

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS UFSCar/UNESP**

ANDERSON DIOGO DE SOUZA LINO

**TREINAMENTO RESISTIDO E RESTRIÇÃO CALÓRICA: FATORES DE
PROTEÇÃO CARDIOVASCULAR EM RATAS OVARIETOMIZADAS**

**SÃO CARLOS – SP
2017**

ANDERSON DIOGO DE SOUZA LINO

TREINAMENTO RESISTIDO E RESTRIÇÃO CALÓRICA: FATORES DE PROTEÇÃO CARDIOVASCULAR EM RATAS OVARIECTOMIZADAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas. Área de concentração: FISILOGIA, sob orientação do Prof. Dr. Gilberto Eiji Shiguemoto.

**SÃO CARLOS – SP
2017**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Anderson Diogo de Souza Lino, realizada em 29/06/2017:

Prof. Dr. Gilberto Eiji Shiguemoto
UFSCar

Prof. Dr. Roberto Mario Machado Verzola
UFSCar

Prof. Dr. Richard Diego Leite
UFES

Prof. Dr. Fernando Fabrizzi
UNICEP

Prof. Dr. Cassio Mascarenhas Robert Pires
UNIARA

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese de doutorado a meus amados pais **Maria Aparecida Diogo Lino e Neube de Souza Lino**. A educação moral que me proporcionaram me fez ser forte, convicto daquilo que eu sempre quis. E por acreditar em meus ideais e, mesmo com a distância, nunca me deixaram fraquejar nos momentos difíceis. Agradeço todo o apoio que me deram em todos os caminhos que percorri.

À minha amada e companheira, **Noele Paschoini Leão Lino**. Sua dedicação e seu amor é que fizeram com que formássemos uma família feliz. Mesmo a distância sempre acreditou em meus sonhos e acabou por percorrer outros sonhos na mesma estrada, junto a mim. A ausência física acabou por nos aproximar e querer estar sempre juntos.

Ao meu querido irmão **Neube de Souza Lino Júnior** pelo apoio, as conversas, incentivo e a amizade.

Ao sempre paizão da natação **Henrique Carvalhaes Teixeira** que me ensinou a ser o profissional que sou, sem sua ajuda eu jamais teria dado o primeiro passo nesta jornada.

Aos meus irmãos de coração **Richard Diego Leite, Markus Vinícius Campos Souza, José Campanholi Neto e Danilo “Salsicha” Rodrigues Bertucci** pelo convívio neste período, por enfrentar juntos comigo todos os obstáculos no caminho, além da oportunidade de, mesmo a distância, mantermos uma grande família.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Por meio desta singela homenagem, agradeço aos Professores **Gilberto Eiji Shiguemoto** e **Sérgio Eduardo de Andrade Perez** pelo acolhimento no Laboratório de Fisiologia do Exercício, pela oportunidade de continuar meus estudos na Pós-Graduação, pelos ensinamentos fisiológicos, pela amizade, pelo convívio pessoal e, principalmente, pelas palavras de apoio e direcionamento. Foram pequenas ações de grandes homens que contribuíram para minha formação.

Agradecimento especial a Noele Paschoini Leão Lino, novamente, por sempre me apoiar nas aventuras de nossas vidas, e por ser uma pessoa amável doce e gentil, demonstrando uma força enorme em seu coração, e por me auxiliar sempre, em tudo.

Agradeço ao Professor Júlio Tirapegue pela oportunidade de confraternização entre Pós-graduandos de tão distintas Universidades (USP/USFCar) que me proporcionou tanto aprendizado.

Agradeço de coração à grande amiga Professora Daiana Vianna que acreditou em mim e possibilitou que eu pudesse percorrer o caminho do conhecimento com pessoas tão brilhantes, fazendo com que todos do grupo se tornassem bons amigos.

Ao amigo Professor Vilmar Baldissera pelo incentivo e confiança em mim depositados. Cada oportunidade foi um pouco de fogo temperando o aço de meu espírito.

A todos os professores, da pré-escola à Pós-Graduação. Todos ajudaram na formação, não de um doutor, mas de um ser humano curioso e ávido a descobertas.

Ao meu irmão de ciência, Gilberto Moraes, por despertar em mim a vontade de sempre alcançar o conhecimento. Obrigado pelo crescimento científico e didático, os momentos de conversas e principalmente por me mostrar a emoção da viagem pela ciência.

A todos os Pós-graduandos e Professores que me abriram as portas de seus laboratórios e me mostraram que a ciência deve ser feita com amor e união entre pesquisadores das mais diferentes áreas.

SEREI ETERNAMENTE GRATO A VOCÊS.

MUITO OBRIGADO!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Nossa Senhora Aparecida e a Jesus Cristo, por sempre me rodear de pessoas fantásticas, pelo dom maior da vida, pela saúde, inteligência e perseverança. Aos meus pais Maria Aparecida Diogo Lino e Neube de Souza Lino, e ao meu irmão Neube de Souza Lino Júnior, pelo carinho, compreensão e apoio.

À minha esposa Noele Paschoini Leão Lino pela ajuda, compreensão, apoio e acolhimento em sua vida.

A família que me conquistou, Gleidismar, Reinaldo e Maressa.

Aos irmãos de ciência e coração, Daiana Vianna, Leandro Ruffoni, Cecília Tardio, Marina Barbosa, obrigado pelo grande apoio na construção deste trabalho.

Aos irmãos de coração Guilherme Borges Pereira, Markus Vinícius Campos Souza e Rodrigo Ferro Magosso pelos ensinamentos e amizade.

Aos amigos Anabelle, Antônio Eduardo, Marcela Sene-Fiorese, Fernanda de Oliveira Duarte, Jorge Oishi Júnior (o estatístico), Amilton Vieira, pelos fofos juntos nos estudos.

À Professora Dra. Ana Cláudia G. O. Duarte, pela dupla oportunidade oferecida com a abertura da vaga para o mestrado, proporcionando o caminho ao doutorado.

A todos os **PROFESSORES** (as) que fizeram parte da minha formação.

Aos Técnicos de Laboratório que muito me ensinaram e auxiliaram neste projeto.

Às Professoras Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, Keico Okino Nonaka, Márcia Regina Cominetti e ao Professor Gerson J. Rodrigues pela oportunidade do convívio e participação no dia a dia dos laboratórios.

Aos amigos que mesmo não presentes durante este período contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

A todos de todos os laboratórios que me ensinaram muito sobre fisiologia.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

Agradeço a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio à pesquisa concedido – processo 2012/21087-4.

MUITÍSSIMO GRATO A TODOS!!!

EPÍGRAFE

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que
ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”
(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

Introdução: A hipertensão é um importante fator de risco para doenças cardiovasculares na menopausa. O treinamento resistido (TR) quando associado à dieta de restrição calórica (RC) têm demonstrado importantes efeitos sobre a pressão arterial e a artéria aorta, minimizando complicações decorrentes da menopausa, como a hipertensão arterial. **Objetivo:** O presente trabalho tem como objetivo investigar os efeitos da ovariectomia e das intervenções de TR, RC e da associação de ambos (TR+RC) sobre a pressão arterial sistólica, reatividade vascular aórtica, resposta insulínica, atividade da metaloproteinase de matriz 2 e alterações morfológicas em ratas *Holtzman*. **Materiais e métodos:** Cinquenta ratas *Holtzman* foram submetidas à cirurgia de ovariectomia e Sham; e distribuídas nos seguintes grupos (n=10): Sham-sedentária, Ovariectomizada-sedentária, treinamento resistido ovariectomizada, restrição calórica ovariectomizada e treinamento resistido associada à restrição calórica ovariectomizada. Os protocolos de TR e 30% de RC foram realizados por 13 semanas. A pressão arterial sistólica, teste de tolerância à insulina, reatividade vascular em anéis aórticos, atividade da metaloproteinase de matriz 2, análises morfológicas utilizando coloração de Hematoxilina e Eosina, Tricrômio de Masson e Picrosírius-red foram realizadas. **Resultados:** Observamos que a ovariectomia aumentou a pressão arterial sistólica, promoveu resistência à insulina, diminuiu a potência do relaxamento dependente e independente do endotélio e atividade da metaloproteinase de matriz 2, além de promover o remodelamento do vaso aórtico sobre a área da secção transversal, relação túnica média/lúmen, alterando o conteúdo de colágeno e fibras elásticas da artéria aorta. No entanto, a associação entre exercício e dieta e ambos separados, preveniram o aumento da pressão arterial sistólica, melhoraram a potência do relaxamento dependente e independente do endotélio, promoveram ativação da metaloproteinase de matriz 2, aumento da área da secção transversal da aorta, da relação túnica média/lúmen, além de promover a diminuição do conteúdo de colágeno e alteração das fibras elásticas na parede do vaso aórtico. **Conclusão:** O presente estudo mostrou que os efeitos do TR e RC, associados ou realizados separadamente, foram eficientes para melhorar os parâmetros clínicos e moleculares, prevenindo o surgimento da condição de hipertensão, melhorando a função vascular, a resposta insulínica, a atividade da metaloproteinase de matriz 2 e o remodelamento da aorta com aumento da complacência vascular, na condição de hipertensão induzida pela ovariectomia em ratas *Holtzman*.

Palavras-chave: Pressão arterial sistólica, hipertensão, ovariectomia, treinamento resistido, restrição calórica, tônus vascular, artéria, aorta.

ABSTRACT

Introduction: Hypertension is an important risk factor for menopausal cardiovascular disease. Resistance training (RT) when associated with the caloric restriction diet (CR) has been shown to have important effects on blood pressure and the aortic artery, minimizing complications due to menopause, such as hypertension. **Aim:** In this study, we investigated the effects of Ovariectomy and the Resistance Training, Caloric Restriction, and the association of both intervention in systolic blood pressure, matrix metalloproteinase-2 activity, aortic vascular reactivity and morphological alterations in ovariectomized *Holtzman* rats. **Material and methods:** Fifty female *Holtzman* rats were subjected to ovariectomy and Sham surgery and distributed into: Sham-sedentary; Ovariectomized-sedentary; Ovariectomized-Resistance Training; Ovariectomized-Caloric Restriction; and Ovariectomized-Resistance Training and Caloric Restriction groups. Resistance Training and 30% Caloric Restriction protocols were performed by 13-weeks. Systolic blood pressure, acetylcholine, and sodium nitroprusside induced relaxation of aortic rings; the hematoxylin-eosin stain used to highlight the aortas wall cross-sectional area and the matrix metalloproteinase-2 activity, insulin tolerance test and aorta vessel remodeling were analyzed. **Results:** We observed that, Ovariectomy increased systolic blood pressure, decreased potency in dependent and independent endothelium relaxation and matrix metalloproteinase-2 activity, promoted insulin resistance and aorta vessel remodeling in cross-sectional area, media to lumen ratio, collagen content and alter structure and elastic fibers of the vessel. However, the association of exercise and diet prevent the increase systolic blood pressure, improved the relaxation potency in dependent and independent endothelium relaxation, elevated the matrix metalloproteinase-2 activity, increased the aorta cross-sectional area, media to lumen ratio, decreased collagen content and alter elastic fibers in aorta vessel wall. **Conclusion:** Our study revealed that the association of resistance training and caloric restriction can prevent the hypertensive condition, improve vascular function, activate matrix metalloproteinase-2, and produce a beneficial hypertrophic remodeling with increased vascular compliance in ovariectomy in *Holtzman* rats.

Key-words: Systolic blood pressure, ovariectomy, resistance training, caloric restriction, vascular tonus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estágios do envelhecimento reprodutivo normal em mulheres	23
Figura 2 – Estrutura da artéria aorta	32
Figura 3 - Estrutura da MMP-2 em suas isoformas inativa de 72 kDa (Pró) e ativa de 64 kDa (Ativada)	43
Figura 4 - Distribuição dos grupos experimentais.....	52
Figura 5 - Estruturas e equipamentos utilizados no protocolo de TR	55
Figura 6 - Esquema da sessão de TR	56
Figura 7 - Esquema do desenho experimental e da medida da pressão arterial e frequência cardíaca	59
Figura 8 – Medida da tíbia por paquímetro digital.	60
Figura 9 - Separação das porções do ventrículo esquerdo (VE).	61
Figura 10. Análise da MMP-2 por Zimografia com gelatina	64
Figura 11. Kitt e placa de 96 poços para quantificação total de proteínas.	65
Figura 12 - Frequência cardíaca (FC) e pressão arterial sistólica (PAS)	72
Figura 13 - Índice de Lee	73
Figura 14 – Reatividade vascular	74
Figura 15 – Metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2)	75
Figura 16 - Análise morfométrica da parede vascular da aorta	77
Figura 17 – Porcentagem e conteúdo de colágeno I e III	78
Figura 18 – Estrutura da parede da artéria aorta torácica	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação da PA para adultos acima de 18 anos	22
Tabela 2 - Classificação das metaloproteinases de matriz e alguns substratos.	41
Tabela 3 - Exemplo da organização dos dias de treinamento resistido (TR).	54
Tabela 4 - Composição das rações utilizadas no experimento	57
Tabela 5 - Parâmetros ponderais, massa de tecidos, frequência cardíaca e valores do Kitt (%)	71

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍGLAS E SÍMBOLOS

1RM	Uma repetição máxima
Ach	Acetilcolina
ANOVA	Análise de variância
AST	Área de secção transversal
BH4	Tetraidrobiopterina
DC	Débito cardíaco
DHS	Ratos Dahl sensíveis ao sal
E2	17 β -estradiol (E2)
EDCF	Fator contrátil do endotélio
EDHF	Fator hiperpolarizantes derivados do endotélio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERK	Quinase regulada pela sinalização extracelular
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ET-1	Endotelina-1
FSH	Hormônio fólculo estimulante
GPGR	Receptores de estrogênio (ER- α e ER- β) acoplados à proteína G
H&E	Hematoxilina e Eosina
HTG	Ratos hereditários hipetrigliceridêmicos de Praga
IL	Interleucina
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corpórea
iNOS	Óxido nítrico sintase induzido
JNK	c-janus-n terminal quinase
L	Lúmen
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEC	Matriz extracelular
mmHg	Milímetros de mercúrio
MMP-2	Metaloproteinase de matriz 2
NAMS	North-America Menopause Society
nNOS	Óxido nítrico sintase neural
NO	Óxido nítrico
NPS	Nitroprussiato de sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
OVX	Ovariectomia
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PGL2	Prostaglandina 2
PKC	Proteína quinase C
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GTP	Guanosina trifosfato
RC	Restrição calórica
RE	Receptor de estrogênio (RE)
RE- β	Receptores de estrogênio do tipo beta
RE- α	Receptores de estrogênio do tipo alfa
RVP	Resistência vascular periférica
SED	Sedentário

SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SIRT1	Sirtuína do tipo 1
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase de matriz
TM	Túnica média
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TR	Treinamento resistido
TRH	Terapia de reposição hormonal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Epidemiologia de doenças cardiovasculares	18
2.2 Pressão arterial e hipertensão	19
2.3 Menopausa	23
2.4 Menopausa induzida (cirurgia)	24
2.5 Modelo animal para o estudo da menopausa	25
2.6 Hipertensão na menopausa	27
2.7 A artéria aorta e sua importância	31
2.8 Reatividade vascular	36
2.9 Estrogênio e disfunção endotelial	38
2.10 Remodelamento do vaso e metaloproteinase de matriz -2 (MMP-2)	40
2.11 Treinamento resistido	44
2.12 Restrição calórica	47
3. JUSTIFICATIVA	49
4. OBJETIVO GERAL	50
4.1 Objetivos específicos	50
5. MATERIAIS E MÉTODOS	51
5.1 Animais	51
5.2 Controle da massa corporal e consumo alimentar	51
5.3 Grupos experimentais	52
5.4 Procedimentos cirúrgicos da ovariectomia (OVX) e Sham	53
5.5 Protocolo de treinamento resistido em escada	54
5.5.1 Familiarização ao protocolo	54
5.5.2 Determinação da capacidade máxima de carregamento	54
5.5.3 Sessão de treinamento	55
5.6 Dietas e intervenção	56
5.6.1 Ração controle	56
5.6.2 Ração restrição calórica	57
5.6.3 Intervenção dietética	58
5.7 Avaliação hemodinâmica	58
5.8 Resistência à insulina	59

