam média ± erro padrão da média. * p<0,05 vs. 7 dias no mesmo grupo; † p< 0,05 vs. 7 e 15 dias no mesmo grupo; ‡ p< 0,05 vs. 7,15 e 30 dias no mesmo grupo; § p< 0,05 vs. grupo C no mesmo tempo; # p< 0,05 vs. grupo F no mesmo tempo.

Tabela 4: Modulação autonômica cardiovascular nos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbio (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias de protocolo.

Dias	7	15	30	60
Variáveis				
VAR-IP (ms²)				
C	44,3±14	38,1±14,8	53,1±13,3	61,0±28,0
F	22,5±6 §	31,6±3,5	41,7±9,1§	54,6±8,8*
FT	47,0±15#	54,5±9,8	75,3±10,9§	101,8±8,30#§‡
RMSSD (ms)				
C	5,7±1,2	4,7±0,7	6,6±0,9	8,6±2,3†
F	5,3±0,8	6,1±0,6	5,6±0,9	5,9±0,7§
FT	7,6±2,2	7,4±0,5	7,0±0,4	10,8±1,2#‡
LF/HF				
C	0,10±0,09	0,15±0,04	0,16±0,04	0,13±0,03
F	0,12±0,05	0,24±0,06 §	0,26±0,07§	0,22±0,05§
FT	0,09±0,03	0,13±0,03	0,19±0,04	0,17±0,02
VAR-PAS (mmHg²)				
C	16,6±3,2	12,3±3,5	17,6±1,6	18,5±2,2
F	26,3±2,2 §	25,9±1,7§	32,8±3,6§†	34,1±5,3§
FT	15,5±3,7 #	14,9±3,4#	20,7±2,8#	22,7±1,5#†
LF-PAS (mmHg²)				
C	3,68±0,3	3,40±0,5	3,78±0,1	3,95±0,3
F	5,14±0,4§	5,35±0,3§	6,52±0,3§†	5,36±0,3§*
FT	3,82±0,40#	3,73±0,39#	4,25±0,42#	3,97±0,61†#
Índice α (ms/mmHg)				
C	0,6±0,05	0,7±0,05	0,7±0,15	0,7±0,05
F	0,3±0,05§	0,4±0,03§	0,5±0,09§	0,4±0,01§
FT	0,5±0,07#	0,7±0,17#	0,7±0,11#	0,9±0,06§#‡

Valores representam média ± erro padrão da média. Variabilidade do intervalo de pulso (VAR IP), raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre os intervalos de pulso sucessivos (RMSSD), balanço simpato-vagal (LF/HF), variabilidade da pressão arterial sistólica (VAR-PAS), Banda de baixa frequência da pressão arterial sistólica (BF-PAS) e Índice alpha. * p<0,05 vs. 7 dias no mesmo grupo; † p< 0,05 vs. 7 e 15 dias no mesmo grupo; ‡ p< 0,05 vs. 7,15 e 30 dias no mesmo grupo; § p< 0,05 vs. grupo C no mesmo tempo; # p< 0,05 vs. grupo F no mesmo tempo.

Tabela 5: Perfil inflamatório nos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbio (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias de protocolo.

Variáveis	Dias	7	15	30	60
TNF (pg/mL)					
C		23,5±0,6	26,1±1,0	25,5±3,1	22,2±4,1
F		20,1±1,8	24,1±2,7	41,4±6,1§†	58,6±7,2‡§
FT		18,6±2,0	20,6±2,1	27,1±3,4#*	28,9±1,7#†
IL6 (pg/mL)					
C		88,4±10,7	77,0±6,0	80,0±17,6	86,4±25,7
F		90,4±9,3	97,8±4,3	129,2±8,0†	166,0±20,1§‡
FT		86,0±7,1	93,8±4,4	119,2±9,7	136,4±6,3#
IL10 (pg/mL)					
C		39,7±1,6	36,8±22,7	38,8±5,7	35,4±8,2
F		37,3±3,7	38,4±11,8	45,7±1,9	54,0±2,8§‡
FT		34,0±2,7	39,2±11,6	55,3±4,9#§	77,0±8,3 #§‡

Valores representam média ± erro padrão da média. Fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 6 (IL6) e interleucina 10 (IL10). * p<0,05 vs. 7 dias no mesmo grupo; † p<0,05 vs. 7 e 15 dias no mesmo grupo; ‡ p<0,05 vs. 7,15 e 30 dias no mesmo grupo; § p<0,05 vs. grupo C no mesmo tempo; # p<0,05 vs. grupo F no mesmo tempo.

Tabela 6: Lipoperoxidação, oxidação de proteínas, enzimas antioxidantes e balanço redox da glutationa nos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbio (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias de protocolo.

Variáveis	Dias	7	15	30	60
QL (cps/mg proteína)					
C		443±86	450±67	296±83	251±18 †
F		507±84	427±154	669±93§	513±49 §
FT		333±116	318±110	301±105#	187±34‡#
Carbonilas (nmol/mg proteína)					
C		3,41±0,36	6,45±0,69	3,69±0,39	2,69±0,26
F		5,76±1,16§	4,01±0,45§	5,07±0,58§	4,42±0,47§
FT		2,11±0,35§	2,81±0,45#	2,46±0,26§	3,19±0,27*#
Catalase (nmol/ mg proteína)					
C		1,49±0,58	0,65±0,03	1,11±0,24	1,18±0,11
F		1,38±0,16	1,68±0,07	1,48±0,08	2,34±0,29§
FT		2,51±0,30#	2,00±0,30§	2,07±0,07§	5,79±0,91§#‡
SOD (USOD/mg proteína)					
C		19,7±1,3	17,6±22,7	21,1±2,4	20,5±1,9
F		8,7±0,5§	9,5±11,8§	9,0±0,3§	10,5±1,8§
FT		18,7±1,4#	16,5±11,6#	16,2±0,6#	26,0±1,2#‡
GSH/GSSG					
C		5,48±0,98	5,58±0,69	4,99±0,57	4,87±0,73
F		3,14±0,50§	3,29±0,24§	2,76±0,20§	2,63±0,23§
FT		4,19±0,25§#	4,21±0,53§#	4,11±0,77#	6,16±0,52§#‡


Valores representam média ± erro padrão da média. Lipoperoxidação (QL), proteínas oxidadas, catalase, superóxido dismutase (SOD) e razão GSH/GSSG. * p<0,05 vs. 7 dias no mesmo grupo; † p< 0,05 vs. 7 e 15 dias no mesmo grupo; ‡ p< 0,05 vs. 7,15 e 30 dias no mesmo grupo; § p< 0,05 vs. grupo C no mesmo tempo; # p< 0,05 vs. grupo F no mesmo tempo.

Tabela 7: Expressão Proteica de NADPH oxidase e NF- κ B nos grupos controle (C), frutose (F) e frutose+treinamento físico aeróbio (FT) no curso temporal de 7, 15, 30 e 60 dias de protocolo.

Dias	7	15	30	60
Variáveis				
p47 phox (UA)				
C	0,004±0,002	0,006±0,001	0,003±0,001	0,004±0,001
F	0,005±0,001	0,004±0,001	0,008±0,001 §†	0,008±0,001 §
FT	0,004±0,001	0,004±0,001	0,003±0,0005#	0,003±0,0005#
NF-kB (UA)				
C	0,024±0,005	0,028±0,003	0,026±0,007	0,030±0,007
F	0,030±0,003 §	0,029±0,006	0,061±0,006 §†	0,042±0,007 §*
FT	0,012±0,005#	0,016±0,007 §#	0,009±0,007#	0,008±0,003#

Valores representam média \pm erro padrão da média. subunidade p47 phox da NADPH oxidase e fator nuclear kappa beta (NF-kB). * p<0,05 vs. 7 dias no mesmo grupo; † p<0,05 vs. 7 e 15 dias no mesmo grupo; ‡ p<0,05 vs. 7,15 e 30 dias no mesmo grupo; § p<0,05 vs. grupo C no mesmo tempo; # p<0,05 vs. grupo F no mesmo tempo.