5.9 Eutanásia e coleta de tecidos	60
5.10 Coleta da aorta torácica, ventrículo esquerdo, útero e tibia	60
5.10.1 Artéria aorta	60
5.10.2 Ventrículo esquerdo	61
5.11 Reatividade vascular	61
5.11.1 Protocolo	62
5.12 Ensáio da atividade enzimática da Metaloproteinase de Matiz 2 (MMP-2) por Zimografia com gelatina	63
5.13 Quantificação de proteínas totais, Método BCA	64
5.14 Análise morfometria da aorta	65
5.14.1 Protocolo de coloração Hematoxilina e Eosina (H&E)	67
5.14.2 Protocolo de coloração Tricrômio de Masson.....	68
5.14.3 Protocolo de coloração Pricosírius-Red	68
5.15 TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	69
6. RESULTADOS.....	70
6.1 Parâmetros ponderais, massa do coração, do ventrículo esquerdo e Kitt	70
6.2 Frequência cardíaca e pressão arterial sistólica (PAS).....	71
6.3 Índice de Lee.....	72
6.4 Reatividade vascular	73
6.5 Ensaio da atividade da MMP-2.....	75
6.6 Análise morfométrica da parede vascular da aorta.....	76
6.7 Análise de conteúdo de colágeno.....	78
6.8 Análise da estrutura e fibras elásticas da parede da aorta.....	79
7. DISCUSSÃO	81
8. CONCLUSÃO	93
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
APÊNDICE A – PASSO A PASSO DA QUANTIFICAÇÃO DO COLÁGENO COM PRICOSÍRIUS-RED.....	111
ANEXO A - CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEAA).	118
ANEXO B - SOLUÇÕES PARA COLORAÇÃO DE TRICROMIO DE MASSON	119
ANEXO C – SOLUÇÕES PARA COLORAÇÃO DE PRICOSÍRIUS-RED.....	120

1. INTRODUÇÃO

O controle da pressão arterial em mulheres jovens, na pré-menopausa, é realizado, além de outros fatores, pelos hormônios estrogênicos endógenos que auxiliam no relaxamento vascular e no controle da pressão arterial sistólica (PAS). A diminuição desses hormônios, efeito normal em decorrência da menopausa, é acompanhada pela elevação da PAS em cerca de 41% das mulheres nesse período, contribuindo para a alta prevalência de hipertensão arterial nessa população (RECKELOFF, 2001; KHALIL, 2005; LIMA *et al.*, 2012). A hipertensão arterial é o principal fator de risco para doenças cardiovasculares (DCV). Atualmente, quase 75% das mulheres na menopausa nos Estados Unidos e 25% das mulheres adultas no mundo são hipertensas (YANES e RECKELOFF, 2011). Além disso, cerca de 7,6 milhões de pessoas morrem como resultado da hipertensão em todo o mundo (NELSON, 2008). Sendo constatado um aumento significativo nos custos dos serviços de saúde pública, tanto para o diagnóstico e prevenção, quanto para o tratamento de doenças e/ou complicações associadas à menopausa (AZAMBUJA *et al.*, 2008). Na hipertensão, as artérias perdem elasticidade, a parede vascular torna-se mais rígida, mais espessa, e apresenta acúmulo de tecido conjuntivo, como o conteúdo de colágeno (WAGENSEIL e MECHAM, 2012; KOHN *et al.*, 2015). A quantidade de fibras elásticas e de colágeno são importantes para conferir propriedades mecânicas adequadas à parede da aorta. Alterações desses constituintes, como o aumento de colágeno e diminuição de fibras elásticas, comprometeram a capacidade de distensão da artéria aorta (WAGENSEIL e MECHAM, 2012). Estes fatores promovem um aumento dos níveis pressóricos e da parede ventricular esquerda ocasionando doenças cardiovasculares (MAYET e HUGHES, 2003).

A artéria aorta é responsável por armazenar metade do volume de ejeção ventricular esquerda na fase sistólica. Na diástole as forças elásticas da parede aórtica propõem este volume para a circulação periférica. Isso resulta em um fluxo sanguíneo periférico contínuo normal (WAGENSEIL e MECHAM, 2012). Esta função da aorta proporciona uma redução da pós-carga ventricular esquerda, melhora o fluxo sanguíneo coronário e o relaxamento ventricular esquerdo. O comprometimento da função da aorta pode levar a um aumento da resistência elástica do vaso que resulta na elevação da pressão arterial em mulheres menopausadas, promovendo um quadro de hipertensão. A rigidez aórtica (COUTUNHO, 2014) e a disfunção endotelial estão associadas a essa elevação da PAS em humanos (KAESS *et al.*, 2012) e em ratas ovariectomizadas (TATCHUM-TALOM *et al.*, 2002). O nível de estrogênio tem sido associado à disfunção endotelial através da modulação de substâncias

vasoativas que controlam o tônus vascular (TATCHUM-TALOM *et al.*, 2002). Relacionado com o exposto acima, a resistência à insulina, observada em algumas mulheres na menopausa, altera o tônus vascular, contribuindo para a diminuição do relaxamento do vaso, mostrando que é um dos fatores de risco para hipertensão (JANUS *et al.*, 2016).

As enzimas proteolíticas, como a metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2), estão envolvidas na modificação das proteínas da matriz extracelular (MEC) (WAGENSEIL e MECHAM, 2012). A MMP-2 apresenta um efeito relevante no endotélio e no músculo liso, o que pode ser importante nos estágios iniciais do remodelamento vascular, a fim de manter o fluxo sanguíneo para vários órgãos (VISSE e NAGASE, 2003).

Para combater os efeitos nocivos da hipertensão em mulheres na menopausa, um estilo de vida saudável é amplamente recomendado, além do tratamento medicamentoso. Deste modo, o exercício tem sido apontado como uma ferramenta eficaz para o controle e prevenção das doenças cardiovasculares (CHOBANIAN *et al.*, 2003). Várias modalidades de exercícios foram estudados com o objetivo de melhorar o estado de saúde em mulheres na menopausa, como o exercício aeróbio, o resistido, e a combinação de ambos, conhecido como exercício concorrente, atuando com efeito hipotensor na pressão arterial (ASIKAINEN *et al.*, 2004). Podemos citar também que a prática de exercício físico pode contribuir de maneira considerável para reduzir os custos com medicamentos (BUTTAR *et al.*, 2005). Além disso, a dieta com restrição calórica (RC) tem sido estudada como uma alternativa para prevenção de doenças crônicas em humanos (OMODEI e FONTANA, 2011) bem como de promover diminuição da pressão arterial em roedores (SEYMOUR *et al.*, 2006). Em mulheres na pós-menopausa, o treinamento resistido (TR), quando associado à RC, tem se mostrado um importante instrumento para minimizar as complicações relacionadas à menopausa (BROCHU *et al.*, 2009).

A importância do uso de animais, em estudos experimentais, está em elucidar processos biológicos. Constata-se que a sua relevância se dá na validade translacional desses modelos animais, para discernir mecanismos de doenças humanas (SANDBERG, 2008; BRINTON, 2012). O desenho experimental com animais pode ajudar a descobrir e a entender, com segurança, novos procedimentos terapêuticos e prever resultados de intervenções e tratamentos não farmacológicos. Exemplo disso são os estudos que utilizam modelos genéticos para gerar hipertensão, tais como: ratos Zucker (FERESIN *et al.*, 2014), ratos hereditários hipertrigliceridêmicos de Praga (HTG) (KUNES *et al.*, 2002), ratos espontaneamente hipertensos (SHRs) (KOLETSKY, 1975; DE RICHELIEU *et al.*, 2005) e ratos Dahl sensíveis ao sal (DHS) (HINOJOSA-LABORDE *et al.*, 2004), além de estudos

com manipulação de dietas (WILLIAMS *et al.*, 2004; LEITE *et al.*, 2013). Entretanto, raros são os estudos que não utilizam animais modificados ou nenhuma administração de substâncias que possam gerar quadros clínicos. Assim, estudos em animais sem modificações genéticas podem apresentar resultados mais próximos ao observado em seres humanos na condição de menopausa. Nesse sentido, pode-se lançar mão da ovariectomia bilateral (OVX) em roedores fêmeas é um método utilizado para mimetizar, experimentalmente, o período da menopausa em humanos (BRINTON, 2012).

No entanto, ainda não está claro a influência do TR, RC e a associação de ambos (TR+RC) como intervenção preventiva para o aumento da PAS, na função e na estrutura morfológica da aorta e atividade da MMP-2 em ratas *Holtzman* OVX. Nossa hipótese é que tanto o TR, a RC, quanto a associação de ambos (TR+RC) podem prevenir os efeitos deletérios da menopausa sobre a PAS, a função e a estrutura morfológica da artéria aorta em ratas OVX.

Esta pesquisa foi realizada em conjunto ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – USP, com o Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo como responsável, com o intuito de investigar os efeitos do TR e da RC sobre diversas variáveis, além das incluídas nesse projeto, sendo elas: metabólicas, relação entre obesidade óssea e osteoporose, características musculares e da biogênese mitocondrial.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia de doenças cardiovasculares

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) as DCV caracterizam um grupo de distúrbios do coração e vasos sanguíneos, tais como a Hipertensão arterial, a doença coronária, a doença cerebrovascular (acidente vascular cerebral), a doença vascular periférica, a insuficiência cardíaca, a doença cardíaca reumática, a doença cardíaca congênita e as cardiomiopatias (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Em nível mundial, as DCV são as principais causas de morte. Cerca de 17,7 milhões de pessoas morreram somente em 2015 devido a essas doenças. Esse dado representa cerca de 31% de todas as mortes em todo o mundo, sendo que, deste total cerca de 7,4 milhões por doença coronária, e 6,7 milhões por a acidentes vasculares cerebrais. A maior incidência de mortes em decorrência de DCV ocorreram em países de baixa a média renda. Acredita-se que dos 17 milhões de mortes prematuras em indivíduos com menos de 70 anos, devidas a doenças não transmissíveis, somente em 2015, 82% ocorreram em países de baixa e média renda, e 37% são causadas por doenças cardiovasculares (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Importante citar é que a maioria das DCV pode ser prevenida pela modificação do estilo de vida, alterando ou diminuindo a influência dos fatores de risco, como dieta, obesidade e sedentarismo, ou seja, um estilo de vida com dieta controlada e com prática regular de exercícios físicos. Além dos fatores de risco citados anteriormente, também há outros determinantes subjacentes às DCV, ou seja "as causas das causas", tais como pobreza, estresse, fatores hereditários, urbanização e envelhecimento da população, dentre outros (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Para tentar reduzir esses números, a OMS possui um Plano de Ação Global para Prevenção e Controle de Doenças não Transmissíveis (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). Um dos alvos desse plano é o controle da incidência de hipertensão arterial. A OMS almeja reduzir em 25% a prevalência global de hipertensão arterial. O aumento da pressão arterial é o principal fator de risco para DCV. A prevalência global de pressão arterial elevada (definida como pressão arterial sistólica e/ou diastólica maior ou igual a 140/90 mmHg) em adultos com 18 anos ou mais era de cerca de 24,1% em homens e 20,1% em mulheres em 2015. Entre os anos de 1975 e 2015, o número de adultos com pressão arterial elevada passou de 594 milhões para 1,13 bilhões de indivíduos. A OMS

pretende chegar a essa redução através de implementação de políticas públicas que visam aumentar o nível de exercício físico na população, além de uma dieta equilibrada (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

As DCV são apontadas como as principais causas de comorbidades, tanto em homens como em mulheres. Contudo, a incidência de mortes causadas por essas doenças é maior em mulheres após a menopausa, do que em homens. A hipertensão arterial sistêmica é um dos principais fatores de risco para as DCV. Com o avançar da idade, tanto em homens quanto em mulheres, a pressão sanguínea tende a aumentar. Porém, esse aumento devido ao envelhecimento é mais pronunciado em mulheres do que em homens. No mundo, cerca de 25% das mulheres adultas são hipertensas. De fato, tem-se observado que com o avançar da idade a mulher, na menopausa, tem um aumento exponencial de riscos para eventos cardiovasculares, se igualando aos homens com mesma idade, sugerindo que uma possível causa desse aumento seja a ausência da ação de hormônios estrogênicos endógenos no sistema cardiovascular (YANES e RECKELOFF, 2011).

A hipertensão arterial é uma doença com características multifatoriais que acarreta e sustenta elevados níveis de pressão arterial e que, na maioria das vezes, está associada a alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos alvos como: coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos, como também a alterações metabólicas, aumentando os riscos de doenças cardiovasculares. No Brasil, os dados continuam a ser preocupantes. Cerca de 36 milhões de indivíduos adultos possuem hipertensão. O que chama a atenção é que mais de 60% dos idosos no Brasil são hipertensos, contribuindo direta ou indiretamente para 50% das mortes por DCV. Além disso, os custos socioeconômicos decorrentes das frequentes internações devido as DCV são elevados (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016).

2.2 Pressão arterial e hipertensão

A pressão arterial (PA) é determinada pelo débito cardíaco (DC) e pela resistência vascular periférica (RVP), podendo ser calculado pela seguinte fórmula: $PA=DC \times RVP$. O DC é determinado pela frequência cardíaca e pelo volume sistólico, sendo este em média 4.900 mL/minuto em um indivíduo adulto. A frequência e a contratilidade cardíaca, bem como a resistência vascular, são controladas principalmente pelo sistema nervoso autônomo, composto pelos sistemas nervosos simpático e parassimpático, além de diferentes sistemas hormonais. A PA deve ser mantida em níveis normais, sendo a PAS em torno de 120 mmHg e a PAD em torno de 80 mmHg. Essa regra vale para as diferentes situações posturais e

comportamentais para que todos os órgãos e tecidos do corpo sejam perfundidos adequadamente (TIBIRIÇA, 2001). Para tal, a PA é controlada de maneira rápida por mecanismos específicos, assim como de maneira a longo prazo, também por mecanismos específicos, discutidos a seguir.

O controle a curto prazo da PA, períodos de segundos ou de minutos, é realizado praticamente quase que integralmente por reflexos nervosos. Um dos mais importantes desses reflexos é conhecido como “Reflexo Barorreceptor”. Ao se elevar acentuadamente, a PA promove uma tração, e conseqüentemente, excitação de receptores neurais conhecidos como barorreceptores. Os barorreceptores estão situados nas paredes da aorta e da artéria carótida interna. Esses barorreceptores enviam sinais desde o bulbo, pelo sistema nervoso autonômico, para provocar lentificação do coração, para promover a diminuição da contração cardíaca, dilatação das arteríolas e dilatação das grandes veias que, em conjunto, atuam no sentido de fazer com que a PA baixe até os valores normais. Efeitos exatamente opostos ocorrem quando a PA fica demasiadamente baixa e os barorreceptores deixam de ser estimulados (GUYTON *et al.*, 1974; LIFTON *et al.*, 2001).

Por outro lado, os rins realizam, quase que inteiramente, o controle a longo prazo da PA. Eles atuam por meio de dois mecanismos muito importantes. Um deles é o mecanismo hemodinâmico, o outro é o mecanismo hormonal. O mecanismo hemodinâmico é bem simples. Quando a pressão aumenta acima do normal, essa pressão excessiva nas artérias renais faz com que os rins filtrem quantidades aumentadas de líquido, excretando grandes quantidades de água e sódio (Na^+). A perda de água e de Na^+ diminui o volume sanguíneo. Essa redução faz com que a pressão sanguínea retorne aos valores normais (120/80 mmHg). De modo inverso, quando há uma diminuição da pressão abaixo dos valores normais, os rins retêm água e Na^+ até que a pressão retorne aos valores normais (GUYTON *et al.*, 1974; LIFTON *et al.*, 2001).

O controle da PA também é realizado pelo sistema endócrino. São vários os hormônios que desempenham papéis importantes no controle da PA e todos possuem importância primordial para essa regulação. Porém, um dos de maior importância é o sistema renina-angiotensina. Quando a pressão decresce a valores insuficientes, para manter o fluxo sanguíneo normal, os rins estimulam as células justaglomerulares a secretarem a renina. Esta por sua vez, atua como uma enzima convertendo uma das proteínas plasmáticas, o substrato de renina, no hormônio angiotensina I. Esse hormônio tem efeito relativamente pouco intenso sobre a circulação, mas é rapidamente convertido em um segundo hormônio, a angiotensina II

que promove a vasoconstrição nas arteríolas. Essa vasoconstrição faz com que a pressão aumente até seu nível normal (GUYTON *et al.*, 1974; LIFTON *et al.*, 2001).