6.2 Parecer do CEUA

UNINOVE

Universidade Nove de Julho

Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nºAN0011.2015

Título do Projeto: Curso temporal das alterações neuroimunes induzidas pelo consumo crônico de frutose: papel do treinamento físico aeróbio
Orientador: Kátia De Angelis

Objetivos:

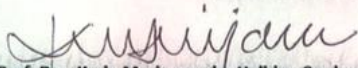
O objetivo do presente estudo será avaliar o curso temporal (7, 14, 30 e 60 dias) do desenvolvimento de alterações cardiometabólicas induzidas pela sobrecarga de frutose em ratos Wistar, bem como os efeitos do treinamento físico aeróbio nesta condição.

Apresentado a este Comitê para análise ética, foi considerado:

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: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEUA-UNINOVE, o relatório final sobre a pesquisa (Lei Procedimentos para Uso Científico de Animais – Lei N° 11.794-8 de outubro de 2008).

São Paulo, 29 de maio de 2015


Prof. Dra. Karin Marie van der Heijden Cardenes
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho

6.3 Artigos aceitos ou submetidos durante o período de doutoramento

Brazilian Journal of Medical and Biological Research (2015) 48(6): 523-527, <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20154387>
ISSN 1414-431X Short Communication

Dynamic resistance training decreases sympathetic tone in hypertensive ovariectomized rats

G.L. Shimojo¹, R.K. Palma¹, J.O. Brito¹, I.C. Sanches¹, M.C. Irigoyen² and K. De Angelis¹

¹Laboratório de Fisiologia Translacional, Programa de Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho, São Paulo, SP, Brasil

²Instituto do Coração, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Abstract

The aim of this study was to investigate the effects of resistance exercise training on hemodynamics and cardiac autonomic control in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. 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 (5 days/week, 8 weeks) at 40-60% maximal load. Direct arterial pressure was recorded. Vagal and sympathetic tones were measured by heart rate (HR) responses to methylatropine (3 mg/kg, *iv*) and propranolol (4 mg/kg, *iv*). Ovariectomy resulted in additional increases in blood pressure in hypertensive rats and was associated with decreased vagal tone. Resistance exercise trained rats had lower mean arterial pressure than untrained rats (RTHO: 159 ± 2.2 vs SHO: 177 ± 3.4 mmHg), as well as resting bradycardia (RTHO: 332 ± 9.0 vs SHO: 356 ± 5 bpm). Sympathetic tone was also lower in the trained group. Moreover, sympathetic tone was positively correlated with resting HR ($r = 0.7$, $P < 0.05$). The additional arterial pressure increase in hypertensive rats caused by ovarian hormone deprivation was attenuated by moderate-intensity dynamic resistance training. This benefit may be associated with resting bradycardia and reduced cardiac sympathetic tone after training, which suggests potential benefits of resistance exercise for the management of hypertension after ovarian hormone deprivation.

Key words: Resistance exercise training; Menopause; Hypertension; Sympathetic tone; Blood pressure

HIGHLIGHTED TOPIC | Aging and Exercise

Resistance or aerobic training decreases blood pressure and improves cardiovascular autonomic control and oxidative stress in hypertensive menopausal rats

Renata K. da Palma,¹ Ivana C. Moraes-Silva,² Danielle da Silva Dias,¹ Guilherme L. Shimojo,¹ Filipe F. Conti,¹ Nathalia Bernardes,^{1,2} Catarina A. Barboza,² Iris C. Sanches,¹ Alex Sander da Rosa Araújo,³ Maria-Cláudia Irigoyen,² and Kátia De Angelis¹

¹Laboratory of Translational Physiology, Universidade Nove de Julho, Sao Paulo, Brazil; ²Heart Institute, University of Sao Paulo Medical School, Sao Paulo, Brazil; and ³Physiology Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Submitted 9 February 2016; accepted in final form 20 June 2016

da Palma RK, Moraes-Silva IC, Dias DS, Shimojo GL, Conti FF, Bernardes N, Barboza CA, Sanches IC, da Rosa Araújo AS, Irigoyen MC, De Angelis K. Resistance or aerobic training decreases blood pressure and improves cardiovascular autonomic control and oxidative stress in hypertensive menopausal rats. *J Appl Physiol* 121: 1032–1038, 2016. First published June 23, 2016; doi:10.1152/jappphysiol.00130.2016.—We investigated whether resistance training (RT) vs. aerobic training (AT) differentially impacts on arterial pressure and related mechanisms in ovariectomized spontaneously hypertensive rats (SHRs). Female SHRs were ovariectomized and assigned to one of the following groups: sedentary, AT, or RT; sham sedentary SHR were used as control group. AT was performed on a treadmill, whereas RT was performed on a vertical ladder. Both exercise protocols were performed for 8 wk, 5 days/wk. Arterial pressure, baroreflex sensitivity, autonomic modulation, and cardiac oxidative stress parameters (lipid peroxidation, protein oxidation, redox balance, NADPH oxidase, and antioxidant enzymes activities) were analyzed. Ovariectomy increased mean arterial pressure (~9 mmHg), sympathetic modulation (~40%), and oxidative stress in sedentary rats. Both RT and AT reduced mean arterial pressure (~20 and ~8 mmHg, respectively) and improved baroreflex sensitivity compared with sedentary ovariectomized rats. However, RT-induced arterial pressure decrease was significantly less pronounced than AT. Lipid peroxidation and protein oxidation were decreased while antioxidant enzymes were increased in both trained groups vs. sedentaries. The reduced glutathione was higher after AT vs. other groups, whereas oxidized glutathione was lower after RT vs. AT. Moreover, sympathetic and parasympathetic modulations were highly correlated with cardiac oxidative stress parameters. In conclusion, both RT and AT can decrease arterial pressure in a model of hypertension and menopause; although, at different magnitudes this decrease was related to attenuated autonomic dysfunction in association with cardiac oxidative stress improvement in both exercise protocols.

resistance training; aerobic training; menopause; hypertension; oxidative stress

NEW & NOTEWORTHY

Although in a different magnitude, dynamic resistance training (RT) is able to decrease blood pressure in hypertensive menopausal rats compared with aerobic training. Mechanisms related to cardiovascular autonomic control and cardiac oxidative stress were associated to this decrease. Therefore, menopausal individuals with hypertension may be benefited by not only the osteomuscular benefits of RT but also by improved mechanisms of blood pressure control, which in association with aerobic training may account for cardiovascular risk prevention.

HYPERTENSION IS A MAJOR RISK FACTOR in the development of cardiovascular disease, particularly for postmenopausal women, suggesting that ovarian hormones play a key role in blood pressure regulation (27, 40). Relatively large populations of women are postmenopausal with hypertension and present high cardiovascular risk (32a). Chronically increased blood pressure is a pivotal stimulus to the dysfunction of cardiovascular autonomic control parameters, as is blood pressure variability and baroreflex sensitivity, thus contributing to organ damage (45).

Oxidative stress has also been implicated in the pathophysiology of hypertension, as the imbalance between anti- and prooxidants is a major element of vascular impairment, thus leading to blood pressure elevation (41). Additionally, oxidative stress seems to play a mechanistic role in baroreflex dysfunction (23, 30), another important mechanism of blood pressure regulation. In line with this information, other studies have demonstrated that estrogen deprivation induces endothelial dysfunction and autonomic impairment associated with increased oxidative stress (10, 24). Altogether, these impaired mechanisms can contribute to the onset of hypertension in menopause.

On the other hand, aerobic exercise is well known for inducing beneficial adaptations, including arterial pressure (AP) decrease, cardiac sympathetic modulation, and oxidative

This Provisional PDF corresponds to the article as it appeared upon acceptance. Fully formatted PDF english version will be made available soon.