A angiotensina II possui outro importante papel. Ela é responsável pela estimulação do córtex das suprarrenais a secretar o hormônio aldosterona que exerce efeito direto sobre os rins, reduzindo a excreção tanto de água como de Na^+ na urina. A consequência dessa inibição da excreção de água e de Na^+ na urina, é uma retenção destes no sangue, elevando o volume sanguíneo, possibilitando que a PA volte aos valores normais (GUYTON *et al.*, 1974; LIFTON *et al.*, 2001).

Há também o controle miogênico da PA. Este é realizado pelo óxido nítrico (NO, do Inglês Nitric Oxide). O NO é uma das menores e mais simples moléculas sintetizadas pelo corpo. Ele é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado. Sendo um mediador endógeno, ele é responsável pela vasodilatação dependente do endotélio, derivado do metabolismo da L-arginina em L-citrulina pela NO sintase. O NO inibe a adesividade e a agregação plaquetária. As variações no diâmetro da luz dos vasos ocorrem em resposta às variações de fluxo sanguíneo. O aumento no fluxo provoca aumento na secreção de NO que, por sua vez, causa aumento do calibre dos vasos. As alterações do fluxo sanguíneo produzem tensão tangencial, relacionada ao atrito entre a camada estacionária, associada à parede do vaso, e as camadas de sangue em movimento, o que provoca um estresse de cisalhamento. A secreção de NO é dependente da integridade do endotélio. Essa integridade se encontra diminuída em algumas situações patológicas como na hipertensão arterial, na hipercolesterolemia e na aterosclerose (LIFTON *et al.*, 2001; DUSSE, 2003)

A hipertensão arterial é caracterizada pela elevação e manutenção dos valores da PA iguais ou maiores a 140 mmHg de PAS e 90 mmHg de PAD (140/90 mmHg). É frequentemente associada a alterações funcionais ou também estruturais dos órgãos-alvo, como coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos, além de alterações metabólicas com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016). Além disso, a hipertensão está associada a um aumento da incidência de todas as causas de mortalidade por DCV tais como derrame, doenças coronárias, insuficiência cardíaca, doença arterial periférica e insuficiência renal. É uma doença silenciosa em que o paciente não sente nenhum tipo de sinal (DROZDA *et al.*, 2011).

A hipertensão arterial pode ser classificada como Primária e Secundária. A Primária é também conhecida como hipertensão "essencial" por não possuir uma causa conhecida.

Entretanto fatores como: envelhecimento, genética, estilo de vida, massa corporal e ingestão de sal, estão envolvidos no seu aparecimento. Noventa e cinco por cento das pessoas diagnosticadas com hipertensão encontram-se nesta categoria (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016).

Com relação à hipertensão secundária, é possível identificar suas causas. Estas estão relacionadas a doenças renais, problemas na artéria aorta e algumas doenças endócrina, gravidez, uso de contraceptivos orais e abuso de ingestão de álcool (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016).

A tabela 1 mostra os valores que permitem classificar os indivíduos adultos acima de 18 anos, de acordo com os níveis de PA.

Tabela 1 - Classificação da PA para adultos acima de 18 anos.

CLASSIFICAÇÃO	PRESSÃO SISTÓLICA (mmHg)	PRESSÃO DIASTÓLICA (mmHg)
Ótima	< 120	< 80
Normal	< 130	< 85
Limítrofe*	De 130 a 139	De 85 a 89
Hipertensão Estágio 1	De 140 a 159	De 90 a 99
Hipertensão Estágio 2	De 160 a 179	De 100 a 109
Hipertensão Estágio 3	≥ 180	≥ 110
Hipertensão Sistólica Isolada	≥ 140	< 90

* Quando as pressões sistólicas e diastólicas se situarem em categorias diferentes, a maior deve ser utilizada para classificação da pressão arterial (PA). Considerada hipertensão sistólica isolada quando valores de PAS forem ≥ 140 mm Hg e PAD < 90 mmHg, devendo a mesma ser classificada em estágios 1, 2 e 3. Fonte: Adaptado de Sociedade Brasileira de Cardiologia (2016).

Importante ressaltar que qualquer pessoa pode apresentar valores para PA acima de 140/90 mmHg sem que seja considerado hipertenso. Apenas a manutenção de níveis permanentemente elevados, em múltiplas medições, em diferentes horários, posições e condições (repouso, sentado ou deitado) caracteriza um quadro de hipertensão (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016).

2.3 Menopausa

A menopausa é o período na vida da mulher no qual ocorre redução dos hormônios ovarianos estrogênio e progesterona. Essa redução ocorre quando o estoque finito de folículos ovarianos se esgota. A menopausa natural é diagnosticada após 12 meses de amenorréia não associada a uma causa patológica. Inicialmente, a duração do ciclo menstrual torna-se irregular, e as concentrações de hormônio folículo-estimulante (FSH) aumentam em resposta a concentrações diminuídas dos hormônios ovarianos. A medida que a transição da menopausa progride, observa-se que os ciclos menstruais diminuem até cessarem por completo, encerrando assim a ovulação. Observa-se que, em algumas mulheres, a amenorréia por três meses consecutivos, ou mesmo a duração do ciclo menstrual maior de 42 dias, são preditores da menopausa (NELSON, 2008). A transição da vida reprodutiva da mulher para o período da menopausa, é dividido por sete etapas, ilustradas na figura 1.

Figura 1 - Ilustração dos estágios de envelhecimento reprodutivo normal em mulheres

Estágios	-5	-4	-3	-2	-1	+1	+2
	Terminologia	Reprodutivo			Transição menopausa		Pós-menopausa
	Precoce	Pico	Tardio	Precoce	Tardio	Precoce	Tardio
Duração dos Estágios	Perimenopausa			Variável		1	4 anos
Ciclo menstrual	Variável para regular	Regular		Duração do ciclo variável (>7 dias diferente do normal)	≥ 2 ciclos alternados e um intervalo de amenorréia (≥ 60 dias)	1	Nenhum
Endócrino	FSH Normal		FSH aumentando	FSH aumentando		FSH aumentando	

Legenda: FSH, Hormônio fólculo estimulante; 1= 1 ano; 12 = 12 anos. Fonte: Adaptado de Nelson (2008).

A figura acima descreve três grandes fases, fase reprodutiva, fase de transição da menopausa e fase pós-menopausa. Estas três fases são subdivididas em sete estágios do envelhecimento reprodutivo na mulher, centrados na fase final reprodutiva. A fase reprodutiva foi dividida em fases -5, -4 e -3 correspondentes ao início, pico e final, respectivamente. A fase de transição da menopausa consistiu em estágio 2 (precoce) e estágio -1 (tardio), e a fase pós-menopausa continha estágios +1 (precoce) e +2 (tardio). A fase 3 foi caracterizada por ciclos menstruais regulares e níveis crescentes de hormônio FSH. A fase -2 foi caracterizada pela variabilidade na duração do ciclo menstrual e níveis aumentados de

FSH. A fase -1 foi caracterizada pelo aparecimento de ciclos alternados ou amenorréia de pelo menos 60 dias e elevação contínua do FSH (HARLOW *et al.*, 2012), ilustrado na figura 1.

Em resumo, a fase reprodutiva da mulher é caracterizada por ciclos menstruais regulares; menopausa, com ciclos menstruais variáveis e valores elevados de FSH; e por último a pós-menopausa, começando com o período menstrual final e durando até o final da vida. Esse modelo é útil para descrever a progressão geral dos eventos que conduzem à menopausa. Contudo, existe uma variação individual substancial, incluindo a passagem de etapas e o vaivém entre os estágios. De forma geral, o período de transição da vida reprodutiva para a menopausa inicia-se em torno dos 40 anos e pode durar cerca de 5 a 9 anos. O período menstrual final geralmente acontece quando as mulheres estão entre 40 e 58 anos de idade (NELSON, 2008).

Observa-se nesse período normal da vida da mulher algumas manifestações clínicas como: sensações de ondas de calor, insônia, depressão, diminuição do desejo sexual, ressecamento vaginal, osteoporose, doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, entre outras (NELSON, 2008).

Além do efeito natural e fisiológico da cessação da fase reprodutiva da mulher, a menopausa também pode ser induzida por cirurgia, quimioterapia ou radiação (SHELLING, 2010).

2.4 Menopausa induzida (cirurgia)

A Sociedade Norte-Americana de Menopausa (NAMS) caracteriza a menopausa induzida como o termo para descrever a menopausa causada de forma artificial, por um tratamento médico. Algumas drogas e terapias de radiação podem danificar os ovários causando a menopausa. A causa mais comum da menopausa induzida é a remoção cirúrgica de ambos os ovários (ovariectomia) em virtude de problemas médicos. As mulheres submetidas a essa cirurgia experimentam a menopausa induzida. Esse tipo de menopausa não promove a perimenopausa. Através da cirurgia, a menopausa ocorre abruptamente, no dia da remoção dos ovários pela cirurgia. Na menopausa induzida por tratamentos medicamentosos, pode haver uma curta transição, da mesma forma do processo de interrupção da produção de hormônios ao longo de um período de tempo. A perda abrupta de hormônios ovarianos geralmente causa sintomas mais drásticos do que aqueles vistos com menopausa natural (Disponível em <https://www.menopause.org>, acessado em 20/05/2017).

A menopausa induzida não possui idade pois é dependente da remoção dos ovários. Ela pode ocorrer em idade muito mais precoce do que a menopausa natural, que acontece geralmente em torno dos 45 a 50 anos. Pode resultar em um risco aumentado para algumas doenças devido à perda da proteção do hormônio estrogênio e outros hormônios ovarianos (ATSMA *et al.*, 2006).

Segundo Lewis *et al.* (2000), a ooforectomia (ou ovariectomia) profilática, realizada juntamente com a histerectomia, está associada ao aumento da mortalidade, doença coronariana, demência, osteoporose e câncer. Somente nos Estados Unidos, mais de 600.000 histerectomias são realizadas todos os anos (LEWIS *et al.*, 2000). Cerca de 18% das mulheres entre 18 a 44 anos desse país são submetidas a ooforectomia no momento da histerectomia para doença benigna, e cerca de 76% têm idade entre 45 a 64 anos (HICKEY *et al.*, 2010). A maioria dessas cirurgias tem o objetivo de melhorar a qualidade de vida das mulheres na perimenopausa. Muitas histerectomias são acompanhadas por ooforectomia eletiva, e terapia de reposição hormonal (TRH) (LEWIS *et al.*, 2000). Um estudo prévio identificou que mulheres que foram submetidas à ovariectomia antes dos 45 anos tiveram aumento significativo de mortalidade associado a doenças cardiovasculares. Efeito não observado em mulheres sob tratamento hormonal com estrogênio (RIVERA *et al.*, 2009).

A TRH era outrora confiantemente prescrita a mulheres com sintomas menopáusicos após ooforectomia. Contudo, evidências na literatura demonstram que, em mulheres pós-menopausadas, a TRH pode estar associada a riscos significativos, que podem superar os benefícios. O uso prolongado da TRH parece aumentar o risco de câncer de mama (HICKEY *et al.*, 2010). Portanto, são importantes estudos no sentido de avaliar os efeitos de alternativas de tratamento a possíveis doenças associadas à menopausa, natural ou induzida, em detrimento da TRH.

2.5 Modelo animal para o estudo da menopausa

Estudos com modelos animais que mimetizam a menopausa em humanos abrem janelas para adentrarmos na biologia multi-estruturada dos processos fisiológicos do envelhecimento da mulher. Tais estudos são de grande importância, pois por meio deles é possível obter informações para um melhor entendimento sobre eventos fisiológicos os quais não seriam possíveis de serem investigados em humanos. Estes estudos possibilitam o desenvolvimento de novos tipos de tratamentos e prever resultados de intervenções terapêuticas em humanos (BRINTON, 2012).

Além do mais, a declaração de Helsinque, de 1964, diz que:

“A pesquisa clínica envolvendo seres humanos deve estar em conformidade com os princípios científicos geralmente aceitos e deve ser baseada no conhecimento minucioso da literatura científica, em outra fonte de informação relevante e em experimentação laboratorial e, quando apropriado, experimentação animal.” (Associação Médica Mundial, Declaração de Helsinque, 1964, disponível em: <https://www.wma.net>, acessado em 23/05/2017).

Em 1929, o fisiologista August Krogh escreveu um ensaio que introduziu uma abordagem experimental que mais tarde seria identificada como "O Princípio de Krogh". Assim, o princípio de Krogh, de forma simples, diz que “entre a diversidade de espécies animais haverá um idealmente adequado como modelo experimental para qualquer problema biológico” (LINDSTEDT, 2014). Um modelo utilizado para resolver um problema biológico, ou que levou ao entendimento da fisiologia neural foi o estudo do axônio "gigante" da lula. Estudo este que foi crucial para desvendar a natureza da neurotransmissão (LINDSTEDT, 2014).

O ser humano tem utilizado estudos com modelo animal para entender sua própria biologia. Na pesquisa cardiovascular, modelos animais permitiram o estudo da doença cardiovascular nos estágios iniciais, bem como a investigação dos mecanismos da patogênese da doença cardiovascular e os efeitos de possíveis intervenções. Estudos em animais permitem investigar os mecanismos fisiopatológicos, como da hipertensão. Essas investigações contribuem para a concepção de estudos clínicos e os resultados de estudos clínicos pode moldar a direção da pesquisa básica através da identificação de achados clinicamente relevantes (SANDBERG, 2008). Assim, muitos pesquisadores lançam mão de ratos para delinear seus estudos. Além disso, os ratos possuem uma proximidade genética a seres humanos de 90% (JACOB, 2010), o que faz desse animal um importante meio para o entendimento de doenças humanas e possíveis curas.

Os ratos foram as primeiras espécies de mamíferos especificamente domesticadas para serem utilizadas em pesquisa médicas, em laboratório, na busca de respostas de uma gama de questões da pesquisa básica. Registros que datam da década de 1850 mostram que estes animais foram derivados de ratos *fanciers*, *Rattus norvegicus*. Estes foram selecionados devido a sua cor de pele e características comportamentais. Graças ao Instituto Wistar, foi criado o rato Wistar, linhagem que derivou mais da metade de todos os ratos de laboratório

(PHILLIPS *et al.*, 2017). Outra linhagem de ratos muito utilizada em estudo experimental com animais é a *Holtzman*.

Para a escolha de um modelo animal, deve-se levar em consideração que o modelo animal não representa uma réplica exata de possíveis mecanismos a serem estudados nos seres humanos. Por isso, pelo menos três características no modelo animal devem ser levadas em consideração: a conveniência, a relevância e a adequação (KALU, 1991). A remoção de ambos os ovários, ovariectomia, é usada como um modelo de estudo da menopausa humana. As intervenções experimentais, geralmente, ocorrem quando o hormônio 17 β -estradiol atinge níveis baixos ou mesmo indetectáveis no plasma. Isso ocorre entre uma a duas semanas após a cirurgia. Tal modelo tem proporcionado grande parte de nossa compreensão da ação hormonal ovariana em todo o sistema de órgãos do corpo (BRINTON, 2012). Assim, a ovariectomia tem se mostrado um modelo experimental que mimetiza o período de menopausa em mulheres (KALU, 1991; BRINTON, 2012).

2.6 Hipertensão na menopausa

Como citad anteriormente sobre a hipertensão arterial, ela é uma doença com características multifatoriais que acarreta em níveis elevados e mantidos da pressão arterial associada a alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos alvos como coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos, aliada a alterações metabólicas, aumentando os riscos de doenças DCV (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016).

Segundo o Manual de Atenção a Mulher no Climatério (BRASIL, 2008), na menopausa a hipertensão arterial aparece como um dos fatores de risco para doenças cardiovasculares, assim como Diabetes mellitus, tabagismo, obesidade, inatividade física, má alimentação, envelhecimento, dislipidemias, histórico familiar e fatores psicossociais.

A hipertensão arterial é considerada como um dos maiores fatores de risco de DCV. Antes da menopausa, a pressão sanguínea é tipicamente mais baixa em mulheres do que em homens com idade correlata (LIMA *et al.*, 2012). No entanto, após a menopausa a prevalência de hipertensão e risco de DCV aumenta consideravelmente, independente da origem étnica. É importante ressaltar que o aumento da pressão arterial em mulheres pós-menopausadas não ocorre assim que o ovário torna-se senescente, mas após certo número de anos. O fato da incidência da DCV ser menor em mulheres na idade reprodutiva, tornar-se similar à dos homens após a menopausa levantou a possibilidade de que o estrógeno é um agente auxiliador na proteção de eventos cardiovasculares (LIMA *et al.*, 2012).

O estrogênio é um hormônio esteróide, sintetizado e liberado pelos ovários. Ele atua na regulação da PAS em mulheres por mecanismos gênicos e não gênicos. O primeiro se dá por atuação da ligação do agonista ao seu receptor, como o receptor de estrogênio (RE), responsável por ativação de fatores de transcrição nuclear, assim como demais receptores de hormônios esteróides (CERAVOLO *et al.*, 2007).

No sistema vascular encontram-se dois tipos de receptores de estrogênio, receptores do tipo alfa e beta (RE- α e RE- β). A ativação desses receptores por este hormônio estimula a transcrição gênica e induz seus efeitos genômicos, dentre os quais, crescimento de células endoteliais no vaso. Nas células endoteliais o hormônio 17 β -estradiol (E2) fosforila e, conseqüentemente, realiza a ativação de proteínas conhecidas por MAP quinase (MAPK – *mitogen-activated protein kinase*), promovendo a proliferação de células endoteliais. Em caminho oposto, o E2 inibe a atividade da MAPK, resultando na inibição do crescimento e proliferação das células endoteliais na musculatura lisa do vaso. Não obstante, o estrógeno atua antagonizando o efeito de promotores de crescimento como a Angiotensina II nas células musculares lisas do vaso através de ativação de fosfatases. O hormônio Progesterona também inibe o crescimento de células musculares lisas do vaso (CERAVOLO *et al.*, 2007).

Outra forma de regular a vasoconstrição e relaxamento de maneira não genômica, é através da ativação de receptores de estrógeno nas células endoteliais. Estes, quando ativados podem realizar a inibição aguda da contração do vaso. A progesterona atua também em receptores de membrana nas células endoteliais. Um de seus efeitos é modificar a ação do estrógeno relacionado à vasoconstrição. Tais ações não genômicas podem modular o balanço de íons e da expressão de receptores nas células da musculatura lisa do vaso. Além disso, esses hormônios podem promover a liberação de fatores como o NO e prostaglandinas (PGL2) conhecidas como fatores relaxantes do endotélio EDRF, fatores como endotelina-1 (ET-1), Angiotensina II e tromboxano A2, esses conhecidos como fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHFs), o que irá modular a dilatação do vaso (CERAVOLO *et al.*, 2007).

Entretanto, deve-se ter muito cuidado ao se analisar tais efeitos, pois os efeitos dos hormônios sexuais são dependentes do tipo do leito vascular, além da espécie a ser estudada. Assim, os efeitos desses hormônios são heterogêneos sobre a função vasomotora. Em aorta de ratos, o estrógeno causa relaxamento independente e dependente do endotélio. Por outro lado, em arteríolas mesentéricas é observado relaxamento independente do endotélio. Portanto, o estrógeno atua de maneira diferente na regulação do tônus vascular, em vasos diferentes, como citado acima (CERAVOLO *et al.*, 2007).

Contudo, ainda existem poucos estudos sobre o assunto, dificultando a fundamentação de conclusões adequadas sobre o mecanismo responsável pelo aumento da pressão sanguínea em mulheres pós-menopáusicas (LIMA *et al.*, 2012). Além disso, a incidência de obesidade em mulheres na menopausa tem crescido para mais de 40%. Esse aumento da massa corporal também está associado ao aumento da pressão arterial. Tem sido observado uma atenuação da disfunção endotelial e do quadro inflamatório crônico de baixo grau em decorrência da administração de medicamentos anti-hipertensivos em mulheres na menopausa, com idade entre 47 a 60 anos, que apresentavam sintomas da síndrome metabólica. Sintomas estes como hipertensão, hiperinsulinemia, hipotrigliceridemia, perfil lipídico alterado e obesidade. A inflamação crônica de baixo grau, observado em indivíduos obesos, definida como sendo o aumento do fator de necrose tumoral de necrose alfa (TNF- α) e citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas (ILs) ou adipocinas tais como a IL-6, é comumente encontrada em mulheres pós-menopausadas. O quadro de síndrome metabólica pode contribuir tanto para o surgimento de hipertensão quanto influencia de maneira negativa no tratamento por terapia medicamentosa em mulheres menopausadas (YANES e RECKELOFF, 2011).

A obesidade é um fator que está associado com a hipertensão. Os mecanismos dessa associação incluem o aumento da atividade simpática. Esta por sua vez parece estar intimamente associada com a gordura abdominal visceral (BARROSO *et al.*, 2002). A maior atividade simpática aumenta a liberação de renina e a formação de angiotensina II, que por sua vez aumenta a produção adrenal de aldosterona, hormônio que atua na regulação da pressão sanguínea, com retenção de sódio resultante. O aumento da gordura visceral está associado com o aumento de mediadores inflamatórios, aumento do estresse oxidativo e diminuição da vasodilatação endotelial (BARROSO *et al.*, 2002). Porém, não está claro se a própria menopausa resulta em um aumento do índice de massa corporal (IMC), embora as mulheres na menopausa e aquelas com menopausa cirúrgica mostraram maior IMC do que mulheres na pré-menopausa, levando-se em consideração a idade, atividade física e etnia (MATTHEWS *et al.*, 2001).

Entretanto, vale lembrar que nem todas as mulheres na menopausa apresentam os sintomas e doenças acima citadas. O que nos faz levantar a seguinte questão: “Há uma relação entre menopausa e hipertensão?”

Um revisão interessante mostra que há relação entre pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) elevadas e menopausa independente da idade, índice de massa corpórea (IMC), com elevação da PAS ao longo de alguns anos e surgimento do enrijecimento de vasos sanguíneos, em mulheres pós-menopausadas (COYLEWRIGHT *et al.*, 2008). Além disso,

mulheres na menopausa que realizam tratamento com reposição hormonal podem apresentar redução da PAS e PAD, indicando assim um efeito protetor cardiovascular dos hormônios ovarianos (COYLEWRIGHT *et al.*, 2008).

Por outro lado, a relação entre menopausa e hipertensão arterial pode ser explicada por outros fatores, como o envelhecimento. Fatores observados em um estudo longitudinal que analisou 568 mulheres no período pré-menopausa e pós-menopausa. Após 16 anos os pesquisadores observaram que a PAS elevada nessa população se deu em decorrência da idade, ou seja, pelo envelhecimento (CASIGLIA *et al.*, 1996).

Na senescência, tem-se observado um maior aumento da atividade simpática nas mulheres do que em homens, sugerindo que o mecanismo neural simpático pode contribuir de forma importante para a elevação da PAS no envelhecimento (FU *et al.*, 2008). Ademais, mulheres idosas e com hipertensão possuem maior resistência vascular sistêmica do que os homens hipertensos idosos (FU *et al.*, 2008), além disso há uma associação entre envelhecimento e diminuição da sensibilidade de receptores β -adrenérgicos em vasos sanguíneos, prejudicando assim a resposta vasodilatadora no envelhecimento (TSUJIMOTO *et al.*, 1986), o que eleva a PAS. Em mulheres acima de 40 anos de idade, observa-se aumento na PAS por incremento da atividade do nervo simpático muscular, maior até do que em homens, sugerindo que o mecanismo neural simpático contribui de forma importante para a elevação da PAS no envelhecimento em mulheres (FU *et al.*, 2008). A avaliação da atividade do nervo simpático muscular fornece informações importantes sobre o controle da pressão arterial. Os nervos simpáticos inervam o músculo esquelético e são de natureza vasoconstritora. Portanto, aumentos ou mesmo diminuições na sua atividade podem estar relacionados com alterações na vasoconstrição e resistência vascular periférica. Além disso, os nervos simpáticos inervam leitos vasculares importantes como o cardíaco e renal (HART e CHARKOUDIAN, 2014).

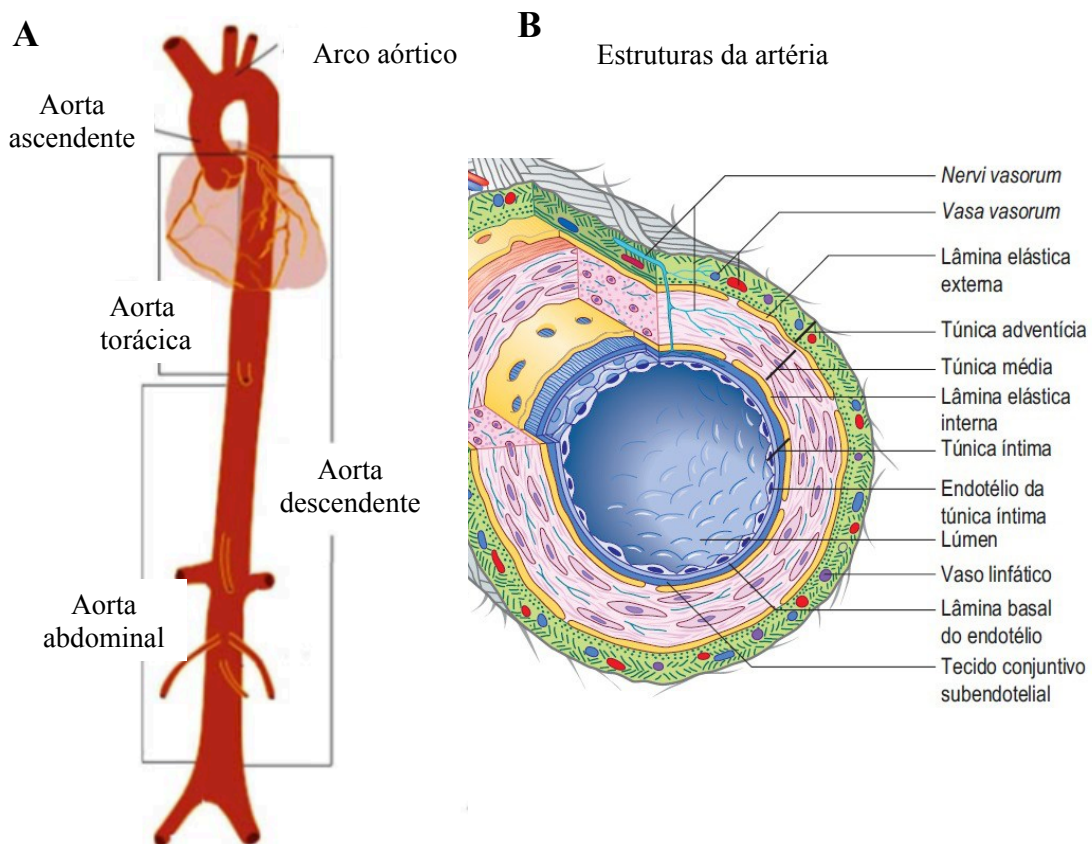
O estrógeno regula positivamente a vasodilatação através do NO, sensibilizando o receptores β -adrenérgicos, evento que não ocorre em homens. Dessa forma, mudanças na sensibilidade dos receptores à norepinefrina podem explicar por que a incidência de hipertensão aumenta nas mulheres pós-menopáusicas e se torna semelhante a dos homens da mesma idade ou as vezes maior. Neste contexto, o papel de outros hormônios esteróides sexuais, como progesterona e testosterona, na modulação de interações simpáticas e vasculares deve ser levando em consideração. Assim, mudanças no controle β -adrenérgico têm forte influência na dinâmica da pressão na artéria aorta em mulheres pós-menopausadas, podendo levar ao enrijecimento dos vasos (HART e CHARKOUDIAN, 2014).

O aumento da rigidez arterial provoca uma elevação na velocidade da onda de pulso que pode ter um efeito profundo sobre a pressão na artéria aorta central. Com isso, os vasos com maior rigidez promovem o retorno precoce das ondas de pressão. Essas ondas são refletidas de volta para o coração a partir de sítios periféricos. Conseqüentemente, as ondas de pressão chegam cedo durante a sístole em vez da diástole causando elevação na PAS e elevação da onda de pulso aórtico ascendente, o que por sua vez provoca um aumento na pós-carga cardíaca. Observar-se em mulheres na menopausa um aumento na rigidez arterial, com elevação dos índices de reflexão da aorta. Isto se deve a amplitude das ondas de pressão refletidas no coração, que está associado ao aumento do risco de eventos cardiovasculares (HART e CHARKOUDIAN, 2014).

Percebe-se, portanto, que as alterações na hemodinâmica central da artéria aorta também contribuem de forma importante para o risco de DCV, observado em mulheres mais velhas. Claro que outros mecanismos estão envolvidos na elevação da PAS de mulheres idosas, de maneira independente da condição de menopausa, como diminuição da produção de NO, dentre outros (TSUJIMOTO *et al.*, 1986).

2.7 A artéria aorta e sua importância

Em humanos, a artéria aorta possui diâmetro de cerca de 2 e 3 cm. Ela se divide em artéria aorta ascendente, arco aórtico e artéria aorta descendente (Figura 2). Parte da aorta ascendente se comunica com o ventrículo esquerdo do coração seguindo até onde se inicia o arco aórtico. A artéria aorta possui propriedades morfológicas e mecânicas essenciais para o controle da pressão sistólica e pressão diastólica. Além disso, também possui função de transporte do sangue oxigenado, e todos os seus componentes, sob alta pressão desde o coração até os tecidos e órgãos, permitindo que haja troca de nutrientes, hormônios e outras substâncias, além de facilitar a remoção de resíduos do metabolismo gerados pelo corpo (BRIONES *et al.*, 2006).

Figura 2 – Estrutura da Artéria aorta

Fonte: Figura A, adaptado de Berillis (2013), e figura B disponível em: <http://anatomiaonline.com/aTRerias/>, acessado em 24/05/2017.

A aorta é responsável por armazenar metade do volume de ejeção ventricular esquerdo na fase sistólica. Na diástole, as forças elásticas da parede aórtica propõem este volume para a circulação periférica. Isso resulta em um fluxo sanguíneo periférico contínuo normal (WAGENSEIL e MECHAM, 2012). Esta função da aorta proporciona uma redução da pós-carga ventricular esquerda e melhora do fluxo sanguíneo coronário e relaxamento ventricular esquerdo. O comprometimento da função da aorta pode levar a um aumento da resistência elástica do vaso que resulta em aumento da pressão arterial em mulheres pós-menopausadas, levando à hipertensão (WAGENSEIL e MECHAM, 2012).

Entende-se, dessa maneira, que a aorta age como uma câmara de amortecimento elástica. Essa função é chamada de função Windkessel. Ela é entendida como a interação da sístole com a diástole. A aorta, e alguns dos grandes vasos proximais, armazenam cerca de 50% do volume do ventrículo esquerdo da fase sistólica do ciclo cardíaco. Na fase da diástole, as forças elásticas da parede aórtica propõem esse 50% do volume para a circulação periférica, criando assim um fluxo sanguíneo periférico quase contínuo. Dessa maneira, a função de Windkessel, exerce influência não apenas na circulação periférica, mas também no

coração, resultando em redução da pós-carga ventricular esquerda e melhora do fluxo sanguíneo coronário e relaxamento ventricular esquerdo. Vale lembrar que a função de Windkessel é determinada por modelo matemático. Contudo, esse modelo não é o único usado para o entendimento do papel das grandes artérias no processo hemodinâmico. Há dois modelos matemáticos utilizados. Um é o citado acima, o outro é o domínio da frequência. Este envolve reflexão de onda (BELZ, 1995).

De maneira geral, a função de Windkessel trata do recuo elástico da artéria aorta que permite que o fluxo cíclico vindo do coração seja transformado em fluxo contínuo no nível arteriolar, conhecidos como vasos de resistência. De acordo com a lei de Poiseuille, a resistência vascular, predominante na rede microvascular, é um componente importante deste modelo Windkessel, no qual a constante de tempo do decaimento diastólico é, por definição, igual ao produto da resistência vascular vezes a elasticidade (complacência) (BELZ, 1995).