Effects of aerobic exercise training in animal models of hypertension.

MTP&RehabJournal 2015, 13:007
doi:10.17784/mtprehabjournal.2015.13.307

Renata Kelly da Palma
Christiane Malfitano
Guilherme Lemos Shimojo
Iris Callado Sanches
Kátia De Angelis

ISSNe 2236-5435

Article type Review

Submission date 12 May 2015

Acceptance date 3 August 2015

Publication date 15 August 2015

Article URL <http://www.submission-mtprehabjournal.com>

<http://www.mtprehabjournal.com>

Postprandial Vagal Activation Controls Glycemia and inflammation in Sepsis with Diabetes.

Biju Joseph¹, Guilherme Shimojo¹, Zhifeng Li¹, Roshan Shah¹,
Alexandre Kanashiro², Helio C. Salgado³ & Luis Ulloa^{1,4@}.

¹Department of Surgery, Rutgers-New Jersey Medical School, Newark, NJ 07103, USA. ²Department of Physiology, Federal University of São Carlos (UFSCAR), São Carlos, SP 13565-905, Brazil. ³Department of Physiology, Medical School - University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil. ⁴Center for Immunity and Inflammation, Rutgers-New Jersey Medical School, Newark, NJ 07103, USA.

@ Correspondence to: Luis Ulloa (Luis.Ulloa@Rutgers.edu)

Running title: *Dopaminergic control of diabetic sepsis.*

Acknowledgements.

GS is supported by the CAPES Brazilian Foundation PDSE - 88881.132328/2016-01. Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP#11/20343-4. LU is supported by the NIH R01-GM114180, Eastern Scholarship JZ2016010, and NSFC #81774429.

Financial interests. The authors declare no competing financial interest

Abstract

Many experimental treatments failed in clinical trials for sepsis, a leading cause of death in hospitals, because they focused on the immune responses of healthy animals that did not mimic the metabolic settings of septic patients. Here, we report that metabolic fasting increases systemic inflammation and worsens survival in experimental sepsis. Surgical vagotomy abrogates this effect rendering fasted and fed animals with similar inflammatory responses and survival in sepsis. Conversely, vagal electrical stimulation is more effective in attenuating inflammation in fasted animals, which have lower glycemia and vagal tone. Glucose activates vagal electrical potential and attenuates systemic inflammation without affecting blood pressure. In turn, vagal stimulation attenuates hyperglycemia by inducing insulin in the pancreas. Dopaminergic-agonists attenuate hyperglycemia, systemic inflammation and rescue diabetic mice from polymicrobial peritonitis. These results suggest that dopaminergic agonists may provide therapeutic advantages for treating hyperglycemia and inflammation in diabetic sepsis.

From: naturecommunications@nature.com <naturecommunications@nature.com>
Sent: Friday, January 5, 2018 5:22 AM
To: Guilherme Shimojo
Subject: NCOMMS-18-00342 Receipt of New Paper by Nature Communications

Dear Dr. Shimojo,

Please note that you are listed as a co-author on the manuscript "Postprandial Vagal Activation Controls Glycemia and inflammation in Sepsis with Diabetes." (reference number: NCOMMS-18-00342), which was recently submitted to Nature Communications.

The corresponding author is solely responsible for communicating with the journal and managing communication between co-authors. Please contact the corresponding author directly with any queries you may have related to this manuscript.

You can now use a single sign-on for all your accounts, view the status of all your manuscript submissions and reviews, access usage statistics for your published articles and download a record of your refereeing activity for the Nature journals. Please check your account regularly and ensure that we have your current contact information.

In addition, Springer Nature encourages all authors and reviewers to associate an Open Researcher and Contributor Identifier (ORCID) to their account. ORCID is a community-based initiative that provides an open, non-proprietary and transparent registry of unique identifiers to help disambiguate research contributions. If your manuscript is published, linkage of your ORCID account will allow your article to be automatically added to your ORCID profile upon publication.