Falando sobre o modelo de domínio de frequência, este implica que, após a ejeção ventricular, que gera em uma onda de choque resultante iniciada na origem da aorta torácica, uma onda de pressão direta percorre a árvore arterial a uma dada velocidade de onda de pulso. Em estruturas que possuem elastina ou que acumulem colágeno, afetando a rigidez do vaso, ou descontinuidade geométrica (ramificação do vaso) da parede arterial, esta onda é refletida para trás para retornar em direção ao coração. Assim, os modelos emitidos a partir do domínio da frequência implicam, como o modelo de Windkessel, a presença de um componente de resistência como um gatilho principal para reflexões de onda. Portanto, para um adequado acoplamento entre o coração e a aorta torácica é necessário um nível ótimo de resistência vascular (BELZ, 1995).

A resistência elástica do vaso que a aorta estabelece contra a distensão sistólica, aumenta com o envelhecimento. Esse aumento da rigidez promove um aumento da pós-carga do ventrículo esquerdo, levando a um aumento da PA, e conseqüentemente, a alterações patológicas no vaso. Este aumento da rigidez leva a um aumento da pressão arterial sistólica, gerando o quadro patológico de hipertensão arterial sistólica (BELZ, 1995).

Tratamentos farmacológicos que utilizam os inibidores da enzima conversora de angiotensina (MARCHON *et al.*, 2015) e os doadores de NO parecem reduzir diretamente a resistência elástica da aorta. Esse efeito, além de outros efeitos sobre a pressão arterial e a circulação periférica, poderia ter grande relevância clínica como mecanismo adicional para descarregar o ventrículo esquerdo, melhorar a circulação coronariana e reduzir o estresse pulsátil do sistema arterial (BELZ, 1995).

A artéria aorta (ilustrada na Figura 2) é constituída pela túnica adventícia, camada da artéria mais externa, composta por fibras de colágeno dispostas circunferencialmente, misturadas com elastina e rodeadas por tecido conjuntivo frouxo; pela túnica média, formada por unidades lamelares compostas de fibras de elastina, camadas de células de músculo liso vascular orientadas circunferencialmente, fibras de colágeno e substância de base. As lamelas da túnica média compreendem a maior parte do volume da parede arterial e são responsáveis pelas suas propriedades elásticas, o que permite que a artéria se expanda e contraia, de acordo com a força exercida sobre o vaso pela pressão sanguínea. Ela também é composto por células musculares lisas as quais são sustentadas pela MEC, essencialmente constituídas por colágeno, glicoproteínas, proteoglicanos e fibras elásticas, a maioria dos quais estão dispostas em folhas circulares (WAGENSEIL e MECHAM, 2009). Na porção exterior da túnica, existem também as camadas de células musculares lisas. Além disso, a aorta também é formada pela túnica íntima. Esta é composta por duas camadas. A primeira formada por uma lâmina basal, rica em proteoglicanos e pequena quantidade de colágeno, e por células endoteliais. As células endoteliais se ligam à membrana basal e alinham o lúmen arterial onde atuam como reguladores da homeostase vascular. A segunda camada é formada por uma túnica composta de fibras de elastina, células musculares lisas individuais e colágeno. A íntima é separada da média por fibras de elastina fenestradas da lâmina elástica interna. A elastina dentro da lâmina elástica interna é orientada longitudinalmente na direção do fluxo sanguíneo luminal (KOHN *et al.*, 2015).

A composição distinta de cada camada de artéria presta-se a propriedades mecânicas específicas de cada camada. As proteínas da MEC, como o colágeno e elastina, representam cerca de metade do peso seco do vaso e desempenham um papel crucial na mecânica da artéria. Colágeno tipo I e III representam 60% da parede da artéria e elastina 30%. No baixo grau de estiramento, as fibras de elastina compatíveis dominam a mecânica, enquanto que em níveis mais altos de deformação, as fibras de colágeno orientadas helicoidalmente são recrutadas. A fibra de colágeno é 100 a 1000 vezes mais rígida do que a elastina, causando um aumento acentuado no módulo de elasticidade incremental em níveis mais altos de alongamento circunferencial. Sob cargas de deformação fisiológica, o módulo elástico incremental é uma função da tensão e as contribuições combinadas de elastina e colágeno (KOHN *et al.*, 2015).

As fibras elásticas têm uma taxa de rotatividade extremamente baixa *in vivo*, e esta longevidade permite a acumulação de alterações relacionadas com a idade causadas por fragmentação, calcificação e degradação de metaloproteinase de matriz. À medida que as

fibras de elastina decaem, elas perdem a funcionalidade e deslocam o suporte de carga para fibrilas de colágeno mais rígidas, o que contribui diretamente para aumentos significativos na rigidez arterial. A falha de fadiga do estresse da parede pulsátil pode causar fragmentação de elastina ao longo da vida. O cálcio na parede arterial também aumenta com a idade, facilitando a ligação direta de íons de cálcio a fibras de elastina causando calcificação. Modelos animais que induzem elasto-calcinose elevadas mostram maior fragmentação mediana de elastina e rigidez arterial (KOHN *et al.*, 2015).

A idade também está associada a alterações na escala de aminoácidos que podem contribuir para a diminuição da complacência arterial causada por uma perda da funcionalidade da elastina. Notavelmente, embora o teor absoluto de elastina na aorta permaneça relativamente estável com a idade, a concentração de elastina diminui e é acompanhada por um aumento substancial na concentração de colágeno. Em contraste com a elastina, a concentração de colágeno nas três camadas da parede arterial aumenta com a idade, alterando o equilíbrio de elastina: o colágeno que controla a mecânica arterial saudável. A fibrose mediana ocorre como consequência de fibras de colágeno que substituem as células musculares lisas do vaso (KOHN *et al.*, 2015).

Os dois principais tipos de colágeno encontrados na aorta são os tipos I e III, chamado de colágenos fibrilares, representando cerca de 80-90% do colágeno total presente na aorta. Há também outros tipos de colágeno, como os IV, V, VI e VIII, mas em quantidades menores. Os principais constituintes da camada íntima, média e adventista da aorta são os colágenos fibrilares. Os tipos IV e V de colágeno estão situados no endotélio, nas células do músculo liso e membranas basais, juntamente com colágeno tipos I e III, pode ser encontrado colágenos do tipo IV e V. A função dos colágenos I e III na parede da aorta é de proporcionar propriedades biomecânicas e funcionais ao vaso. Observa-se que na região da aorta torácica descendente, colágenos do tipo I, III e IV (BERILLIS, 2013).

O colágeno do tipo I é encontrado em locais que resistem a grandes tensões como, em tendões, derme da pele, ossos e até mesmo na córnea. Este tipo forma fibras e feixes de colágeno. O colágeno do tipo III é abundante no tecido conjuntivo frouxo. Ele é encontrado na artéria aorta, pulmões, músculos dos intestinos, fígado e útero (KIELTY *et al.*, 2002).

Segundo Cantini *et al.* (2001) o colágeno é um componente de extrema importância para a parede da aorta. Sua quantidade pode se modificar com o envelhecimento que torna a parede da aorta mais rígida pelo aumento desse componente, além de sofrer influências de hormônios sexuais e de patologia como aneurismas, hipertensão arterial. Este último promove alterações estruturais das artérias produzindo uma hipertrofia da parede arterial. Essa doença

parece aumentar a síntese de tecido conjuntivo vascular e induzir ao aumento da síntese de colágeno, aumentando assim a quantidade total de colágeno na parede arterial (BERILLIS, 2013).

As fibras elásticas têm uma taxa de *turnover* extremamente baixo, indicando uma longevidade grande para essa proteína. Essa longevidade expõe as fibras elásticas ao processo de envelhecimento, causando fragmentação, calcificação e degradação proporcionadas pelas metaloproteinases de matriz (MMP). À medida que as fibras de elastina vão sendo degradadas ocorre a perda de funcionalidade. Isso faz com que o suporte de carga seja repassado das fibrilas para o colágeno. Esses acontecimentos contribuem de maneira direta para o aumento da rigidez arterial. Mas esse não é o único efeito decorrente da idade. Com o envelhecimento há deposição de cálcio na parede arterial, o que facilitando a ligação direta de íons de cálcio às fibras de elastina, o que irá promover calcificação da elastina (KOHN *et al.*, 2015).

Como citado acima, a elastina sofre degradação pelas MMPs. Estas possuem baixa atividade basal em artérias saudáveis, o que equilibra a ausência da síntese de elastina. Por outro lado, com o envelhecimento, a atividade das MMPs, como a MMP-2 é aumentada, o que promove uma maior degradação da elastina, mas ainda com uma baixa síntese dessa proteína. A hipertensão arterial pode causar uma desregulação da atividade das MMPs. Tal desregulação pode levar a uma diminuição da quantidade, e funcionalidade, da elastina e a um aumento do conteúdo de colágeno na artéria aorta (PAPAZAFIROPOULOU e TENTOLOURIS, 2009; KOHN *et al.*, 2015).

Ainda é incerto como as células musculares lisas atuam na gênese da rigidez arterial. Em grandes artérias, essas células estão predominantes dentro da parede do vaso. Estima-se que elas representem cerca de 25 a 35% do volume total. Elas desempenham um papel importante na regulação do tônus vascular, que pode ter impacto importante sobre a hipertensão. Em grandes artérias, as células musculares lisas também são responsáveis por absorver a pressão pulsátil. Sob condições crônicas, elas se hipertrofiam em resposta ao aumento do estresse mecânico (SEHGEL *et al.*, 2015).

2.8 Reatividade vascular

O endotélio possui função tanto autócrina quanto parácrina, além de regular a secreção de substâncias que controlam o tônus e a estrutura vascular. O endotélio produz múltiplos fatores relaxantes, tais como o óxido nítrico (NO) e prostaciclina, além de fatores constritores,

como endotelinas (isoformas 1, 2 e 3). O NO é o fator relaxante melhor caracterizado e mais importante. Ele é derivado da L-arginina pela atividade da sintetase do NO endotelial (eNOS). O NO tem uma produção e liberação basal, além de outra que é dependente de vários agonistas, como a acetilcolina, a bradicinina, substância P e serotonina, além de outros (MATTEI *et al.*, 1997).

Em 1980, foi descoberto por Furchgott que as células endoteliais produzem um fator relaxante derivado do endotélio (EDRF), em resposta a estimulação por acetilcolina em vasos com endotélio intacto. Neste estudo o relaxamento vascular por acetilcolina e um número de outros agonistas verificou-se dependente da presença de células endoteliais, as quais, quando estimulado pelo agonista liberava uma substância difusível, lábil não prostanóide, os EDRFs, que agiam sobre o músculo vascular liso para produzir relaxamento (YETIK-ANACAK e CATRAVAS, 2006).

Hoje, são conhecidas três isoformas do óxido nítrico sintase (NOS), responsável pela produção do NO no organismo: uma forma constitutiva que está presente no endotélio (eNOS), a nNOS, que é uma isoforma constitutiva presente nos neurônios, e a iNOS, que é expressa nos macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, músculo liso vascular e células endoteliais em resposta a estímulos patológicos (DAWSON *et al.*, 1992).

O NO é um gás de difusão muito rápida com meia vida de aproximadamente 5 segundos *in vitro* e de 0,1 segundos *in vivo*. Sintetizado a partir da oxidação do aminoácido L-arginina, reação mediada pela NOS, com formação simultânea de L-citrulina (YETIK-ANACAK e CATRAVAS, 2006).

Já se sabe que o NO está relacionado a diversas patogêneses de doenças que vão desde a hipertensão ao choque séptico e demência. Por essa razão, ele tem sido alvo de muitas pesquisas com o intuito de um melhor entendimento de seus mecanismo e possíveis intervenções para que se possa intervir em doenças as quais estão relacionadas ao NO (YETIK-ANACAK E CATRAVAS, 2006).

O nitroprussiato de sódio, um nitrovasodilatador, foi descoberto em 1850. Ele é capaz de cruzar a barreira hematoencefálica. Seus efeitos hipotensores em seres humanos foram descritos pela primeira vez em 1929. Ele sofre degradação espontânea no organismo em condições fisiológicas normais. Este sal serve como fonte de NO (BARRY, 1989).

Uma maneira de se lidar com os vários fatores de risco na doença cardiovascular pode ser o tratamento da disfunção endotelial. Todos os fatores de risco estão relacionados à disfunção endotelial. A este respeito, otimizar a função da eNOS pode ser uma alternativa razoável. Isto pode ser realizado por co-fatores, por exemplo o BH₄, ou substrato de L-

arginina, ou ainda por aumento da disponibilidade de GMPc, além do aumento da biodisponibilidade através de antioxidantes. Vários estudos relatam um efeito modulador da suplementação de L-arginina na produção de NO *in vivo* sob condições conhecidas como estando associado com a disfunção endotelial, podendo ser citado a hipercolesterolemia, a hipertensão, o envelhecimento e o diabetes (YETIK-ANACAK e CATRAVAS, 2006).

No sistema cardiovascular, o NO influencia a homeostase vascular em muitos aspectos, não somente na modulação da vasomotricidade, mas também como inibição de proliferação de células musculares, a agregação de placas, plaquetas e monócitos de adesão ao endotélio, a oxidação da LDL, a expressão de moléculas de adesão e produção de endotelina. Defeitos nestas funções geralmente resultam na diminuição da biodisponibilidade devido ao aumento do estresse oxidativo, diminuição da atividade da enzima antioxidante, etc, e são responsáveis por doenças como a aterosclerose doença arterial coronariana, diabetes, hipercolesterolemia, hipertensão, dentre outras (YETIK-ANACAK e CATRAVAS, 2006).

Uma forma de lidar com os vários fatores de risco na doença cardiovascular pode ser o tratamento de disfunção endotelial. Todos os fatores de risco estão relacionados à disfunção endotelial. Não há como negar que a disfunção endotelial e disfunção na produção do NO são características das doenças cardiovasculares, incluindo as doenças que são consideradas como os principais problemas de saúde pública atuais: como a hipertensão, a obesidade, a diabetes (DUSSE, 2003).

Furchgott e Zawadzki, em 1980, demonstraram que a presença do endotélio é necessária a fim de se observar o relaxamento das artérias isoladas para acetilcolina. Esta descoberta, além de ter levado à identificação do cátion da L-arginina, mas a via da NOS e o papel do NO como um mensageiro intercelular, levou à busca de outros fatores vasoativos derivados do endotélio, determinado como fator derivado do endotélio hiperpolarizante (EDHF) e fator contrátil do endotélio (EDCF) (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980).

2.9 Estrogênio e disfunção endotelial

Os hormônios estrogênios são hormônios esteróides potentes presentes em níveis elevados em mulheres desde a adolescência até a menopausa. Os estrogênios têm propriedades protetoras de doenças cardiovasculares (XING *et al.*, 2009; DESCHAMPS *et al.*, 2010). Alteram as concentrações lipídicas séricas, os sistemas coagulantes e fibrinolíticos, os sistemas antioxidantes e a produção de outras moléculas vasoativas, como o NO e

prostaglandinas, que podem influenciar o desenvolvimento de doenças vasculares (KARAS *et al.*, 1999). O estrogênio modula as respostas vasculares aumentando a atividade da eNOS através da via da Akt que aumenta a liberação de NO (FLORIAN *et al.*, 2004).

O estrogênio atua no corpo ligando dois receptores, localizados em células endoteliais e células de músculo liso vascular: ER- α e ER- β para exercer seus efeitos clássicos (LINDNER *et al.*, 1998). Estes receptores atuam como fatores de transcrição ativados por ligação ou estão associados com a membrana plasmática que promove a ativação rápida de cascatas de sinalização intracelular (CHAMBLISS *et al.*, 2000).

Os mecanismos dependentes de receptores de estrogênio que regulam o tônus vascular incluem a vasodilatação independente do endotélio, aumento da biodisponibilidade do NO, a inibição do crescimento e proliferação das células do músculo liso vascular, inibição do sistema renina-angiotensina-aldosterona e do sistema endotelina, e inibição do sistema nervoso simpático. Além disso, os receptores de estrogênio ER- α e ER- β , acoplados à proteína G (GPER) (anteriormente conhecido como GPR30), são altamente expressos na célula do músculo liso vascular humano e artérias. Um estudo dos primeiros estudos mostrou que a ativação seletiva de GPER provoca vasodilatação aguda em artérias de humanos e roedores. O GPER seletivo pode reduzir a pressão sanguínea *in vivo* mesmo sob condições normotensas e inibe a proliferação de células do músculo liso vascular humano (CHAMBLISS *et al.*, 2000).

O NO é uma importante molécula vasoprotetora que pode ser sintetizada por eNOS em células endoteliais. O estrogênio pode ativar eNOS através da via não genômica PI3K e Akt, promovendo a rápida produção de NO. Além disso, o NO também exerce um papel anti-inflamatório nas células endoteliais com diminuição do recrutamento de leucócitos e da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Portanto, as inibições de geração de espécies reativas de oxigênio e o aumento da biodisponibilidade de NO podem ser moduladas como estrogênios endógenos. Nas mulheres pós-menopausadas, o estresse oxidativo tem sido relacionado à função anormal das células endoteliais e no desenvolvimento da hipertensão. A elevação da pressão arterial observada após a menopausa também envolve outros fatores, como a obesidade e o envelhecimento e a rigidez arterial devido à presença de aterosclerose. A disfunção endotelial é caracterizada por uma redução da biodisponibilidade dos vasodilatadores e aumento da liberação de vasoconstritores, sendo considerada capaz de prever e também estar associada a alterações cardiovasculares (BOUSKELA *et al.*, 2014).

Em estudos em anéis arteriais isolados, um aumento na concentração de cálcio do meio resultou em contração dos anéis arteriais, mas este efeito foi inibido de forma dose-

dependente pela adição de 17β -estradiol. Esse hormônio também inibe as correntes de cálcio para dentro e reduz o cálcio livre intracelular em miócitos cardíacos isolados. Além disso, o estrogênio ativa canais de potássio para causar o relaxamento da artéria coronária. Em concentrações suprafisiológicas, o estrogênio inibe o influxo de cálcio extracelular para as células do músculo liso vascular por um efeito nas membranas celulares ou nos canais de cálcio do tipo L. Jiang *et al.* (1992) mostraram um aumento na concentração de cálcio em anéis aórticos isolados, mas este efeito foi inibido de uma forma dependente da dose pela adição de 17β -estradiol.

2.10 Remodelamento do vaso e metaloproteinase de matriz -2 (MMP-2)

Atuando no remodelamento tecidual, as MMPs, também conhecidas como matrixinas, constituem uma família de endopeptidases zinco-cálcio dependentes. Elas foram descobertas em 1962 por Jerome Gross e Charles M. Lapierre quando estudavam a degradação de colágeno de estrutura tripla-helicoidal durante a metamorfose de cauda de girinos. As MMPs auxiliam na organização e diferenciação das células, além de ajudar nas trocas de informações entre as células. Elas desempenham um papel importante na degradação de componentes da matriz extracelular (MEC). Esta é formada por matriz fibrilar, constituída de colágeno e elastina, e substância fundamental, composta por proteoglicanos, glicosaminoglicanos, glicoproteínas, fatores solúveis, água e nutrientes (ZITKA *et al.*, 2010). A MEC é responsável por propiciar suporte e estrutura às células e aos tecidos. As MMPs degradam tanto o colágeno intersticial, quanto a fibronectina, a laminina, dentre outros componentes da MEC (BIRKEDAL-HANSEN, 1995).

As MMPs são estritamente reguladas em diferentes níveis celulares, transcricionais, pós-transcricionais e pós-traducionais. Além disso, as MMPs são controladas através de seus inibidores de Metaloproteinase Tecidual (TIMPs) endógenos, que estão em equilíbrio com as MMPs em uma razão de 1:1, e por sua localização intra e extracelulares (KANDASAMY *et al.*, 2010). A diminuição dos níveis das TIMPs concorre para aumentar as atividades dessas MMPs (SCHULZ, 2007).

A classificação das MMPs é realizada por números. Historicamente as MMPs foram organizadas de acordo com os substratos de matriz extracelular que elas degradavam primeiramente quando foram descobertas. Hoje já se conhece cerca de 28 MMPs, descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Classificação das metaloproteinases de matriz e alguns substratos.

Designação	Nome comum	Alguns substratos
MMP-1	Colagenase-1	Colágeno fibrilar
MMP-2	Gelatinase A	Fibronectina, vitronectina colágeno tipo I e IV
MMP-3	Estromelisina-1	
MMP-7	Matrilisina	Elastina
MMP-8	Colagenase-2	
MMP-9	Gelatinase B	Fibrina, Elastina
MMP-10	Estromelisina-2	
MMP-11	Estromelisina-3	
MMP-12	Metaloelastase	Elastina
MMP-13	Colagenase-3	Colágeno tipo II
MMP-14	MT1-MMP	Colágenos fibrilares
MMP-15	MT2-MMP	Fibrina
MMP-16	MT3-MMP	Colágenos fibrilares
MMP-17	MT4-MMP	
MMP-19	RASI-1	
MMP-20	Enamelisina	Amelogenina
MMP-23	CA-MMP	

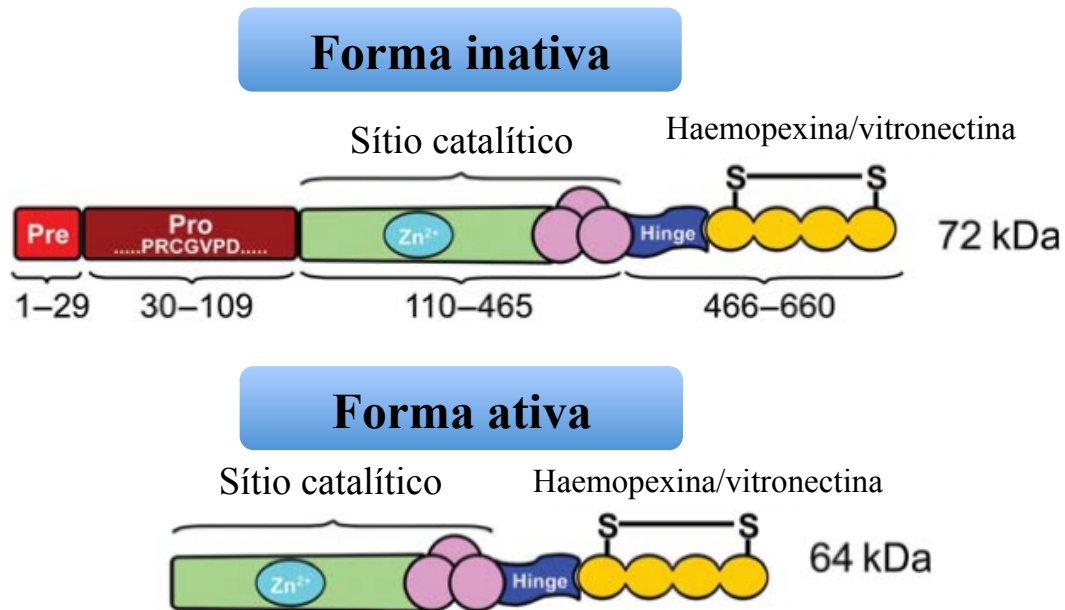
MMP-24	MT5-MMP
MMP-25	Leocolisina
MMP-26	Endometase, Matrilisina-2
MMP-28	Epilisina

Fonte: adaptado de Amalinei *et al.* (2007).

A MMP-2, também conhecida como gelatinase A, é encontrada em quase todos os tipos de células. Essa MMP degrada o colágeno desnaturado (gelatina) e intacto do tipo IV, um dos principais componentes da membrana basal, assim como outras proteínas de MEC (CHOW *et al.*, 2007).

Estruturalmente, as características comum entre as MMPs é a sequência N-terminal. Essa sequência permite a segmentação sub-celular e exportação da enzima extracelular. As MMPs são sintetizadas na forma de um zimogênio inativo. Esse zimogênio possui um domínio pró-peptídeo auto-inibitório (Figura 3). Esse domínio pró-peptídeo é como se fosse um escudo próximo ao sítio catalítico contendo Zn_2^+ . O domínio de pro-peptídeo também possui uma sequência altamente conservada de PRCGVDP, contribui para a ligação do tiol da cisteína com o Zn_2^+ no domínio catalítico. Isso impede o acesso do substrato ao sítio catalítico da MMP. A sequência de PRCGVDP desempenha um papel importante na regulação da atividade dessas matrixinas. A MMP-2, assim como a 9, possui um domínio catalítico único dentre as MMPs. A fibronectina do tipo II no domínio catalítico da MMP-2 forma uma ligação com o domínio do colágeno, o que permite a degradação de colágeno tipo IV (KANDASAMY *et al.*, 2010).

Figura 3 - Estrutura da MMP-2 em suas isoformas inativa de 72 kDa (Pró) e ativa de 64 kDa (Ativada)



Legenda: A sequência de sinal N-terminal (indicada como "pré") é seguida pelo domínio pró-peptídico. O sítio catalítico contém o local de ligação do Zn²⁺. Um resíduo de cisteína no domínio pró-peptídico auto-inibitório interage com o Zn²⁺ para evitar a ligação do substrato. MMP-2 (e MMP-9) é única a partir de outras MMPs em que o domínio catalítico contém três repetições de fibronectina (círculos rosa). As repetições de fibronectina pode se ligar ao colágeno desnaturado, melhorando sua interação com seus substratos. Um domínio carboxi-terminal com repetições de hemopexina conectado ao domínio catalítico por uma região do tipo dobradiça media a interação com os substratos enzimáticos. Fonte: Adaptado de Kandasamy *et al.* (2010).

As MMPs são expressas inicialmente como enzimas latentes comumente referidas como Pró MMP, com massa molecular de 72 kDa, sendo essa forma latente que pode ser ativada posteriormente por clivagem proteolítica no compartimento pericelular e extracelular. Em humanos, a Pró MMP (72 kDa) é ativada pela ação combinada da MMP-14 e a TIMP-2. Dessa maneira, ela se torna uma proteína enzimaticamente ativa, com massa molecular de 64 kDa. Porém, a Pró MMP de massa molecular de 72 kDa também pode ser ativada por outra via, através pelo estresse oxidativo, sem a remoção proteolítica do domínio de pró-peptídeo (KANDASAMY *et al.*, 2010).

As MMPs são estreitamente reguladas em vários níveis, incluindo regulação transcricional, pós-transcricional e pós-traducional. Além disso, as MMPs são controladas através dos seus inibidores endógenos, as TIMPs, e pela sua localização intra e extracelular. A ativação da MMP-2 é regulada pelo seu status de fosforilação. O estado de fosforilação de proteínas pode ser modulada pelo equilíbrio entre a ação de várias proteínas kinases e

fosfatases (KANDASAMY *et al.*, 2010). Além disso, outros fatores estimulam tanto a atividade quanto a síntese das MMPs, como a hipertensão, a dislipidemia, o estado inflamatório e o estresse oxidativo (SCHULZ, 2007; POSA *et al.*, 2015a).

Recentemente um estudo (LAM *et al.*, 2009) encontrou que em animais OVX, a atividade da MMP-2 tinha uma redução acentuada na aorta torácica. No mesmo estudo também foi observado um aumento significativo na deposição de colágeno no vaso. Esses efeitos foram revertidos pela reposição de hormônio estrogênio. Assim, a inibição da atividade da MMP-2 leva ao acúmulo de colágeno vascular, o que pode estar envolvido na elevação da pressão sanguínea causada pela OVX. Por outro lado, em ensaios clínicos de hipertensão arterial, observa-se aumento da expressão da proteína MMP-2, analisados no plasma de pacientes com hipertensão (ZERVOUDAKI *et al.*, 2004). Outros dados encontrados na literatura mostraram resultados semelhantes, evidenciando que as concentrações plasmáticas de MMP-2 ativa estavam diminuídas em pacientes com hipertensão essencial (ZERVOUDAKI *et al.*, 2003).

2.11 Treinamento resistido

O exercício físico é uma atividade física planejada, estruturada e repetitiva. Tem o objetivo de melhorar a saúde e a aptidão física, por meio de benefícios agudos e crônicos, atuando também como efeito hipotensor nos valores pressóricos da hipertensão arterial (ASIKAINEN *et al.*, 2004). Outro benefício importante da prática do exercício físico é que ela contribui sobremaneira para a redução de custos com medicamentos (ROLIM, 2007).

Estuda-se tipos de exercícios com o objetivo de melhorar a condição de saúde de mulheres na pós-menopausa, tais como: o exercício aeróbio, o exercício resistido e a combinação de ambos, também conhecido como exercício concorrente (ASIKAINEN *et al.*, 2004).

Dentre os meios de exercícios acima citados, o treinamento resistido (TR), promove aumento do fluxo sanguíneo durante o mesmo. Este aumento do fluxo sanguíneo promove o estresse de cisalhamento elevado na aorta que pode levar a melhora do relaxamento do vaso dependente do endotélio (HIGASHI e YOSHIZUMI, 2004). Este estresse de cisalhamento estimula potentemente a liberação de algumas substâncias como NO, PGI₂ e EDHF (GIELEN *et al.*, 2001; HUANG *et al.*, 2005). A força mediada pelo esforço de cisalhamento no endotélio, ativa a formação de GMPc. A NOS do tipo III é responsável pela catálise da produção de NO a partir do aminoácido catiônico L-arginina. A mudança na força de

cisalhamento ativa NOS por meio de mudanças no cálcio intracelular ou por meio do processo mediado pelo receptor. O NO liberado ativa a guanilato ciclase solúvel em células de músculo liso, convertendo GTP em GMPc. Este processo é capaz de ativar a proteína quinase que leva à inibição do influxo de cálcio na célula do músculo liso e diminuição da estimulação de cálcio-calmodulina da quinase de cadeia leve da miosina. O resultado é a diminuição da fosforilação das cadeias leves da miosina, diminuindo o desenvolvimento da tensão do músculo liso e causando vasodilatação (GALLEY e WEBSTER, 2004). Outra explicação é que a TR melhora a vasodilatação provavelmente por meio da liberação endotelial aumentada de óxido nítrico, prostaciclina e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (LAUFS *et al.*, 2004).

O TR é caracterizado por contrações voluntárias da musculatura esquelética de um determinado segmento corporal contra alguma resistência externa. Esta pode ser oferecida pela própria massa corporal (exercícios calistênicos), por pesos livres ou por equipamentos com pesos, como os aparelhos de musculação, além de elásticos, dentre outros (FLECK e KRAEMER, 1999). Esses exercícios podem ser executados com diferentes intensidades, sendo classificados em exercícios de resistência muscular localizada, quando executados com intensidade leve, que varia de 40% a 60% de uma repetição máxima (1RM), e com várias repetições, ou ainda podem ser classificados como exercícios de força e hipertrofia muscular, quando executados com intensidade de carga superior a 70% de 1RM e com número de repetições menores (FLECK e KRAEMER, 1999).

Estudos prévios mostraram que durante os exercícios resistidos de baixa intensidade houve um aumento agudo tanto da PAS quanto da PAD em cardiopatas, porém essa elevação foi pequena e considerada segura (HASLAN *et al.*, 1988; WIECEK *et al.*, 1990). Em indivíduos jovens e idosos saudáveis e em hipertensos ocorreu apenas um pequeno aumento da PAS (HARRIS e HOLLY, 1987; WIECEK *et al.*, 1990). Os estudos sobre o tema ainda são escassos considerando as respostas pressóricas após a realização do exercício resistido, principalmente em mulheres hipertensas na menopausa. Além disso, estudos realizados com indivíduos normotensos apresentam resultados bastante controversos, o que poderia estar relacionado com a intensidade do exercício físico realizado (FORJAZ *et al.*, 2003). Ressalto aqui que os efeitos citados são para pressão arterial durante o exercício. Mesmo assim, a elevação da PAS e PAD é seguro para essa população. Além disso, como discutido a frente, exercícios físicos como os resistidos podem promover diminuição da PAS em indivíduos hipertensos, mostrando ser uma intervenção segura e útil para a prevenção, o controle e até mesmo para a diminuição da PAS.

Discutindo efeitos pós-exercícios resistidos, um estudo envolvendo indivíduos hipertensos observou uma diminuição da pressão arterial sistólica após exercícios resistidos (FISHER *et al.*, 2001). Outro trabalho também foi observado uma diminuição tanto na PAS quanto na pressão arterial diastólica após exercício resistido (HARDY e TRUCKER, 1998). Rezk (2004) demonstrou que em indivíduos normotensos que realizaram TR, tanto de baixa (40% da carga voluntária máximo - CVM) quanto de alta (80% da CVM) intensidade ocorre redução da pressão arterial, sendo a maior queda verificada nos exercícios de menor intensidade. Além disso, o TR é eficiente em atenuar outras alterações fisiológicas decorrentes da menopausa como, sarcopenia (diminuição da massa muscular), osteopenia (diminuição da massa óssea), mudanças na composição corporal, perfil lipídico e deposição de gordura (LEITE *et al.*, 2010).