<http://mts-ncomms.nature.com/cgi-bin/main.plex>

Many thanks,
Platform Support Helpdesk
Springer Nature

**FAMILIAL HISTORY OF HYPERTENSION-INDUCED IMPAIRMENT ON
HEART RATE VARIABILITY WAS NOT OBSERVED IN STRENGTH
TRAINED SUBJECTS**

**Fernando Alves Santa ROSA, MSc^a; Guilherme Lemos SHIMOJO, MSc^a;
Michelle SARTORI, PhD^b; Alexandre Correia ROCHA, MSc^c; Juliana
FRANCICA, PhD^c; Julia PAIVA, BSc^a; Maria-Cláudia IRIGOYEN, MD, PhD^b;
Kátia DE ANGELIS, PhD^{a,d}**

^aLaboratory of Translational Physiology, Universidade Nove de Julho
(UNINOVE), São Paulo, Brazil; ^bHeart Institute, University of São Paulo, Medical
School, Sao Paulo, Brazil; ^cSão Judas Tadeu University, Sao Paulo, Brazil;
^dDepartment of Physiology, Federal University of Sao Paulo, São Paulo, Brazil.

Running title: Strength Training in Offspring of Hypertensives

Nove de Julho University - Science Rehabilitation Program, Rua Vergueiro
235/249 01504 001 – São Paulo – SP Fone: 55 11 3385 9154

@Correspondence to: Katia De Angelis (prof.kangelis@yahoo.com.br)

Financial interests. The authors declare no competing financial interests.

Abstract

Family history of hypertension is an important predictive factor for hypertension and is associated with hemodynamic and autonomic abnormalities. Previous studies reported that strength training may reduce arterial blood pressure (AP), as well as improve heart rate variability (HRV). However, the benefits of strength training in the offspring of hypertensive parents have not been fully evaluated. Here, we analyze the impact of strength training on hemodynamics and autonomic parameters in offspring of hypertensives. We performed a cross-sectional study with sedentary or physically active offspring of normotensives (S-ON and A-ON) or hypertensives (S-OH and A-OH). We recorded RR interval for analysis of heart rate variability (HRV). AP was similar between groups. Sedentary offspring of hypertensives presented impairment of total variance of RR interval, as well as increase in cardiac sympathovagal balance (S-OH: 4.2 ± 0.7 vs. S-ON: 2.8 ± 0.4 and A-ON: 2.4 ± 0.1). In contrast, strength trained group with family history of hypertension did not showed such dysfunctions. In conclusion, sedentary offspring of hypertensives, despite displaying no changes in AP, showed reduced HRV, reinforcing the hypothesis that autonomic dysfunctions have been associated with higher risk of hypertension onset. Our findings demonstrate that strength trained offspring of hypertensives did not present impaired HRV, thus reinforcing the benefits of an active lifestyle in the prevention of early dysfunctions associated with the onset of hypertension in predisposed populations.

Journal Office

May 8, 2018 at 10:05 AM

JO

BJMBR - 7310.R2 - Aceito no merito científico

[Details](#)To: g.shimojo13@gmail.com, Cc: fernandoasr78@yahoo.com.br, gui.edufisica@hotmail.com, michellesartori@hotmail.com & 5 more

08-May-2018

Prezada Dra. Katia De Angelis,

Temos a satisfação de informar que seu manuscrito "7310.R2 - FAMILIAL HISTORY OF HYPERTENSION-INDUCED IMPAIRMENT ON HEART RATE VARIABILITY WAS NOT OBSERVED IN STRENGTH TRAINED SUBJECTS" foi aceito quanto ao merito científico para publicação no Brazilian Journal of Medical and Biological Research.

O processo de publicação do trabalho depende do pagamento de "Publication Charge", e para tanto 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.

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 NÃO SERÁ POSSÍVEL FAZER CANCELAMENTO OU SUBSTITUIÇÃO DE NENHUM DESTES DOCUMENTOS. Esta medida foi adotada por exigências de órgãos financiadores (Fapesp, CNPq, Capes, Universidades federais, estaduais, etc.).