Outros efeito atribuídos do TR são: a diminuição da massa corporal, do IMC e da gordura corporal, analisando vários tipos de protocolos em várias intensidades. Um estudo de Orsatti *et al.* (2008) mostrou que há aumento na massa muscular e nenhuma mudança significativa na massa corporal e na gordura corporal em mulheres pós-menopausa que realizaram um programa de exercício resistido de três séries de 8 a 12 repetições com carga de 60 a 80% de 1RM, assim como outros trabalhos.

Um estudo, que analisou os efeitos da associação do TR com dieta de RC encontrou que, em mulheres na pós-menopausa, esta associação promove uma diminuição do peso, do IMC e da deposição de gordura abdominal e visceral, tornando-se importante para amenizar estas complicações decorrentes da menopausa (BROCHU *et al.*, 2009).

Frost *et al.* (1997) e Bembem *et al.* (2000) em seus estudos, observaram que a perda de massa muscular relacionada com a idade precede a perda óssea e que estes dois processos estariam relacionados, sendo assim, o aumento da força muscular tem sido associado com a prevenção da perda de densidade óssea mineral. Dessa forma, Bocalini *et al.* (2009) mostraram que o treinamento resistido promove modificações positivas também na massa óssea em mulheres pós-menopausa sem a utilização da terapia hormonal.

Nesse sentido, de acordo com Leite *et al.* (2010), o exercício resistido pode ser uma ferramenta adicional para prevenir e tratar os efeitos deletérios da menopausa, porém ainda são necessários mais estudos para entender os mecanismos responsáveis por esses efeitos e a influência desse tipo de exercício, para assim determinar as melhores condições para o treinamento resistido.

Um estudo utilizando exercícios combinados de TR e aeróbio por 12 semanas e com intensidade incremental ao longo do período entre 40 a 70% da frequência cardíaca de reserva

a cada 4 semanas, mostrou que a rigidez arterial, diminui a frequência cardíaca e a PAS, além de melhorar a capacidade funcional em mulheres na pós-menopausa hipertensas em estágio 1 (SON *et al.*, 2017).

2.12 Restrição calórica

Segundo Roth e Ingram (2016) a RC é baseada em se restringir a ingestão de uma dieta nutritiva em cerca de 20 a 60% do consumo *ad libitum*, sem que essa promova má nutrição. A RC pode elevar a longevidade, assim como a saúde, retardando o aparecimento de doenças, com manutenção da função fisiológica e comportamental ligadas ao envelhecimento, em roedores.

As intervenções de RC são usadas para promover diminuição de peso, tratar sintomas da diabetes, assim como melhorar o sistema cardiovascular. Além disso, a RC é vista mais do que uma simples intervenção. Ela é utilizada para se entender melhor os mecanismos relacionados a longevidade. Em modelos animais a RC é utilizada para aumentar de maneira drástica a expectativa de vida desses animais (TOMIYAMA, 2012).

Até o momento, a RC é a única intervenção não genética que tem sido consistentemente encontrada para prolongar a vida média e máxima em uma variedade de espécies. Ratos alimentados com dietas restritivas de 55 a 65% durante a sua vida apresentaram uma média de 35 a 65% maior de tempo de vida máxima comparados aos que eram alimentados com dieta *ad libitum*. Mesmo com uma RC de 20 a 40%, considerada moderada, tais efeitos permanecem presentes mesmo quando implementada em ratos de meia-idade (ANTON e LEEUWENBURGH, 2013).

Existem duas estratégias gerais que os pesquisadores podem usar para determinar se a RC pode aumentar a expectativa vida. A primeira estratégia é atribuir aleatoriamente os participantes a um grupo de RC ou de controle e medir marcadores de longevidade/envelhecimento. Uma segunda maneira é encontrar modelos já existentes de redução de calorias em seres humanos, que são paralelos aos modelos animais. Mas não é tão simples, pois a pesquisa com seres humanos não realiza o controle total da ingestão de alimentos e nem a aderência completa a uma manipulação de RC. O ser humano é culturalmente induzido a comer (TOMIYAMA, 2012).

Os mecanismos responsáveis pelos efeitos benéficos da RC ainda não estão claros na literatura. Especula-se que as alterações metabólicas induzidas pela a RC, como a inibição da

deposição de gordura no tecido adiposo e não adiposo, possam, pela sua influência na transdução de proteínas, estar envolvidas em vias de sinalização celulares (XIANG e HE, 2011).

Em um estudo de Lee *et al.* (2010), em que avaliaram os níveis sanguíneos de adipocinas pró-inflamatórias de coreanas após a redução de peso utilizando a RC, observaram redução significativa do TNF- α e leptina, acompanhada pelo aumento de adiponectina. Nesse sentido, uma pesquisa conduzida por Agueda *et al.* (2012) mostrou redução do peso e da gordura corporal, aumento da concentração de visfatina sanguínea e melhora na sensibilidade à insulina em mulheres com IMC entre 30 a 39 Kg/m² após 12 semanas de restrição calórica.

Estudo de Prasannarong *et al.* (2012) em que ratas OVX foram submetidas a 12 semanas de RC (restrição de 35% do consumo habitual) demonstrou redução de massa corporal, de concentração de insulina e de glicose quando comparadas com ratas OVX sem RC. Diante deste resultado os autores concluíram que a RC pode impedir o desenvolvimento da resistência à insulina no músculo esquelético.

Tem sido relatado na literatura que a RC com uma dieta de baixa proteína pode melhorar fatores de risco para a aterosclerose, incluindo PA, colesterol total e triglicerídeos (WALFORD *et al.*, 1992). Confirmando esses resultados, Fontana *et al.* (2004) observaram que a RC contribui para a diminuição da PAS, dentre outros parâmetros cardiometabólicos, em mulheres e homens entre 35 e 82 anos de idade .

Complementando o citado acima, a RC é capaz de reduzir o estresse oxidativo no vaso, produzido pela OVX que inativa a biodisponibilidade do NO, o que promove a disfunção endotelial. A diminuição do estresse oxidativo atenua o grau de inativação do NO pelas EROs, melhorando assim a biodisponibilidade do NO (ZANETTI *et al.*, 2010) no endotélio e na função do músculo liso vascular, normalizando a produção de NO (WYCHERLEY *et al.*, 2008). A RC pode modular a atividade da óxido nítrico endotelial (eNOS) e sua expressão por ativação de sirtuína 1 (SITR-1), ambas localizadas em células endoteliais. A SITR1 desacetila a eNOS, estimulando sua atividade com aumento do NO endotelial levando à normalização da função do endotélio (MATTAGAJASINGH *et al.*, 2007).

3. JUSTIFICATIVA

O crescente aumento da expectativa de vida da população, com consequente aumento do maior número de mulheres na menopausa, e das doenças associadas a ela, induz cada vez mais a comunidade científica, as indústrias farmacêuticas e os profissionais da área da saúde a buscarem novos conhecimentos e estratégias para prevenir e tratar suas comorbidades.

Estudos mostram que, nesse momento, a mudança de estilo de vida parece ser a melhor estratégia para o controle dos fatores de risco em mulheres menopausadas (KULLER *et al.*, 2001; WILDMAN *et al.*, 2004; WHITCROFT e HERRIOT, 2011). Pessoas fisicamente ativas possuem maior longevidade e menor taxa de mortalidade e morbidade, com menor risco de desenvolver síndrome metabólica, hipertensão, cardiomiopatias, aterosclerose, osteoporose, câncer, diabetes, doenças autoimunes, neurodegenerativas e respiratórias, entre outras (DiPIETRO, 2010).

Estratégias nutricionais, como a restrição calórica (RC), dieta com redução do consumo de calorias em torno de 20 a 40% *ad libitum* e adequada em nutrientes, tem sido indicada como excelente medida de redução de risco para doenças relacionadas à menopausa (PUG *et al.*, 1999; TREPANOWSKI *et al.*, 2011).

O exercício físico, associado à restrição calórica, pode ser boa estratégia não farmacológica, e de baixo custo, capaz de prevenir a elevação da pressão arterial sistólica, além de melhorar a qualidade de vida das mulheres menopausadas.

Contudo, mesmo com muitas informações a cerca dos efeitos agudo e crônicos do exercícios resistido, assim como os efeitos no organismo da restrição calórica, pouco se sabe da influência destes sobre a prevenção da obesidade, em alterações da reatividade vascular dependente e independente do endotélio da artéria aorta torácica, na resposta insulínica do organismo, de uma possível modificação dos constituintes dessa artéria como no conteúdo de colágeno I e III, nas fibras elásticas, assim como na atividade da metaloproteinase de matriz do tipo 2 (colagenase A). Modificações essas as quais podem prevenir o surgimento da hipertensão arterial na ausência de hormônios ovarianos, como observado tanto na menopausa em humanos quanto na ovariectomia em animais.

4. OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo é investigar os efeitos da ovariectomia em ratas *Holtzman* sobre a pressão arterial sistólica e o remodelamento da artéria aorta torácica. Também teve como objetivo investigar os possíveis efeitos preventivos do TR, da RC e da associação de ambos (TR+RC) sobre a pressão arterial sistólica e o remodelamento da artéria aorta torácica.

4.1 Objetivos específicos

O presente trabalho tem como objetivos específicos investigar os efeitos da ovariectomia e das intervenções de TR, RC e da associação de ambos (TR+RC) sobre:

- 1-) A indução da obesidade analisado pelo Índice de Lee;
- 2-) A resposta insulínica;
- 3-) A evolução da pressão arterial sistólica;
- 4-) A frequência cardíaca;
- 5-) A reatividade vascular dependente e independente do endotélio;
- 6-) A atividade da MMP-2;
- 7-) A morfometria da parede vascular da aorta;
- 8-) O conteúdo de colágeno I e III;
- 9-) A estrutura e fibras elásticas da parede da aorta torácica.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFSCar, nº 004/2013 (Anexo A). Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas 50 ratas *Holtzman*, com idade inicial de 30 dias, provenientes do biotério da Universidade Estadual de São Paulo Júlio de Mesquita Filho - UNESP, Campus de Araraquara, São Paulo. Os procedimentos foram realizados no Biotério do Laboratório de Fisiologia do Exercício, no Departamento de Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal de São Carlos. Os animais foram mantidos em caixas individuais com maravalhas, sob condição padronizada de iluminação com luz acesa às 19 horas (ciclo invertido 12 horas escuro/claro), com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Todos os cuidados e procedimentos realizados com os animais seguiram as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Durante todo o período de adaptação os animais tiveram livre acesso à água e a ração. Após este período os animais com restrição calórica tiveram o consumo de ração controlado. O manejo dos animais ocorreu em horário fixo, com início às 11:00 horas, sendo realizado limpeza do biotério, das caixas, troca de maravalha, limpeza de garrafas de água, oferta de ração, treinamento físico e pesagem dos mesmos, encerrando-se às 16:00 horas.

5.2 Controle da massa corporal e consumo alimentar

A massa corporal de cada animal foi pesada diariamente durante todo o período experimental utilizando-se uma balança da marca Maste[®], modelo AS 2000C, com menor fração de 0,01g e divisões de verificação de 0,1g, regulada pelo INMETRO.

A massa corporal individual foi obtida através da diferença da massa do dia anterior e da massa corporal no dia da pesagem, podendo ser simplificada como a diferença da massa corporal final menos a massa corporal inicial, expressa em gramas (g).

$$\text{Massa corporal} = \text{massa corporal final} - \text{massa corporal inicial.}$$

Da mesma maneira, o consumo alimentar foi calculado através da diferença entre a ração ofertada e sobra da ração ofertada, expresso em gramas (g).

Os valores obtidos para cada variável foram anotados em fichas individuais.

$$\text{Consumo alimentar} = \text{ração ofertada} - \text{sobra da ração ofertada.}$$

5.3 Grupos experimentais

Após o período de recuperação pós-cirúrgico de ovariectomia, explicado no item 5.4 abaixo, foi realizada a distribuição aleatória dos animais nos grupos experimentais (n=10) descritos abaixo:

1-) Grupo Sham sedentário (Sham-SED), composto por animais que não tiveram os ovários removidos, não realizaram o protocolo de treinamento resistido e receberam a ração controle;

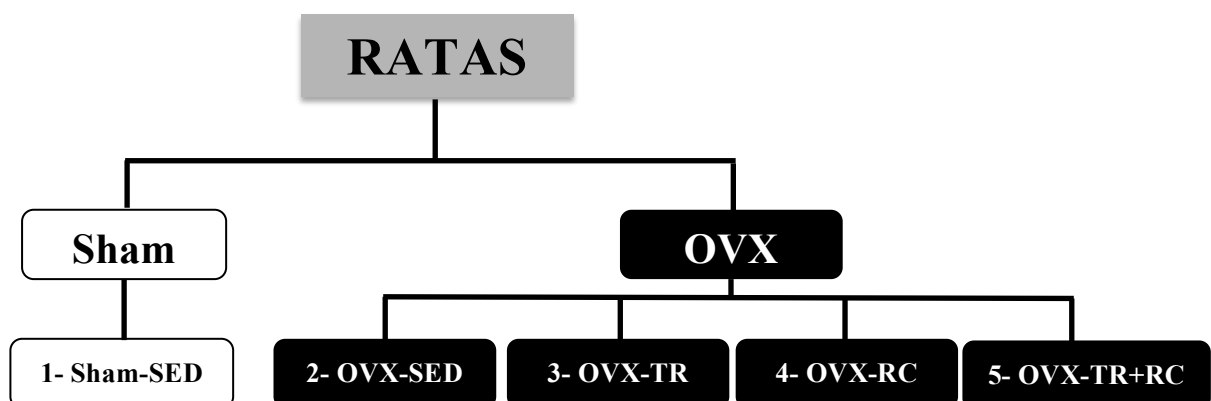
2-) Grupo Ovariectomizado sedentário (OVX-SED), composto por animais que foram submetidos a cirurgia de ovariectomia, não realizaram o protocolo de treinamento resistido e receberam a ração da dieta restritiva;

3-) Grupo Ovariectomizado treinado (OVX-TR), composto por animais que foram submetidos a cirurgia de ovariectomia e ao protocolo de treinamento resistido, alimentados com a ração controle;

4-) Grupo Ovariectomizado sedentário com restrição calórica (OVX-RC), composto por animais que foram submetidos a cirurgia de ovariectomia, não realizaram o protocolo de treinamento resistido e receberam a ração da dieta restritiva;

5-) Grupo Ovariectomizado treinado associado à restrição calórica (OVX-TR+RC), composto por animais que foram submetidos a cirurgia de ovariectomia, ao protocolo de treinamento resistido e, concomitantemente, ao protocolo de dieta restritiva (Figura 4).

Figura 4 - Distribuição dos grupos experimentais.



Fonte: Autor. Legenda: OVX, ovariectomia; TR, treinamento resistido; RC, restrição calórica (N=10).

5.4 Procedimentos cirúrgicos da ovariectomia (OVX) e Sham

Os procedimentos cirúrgicos da OVX foram realizados nas dependências do biotério do Laboratório de Fisiologia do Exercício, na Universidade Federal de São Carlos - UFSCar.

Os animais dos grupos OVX foram pesados e anestesiados com uma associação de 13mg/Kg de Xilazina (Rompum - Bayer - São Paulo, SP, Brasil) e 33mg/Kg de Ketamina base (Francotar - Virbac - Roseira, SP, Brasil), por administração parenteral (via intramuscular). Após a sedação dos animais, foi realizada a tricotomia da região a ser operada. A assepsia da pele foi realizada, no local da incisão, logo após o término da sutura com Rifamicina Sódica (Rifocina Spray - Laboratório Sanofi). Durante todos os procedimentos da OVX as ratas foram mantidas sobre o efeito anestésico proporcionado pela Xilazina-Ketamina, acima descrito.