IMPORTANTE: Informamos que o trabalho será verificado e preparado pelo Editor de Estilo e o texto corrigido e eventuais questões serão enviadas a V.Sa. via e-mail. A DATA DE ACEITAÇÃO DEFINITIVA SERÁ INSERIDA NO TEXTO SOMENTE APOS o pagamento da Publication Charge e APOS a devolução do texto corrigido pelo Editor de Estilo. Atrasos eventuais serão descontados da data de submissão do trabalho. Neste momento será providenciada a preparação da Prova Gráfica que será lida pela Redatora da revista e enviada para aprovação dos autores.

Estamos a disposição para esclarecer qualquer questão adicional, através do e-mail (bjournal@terra.com.br) ou telefone (16) 3630-2778, (16) 3315-9120 ou (16) 3315-3173 (Sr. Reinaldo).

Contamos com sua compreensão e colaboração. POR FAVOR ACUSE O RECEBIMENTO DESTA EMAIL.

Atenciosamente,

Dr. Eduardo M. Rego
Editor
Brazilian Journal of Medical and Biological Research

Vagal induction of dopamine contributes to exercise control of inflammation.

Guilherme Lemos Shimojo^{1,2}, Biju Joseph¹, Roshan Shah¹, Geber Pena¹, Fernanda M. Consolim-Colombo^{2,3}, Kátia De Angelis^{2,4} & Luis Ulloa^{1,5@}.

¹Department of Surgery, Rutgers-New Jersey Medical School, Newark, NJ 07103, USA. ²Nove de Julho University (UNINOVE), Sao Paulo, Brazil; ³Hypertension Unit, Heart Institute (INCOR) School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. ⁴Department of Physiology, Federal University of Sao Paulo (UNIFESP), Brazil. ⁵Center for Immunity and Inflammation, Rutgers-New Jersey Medical School, Rutgers Biomedical Health Sciences, Newark, NJ 07103, USA.

@Correspondence to: Luis Ulloa (Luis.Ulloa@Rutgers.edu).

Running title: Exercise control of inflammation

Acknowledgements. GS is supported by the CAPES Brazilian Foundation PDSE - 88881.132328/2016-01. LU is supported by the NIH R01-GM114180, Eastern Scholarship JZ2016010, and NSFC #81774429.

Financial interests. The authors declare no competing financial interests.

Abstract

Physical exercise is one of the most important factors improving quality of life, but it is not a feasible option for patients with morbidity or limited mobility. Most studies focus on high-intensity or long-term exercise that causes physiological stress or adaptive physiological mechanisms. Here, we report that one session of moderate-intensity exercise attenuates inflammation and organ dysfunction through vagal induction of dopamine. One hour of swimming prevented hypokalemia, hypocalcemia, attenuated serum levels of inflammatory cytokines, increased anti-inflammatory cytokines (TGF β 1 and IL10) but affected neither IL6, resting glycemia nor glycemic responses to endotoxin. Exercise attenuated serum TNF levels by inhibiting its production in the spleen through a mechanism mediated by the subdiaphragmatic vagus nerve but independent of the splenic nerve. Exercise increased serum levels of dopamine, and adrenalectomy prevented the potential of exercise to induce dopamine and attenuate TNF. Dopaminergic D1-agonist, fenoldopam, inhibited TNF production in splenocytes. Conversely, D1-antagonist, butaclamol, prevented exercise control of TNF. These results indicate that vagal induction of dopamine in the adrenal glands contributes to the anti-inflammatory potential of physical exercise.

Brain, Behavior, and Immunity

Inbox -...3@gmail.com June 11, 2018 at 6:27 PM



Submission Confirmation

[Details](#)

To: Luis.Ulloa@rutgers.edu, Cc: g.shimojo13@gmail.com, & 4 more

Reply-To: Brain, Behavior, and Immunity

2014 IMPACT FACTOR: 5.889 / 2014 ISI RANKING: top 11% of all neuroscience journals (out of 252 neuroscience journals) and top 14% for all immunology journals (out of 148)

Re: Vagal induction of dopamine contributes to exercise control of inflammation.
Full Length Article

Dear Dr. Ulloa,

Your manuscript entitled "Vagal induction of dopamine contributes to exercise control of inflammation." has been received by Brain, Behavior, and Immunity. You may check on the review progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. You should receive a decision letter on the suitability of your manuscript for publication within 30 days. The URL is <https://ees.elsevier.com/bbi/>.

Your username is: Luis.Ulloa@rutgers.edu

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/bbi/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your research findings to Brain, Behavior, and Immunity.

Best regards,

Carmine M. Pariante
Professor of Biological Psychiatry and NIHR Senior Investigator Award
Stress, Psychiatry and Immunology Lab, Institute of Psychiatry, Psychology and Neuroscience, King's College London
G.32.01, The Maurice Wohl Clinical Neuroscience Institute, Cutcombe Road, London, SE5 9RT
Editor-in-Chief
Brain, Behavior, and Immunity
<http://www.elsevier.com/locate/ybrbi/>
<http://ees.elsevier.com/bbi/>

COMBINED AEROBIC AND RESISTANCE EXERCISE TRAINING IMPROVE
HYPERTENSION ASSOCIATED WITH MENOPAUSE

**Guilherme Lemos SHIMOJO¹, Danielle da Silva DIAS¹, Christiane
MALFITANO¹, Iris Callado SANCHES³, Susana LLESUY⁴, Luis ULLOA⁵,
Maria-Claudia IRIGOYEN², Kátia DE ANGELIS^{1*}**

¹Laboratory of Translational Physiology, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, Brazil; ²Heart Institute, University of São Paulo, Medical School, São Paulo, Brazil; ³São Judas Tadeu University, São Paulo, Brazil; ⁴Departamento de Química Analítica y Físicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina; ⁵Center for Immunology and Inflammation, Department of Surgery, Rutgers-New Jersey Medical School, Rutgers University, Newark, USA; ⁶ Department of Physiology, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

COMBINED TRAINING IMPROVES HYPERTENSION IN MENOPAUSE

***Correspondence to:** Kátia De Angelis, PhD.

Universidade Nove de Julho - Science Rehabilitation Program.

Rua Vergueiro, 235, Zip Code: 01504001

São Paulo, SP, Brazil.

Fone: 55 11 3385-9154

Fax: 55 11 3385-9154

E-mail: prof.kangelis@yahoo.com.br

Frontiers Physiology

Inbox - iCloud April 10, 2018 at 3:22 PM

FP

Frontiers: Your manuscript submission - 384466

To: Guilherme Shimojo,

Reply-To: Frontiers Physiology

Dear Dr Shimojo,

We are pleased to inform you that we have received the manuscript ""COMBINED AEROBIC AND RESISTANCE EXERCISE TRAINING IMPROVES HYPERTENSION ASSOCIATED WITH MENOPAUSE"" to be considered for publication in Frontiers in Physiology, section Exercise Physiology.

You can access the review forum and track the progress of your manuscript using the following link:

<http://www.frontiersin.org/Journal/MySubmission.aspx?stage=100>

If you have already created a Frontiers profile, please add this one as a secondary address, please add this one as a secondary email to your Frontiers profile following the link below:

<http://loop.frontiersin.org/settings/email>

For any questions on the above, you can contact support@frontiersin.org

You will receive a notification as soon as the interactive review forum is activated and you receive access the review reports. You will then be able to interact directly with the reviewers in the interactive review forum and also re-submit a revised manuscript.

Best Regards,

Your Frontiers in Physiology team

Frontiers | Editorial Office - Collaborative Peer Review Team

www.frontiersin.org

Avenue du Tribunal Fédéral 34, 1005 Lausanne, Switzerland

Office T 41 21 510 17 25