O processo cirúrgico consistiu em uma pequena incisão bilateral (1,0-1,5 cm) através da pele e da camada muscular com uma lâmina de bisturi aço carbono nº 15 (EMBRAMAC), região esta que se localiza entre a última costela e a coxa, em paralelo com a linha corporal do animal. A cavidade peritoneal foi aberta e feita uma ligadura abaixo da fimbria. Os ovários foram removidos e foi realizado uma sutura nos músculos e pele com fio cirúrgico de seda trançada tamanho 4-0, esterilizado e agulhado (1,7cm x ½ circ), marca Needle Line. A analgesia pós-operatória foi realizada com cloridrato de tramadol, 20mg/kg por via subcutânea a cada 24 horas durante 5 dias. Foi respeitado um período de 10 dias de recuperação pós-cirurgia para dar início aos procedimentos do protocolo de treinamento resistido e restrição calórica.

As ratas Sham (Pseudo-cirurgia) foram submetidas aos mesmos procedimentos da OVX, contudo, os ovários foram expostos e recolocados ao local de origem (KALU, 1991).

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados por médico veterinário.

5.6 Índice de Lee

Foi analisado o Índice de Lee como determinação indireta da obesidade, como descrito por Bernardis e Patterson (1968). O Índice de Lee foi encontrado utilizando a raiz cúbica da massa corporal, dividida pelo comprimento nasoanal (CNA) de cada animal, realizado por fita métrica com divisões de 1 mm.

Equação: $[\sqrt[3]{\text{Massa corporal (g)/CNA(cm)}}]$.

5.5 Protocolo de treinamento resistido em escada

O TR foi realizado pelo período de 13 semanas, uma vez a cada 72 horas (Tabela 3).

Tabela 3 - Exemplo da organização dos dias de treinamento resistido (TR).

DOMINGO	SEGUNDA	TERÇA	QUARTA	QUINTA	SEXTA	SÁBADO
X	Familiarização	X	X	Familiarização	X	X
Familiarização	X	X	Carga máxima	X	X	Sessão de treino

X= período de recuperação entre as sessões.

5.5.1 Familiarização ao protocolo

Inicialmente, os animais passaram pelo processo de familiarização ao protocolo de TR, onde escalaram uma escada vertical (110 x 18 cm, degrau de 2 cm, inclinação de 80°) com um aparato de carga sem peso preso à cauda (Figura 5).

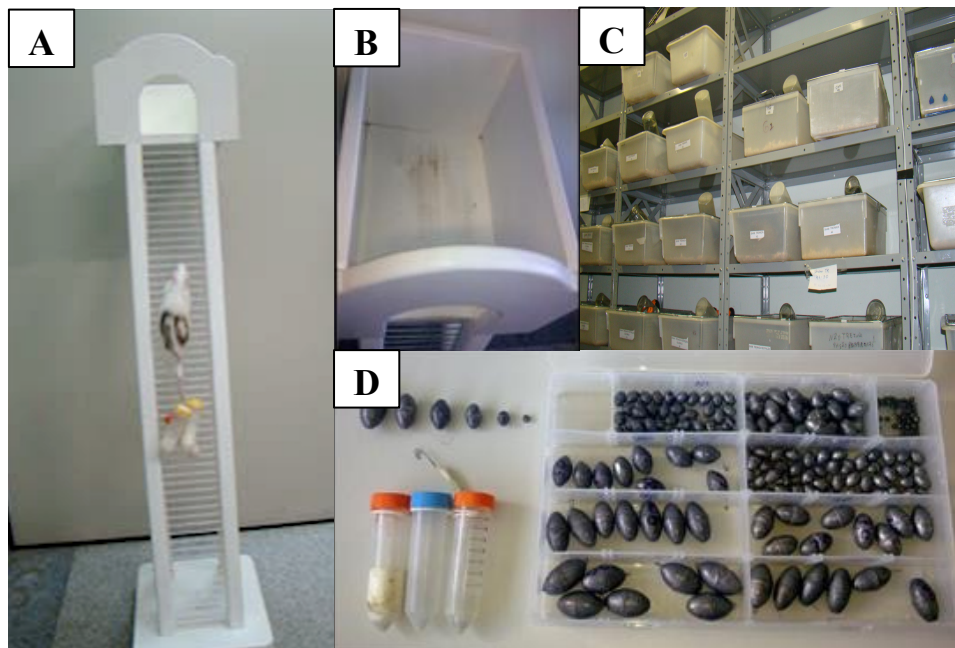
O aparato de carga foi preso à porção proximal da cauda com uma fita auto-adesiva (figura 5A). Com o aparato fixado a cauda, as ratas foram colocadas na parte inferior da escada e familiarizadas com a escalada (figura 5A). Quando necessário um estímulo com pinça era aplicado na cauda do animal para iniciar o movimento de escalada. No topo da escada as ratas alcançavam uma gaiola (20 x 20 x 20 cm) onde descansavam por um período de 120 segundos (Figura 5B). Este procedimento foi repetido até que os animais conseguissem, voluntariamente, escalar a escada três vezes consecutivas sem a necessidade de estímulo. Foram realizadas três sessões para que os animais fossem familiarizados com o protocolo.

5.5.2 Determinação da capacidade máxima de carregamento

Após 72 horas da sessão de familiarização, foi realizada uma sessão de determinação da carga de carregamento individual dos animais. A primeira escalada consistiu em carregar um peso de 75% da massa corporal do animal. Após 120 segundos de recuperação, a segunda escalada era realizada com a adição de 30 g de peso (Figura 5D). Este acréscimo de peso

(+30g) foi repetido consecutivamente a cada escalada até que se chegasse a uma carga com a qual a rata não conseguisse escalar toda a escada. A falha em escalar foi determinada quando o animal não conseguisse progredir na subida da escada após três estímulos, de pinça com os dedos, sucessivos na cauda. A maior carga carregada por toda a escada foi considerada como a capacidade máxima de carregamento da rata.

Figura 5 - Estruturas e equipamentos utilizados no protocolo de TR.

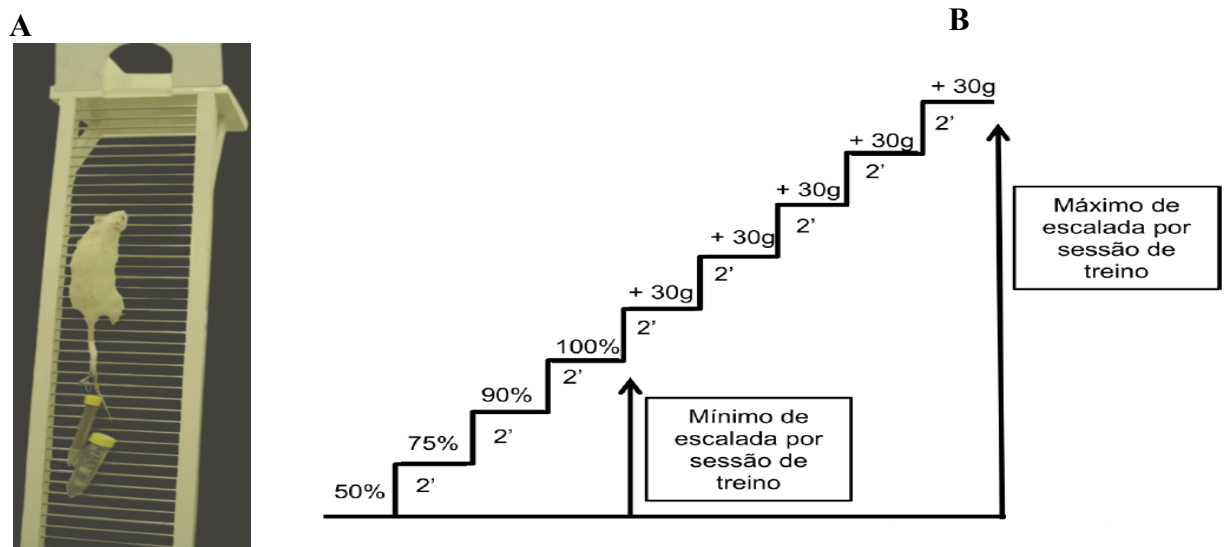


Fonte: Acervo próprio autor. Legenda: **A**, escada vertical; **B**, gaiola de descanso durante o treinamento resistido; **C**, biotério com os animais em caixas individuais; **D**, aparatos e pesos utilizados durante o treinamento resistido.

5.5.3 Sessão de treinamento

As sessões de treinamento consistiram de quatro escaladas com 50%, 75%, 90% e 100% da capacidade máxima de carregamento do animal, previamente determinada, perfazendo um mínimo de quatro (4) escaladas. Durante as escaladas subsequentes foram adicionados 30g até que uma nova capacidade máxima de carregamento fosse determinada, com um total máximo de 9 escaladas, ou seja, o procedimento era repetido, em número máximo de cinco (5) escaladas extras, ilustrado na figura 6.

Figura 6 - Esquema da sessão de TR.



Fonte: Acervo Laboratório de Fisiologia do Exercício, Universidade Federal de São Carlos - UFScar. Legenda: A, Escada para Treinamento Resistido (TR); e B, esquema do protocolo de TR.

5.6 Dietas e intervenção

As rações utilizadas no presente estudo foram preparadas na sala de ração do Instituto de Química e de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (IQ/FCF-USP), as dietas seguiram as recomendações do Instituto Americano de Nutrição para roedores adultos (AIN - 93M) (REEVES *et al.*, 1993).

5.6.1 Ração controle

As dietas seguiram as recomendações do Instituto Americano de Nutrição para roedores adultos (AIN - 93M) (REEVES *et al.*, 1993). Cada quilograma da ração AIN - 93M continha 620,692g de amido, 100g de sacarose, 50g de celulose, 140g de caseína, 1,8g L-cistina, 40g óleo de soja, 35g de mistura de minerais, 10g mistura de vitaminas, 2,5g de bitartarato de colina e 0,008g de tetrabutylhidroquinona (PUG *et al.*, 1999) (Tabela 4).

5.6.2 Ração restrição calórica

Para a confecção da ração de RC foi seguido a seguinte receita:

Para cada quilograma da ração controle era retirado, 27g de amido a fim de proporcionar a restrição energética, perfazendo uma redução de 30% de calorias da mesma. Na sequência, a concentração dos demais nutrientes era aumentada proporcionalmente, propiciando que os animais consumissem a quantidade recomendada pelo *American Institute of Nutrition* e assim, evitar a algum tipo de deficiência nutricional não intencional (PUG *et al.*, 1999) (Tabela 4).

Tabela 4 - Composição das rações utilizadas no experimento (AIN-93M modificada).

Ingredientes	Ração AIN-93M	Ração Restrição Calórica	Ração Controle	Ração Restrição Calórica
	g/Kg	g/Kg	100g	70g
Amido	620,692	501,14	62,07	35,08
Sacarose	100,000	100,000	10,00	7,00
Celulose	50,000	71,430	5,00	5,00
Caseína	140,000	200,000	14,00	14,00
L-cistina	1,800	2,430	0,18	0,17
Óleo de Soja	40,000	57,140	4,00	4,00
Mistura de minerais	35,000	50,000	3,5	3,5
Mistura de vitaminas	10,000	14,290	1,00	1,00
Bitartarato de colina	2,500	3,570	0,25	0,25
Tetrabutyl-hidroquinona	0,008	0,008	0,008	0,008
Total (g)	1.000	1.000	100	70

Fonte: Adaptado de Reeves *et al.* (1993).

5.6.3 Intervenção dietética

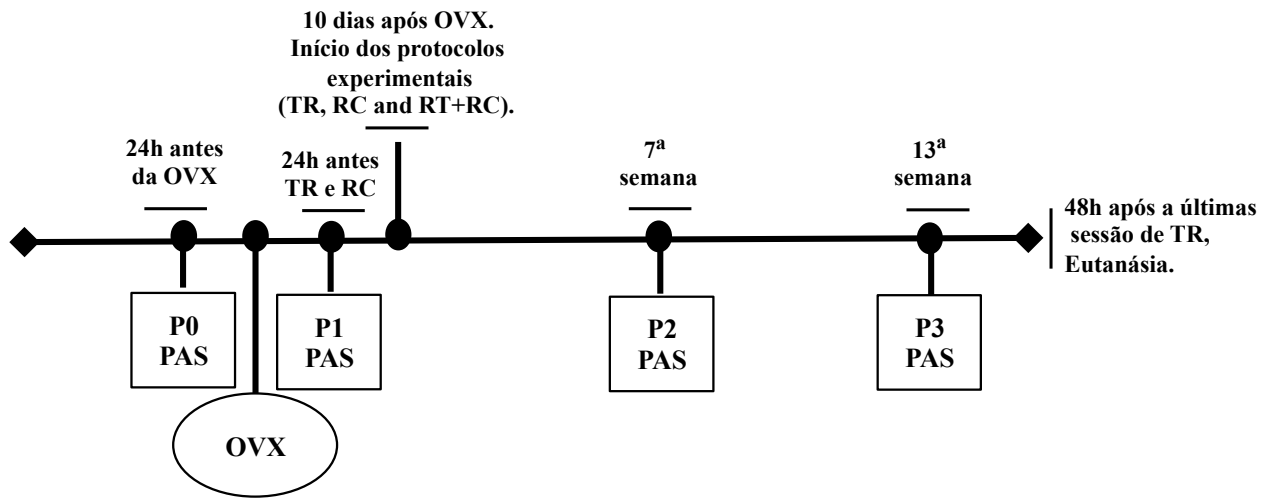
A quantidade de ração oferecida a cada animal de cada grupo RC foi calculada antes do início do protocolo experimental, quando os animais tinham acesso livre à ração. O consumo médio diário das ratas foi medido durante 30 dias antes do início do experimento. Quando o protocolo experimental teve início, os grupos OVX com RC (OVX-RC, OVX-TR+RC) foram alimentados duas vezes ao dia, pela manhã (10:00 horas) e após o protocolo de TR (14:00 horas). Quando não havia treinamento, a ração era ofertada no mesmo horário, às 14:00 horas.

5.7 Avaliação hemodinâmica

A PAS era acompanhada mensalmente por pletismografia de cauda (sistema da KENT SCIENTIFIC (TRBP1001 *rat tail blood pressure system for rats and mices*, Litchfield, USA) em todos os grupos experimentais, perfazendo um total de quatro avaliações. A primeira foi realizada antes da OVX (P0) e a cada 4 semanas após cirurgia, era realizada novas medidas (P1, P2 e P3). Os animais eram previamente familiarizados ao sistema (Figura 7). No momento das medidas, foram mantidos acordados, em repouso e sob restrição de movimentos para que o procedimento pudesse ser realizado.

O equipamento de registro da PAS consistiu em um manguito de borracha, adaptado na região proximal da cauda, ligado ao pletismógrafo para que fosse insuflado e desinsuflado gradualmente de 1 a 250/300 mmHg. Em uma região mais distal da cauda era acoplado um transdutor de pulso pneumático para detecção dos sinais de passagem da onda de pulso de pressão arterial na artéria caudal e registrado no sistema de aquisição de sinais (MP100 WSW, Biopac Systems, Santa Bárbara, CA, USA), com uma frequência de amostragem de 1000 Hz.

Figura 7 - Esquema do desenho experimental e da medida da pressão arterial e frequência cardíaca



Esquema do período experimental. OVX = Procedimentos de Ovariectomia; PAS = Pressão Arterial Sistólica; P0 = 24h antes de OVX; P1 = 10 dias após o OVX e 24h antes dos protocolos iniciais de TR e RC; P2 = sétima semana após o início do protocolo de TR e RC e P3 = 24h antes da eutanásia.

5.8 Resistência à insulina

Para a determinação da curva glicêmica após a administração de insulina, foi injetada intraperitonealmente uma dose de 0,75 U/kg de peso corporal de insulina regular humana (Humulin R, Eli Lilly and Company, Indianópolis, Indiana, EUA). Para a realização deste protocolo, todos os animais estavam em jejum de 12 horas. A glicemia foi determinada por meio de glicosímetro Accu-Chek Performance (Roche®) em amostras de sangue coletadas da veia caudal. As coletas foram realizadas nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após a administração de insulina. Os valores obtidos entre os tempos de 5 a 30 minutos foram usados para calcular a constante da taxa de desaparecimento da glicose plasmática (Kitt), mediante análise da curva de decaimento (pelo programa GraphPad Prism versão 4.0 para Windows), de acordo com o método previamente proposto (BONORA *et al.*, 1989). Este teste foi realizado no final do período experimental.

5.9 Eutanásia e coleta de tecidos

Os animais de todos os grupos experimentais foram mortos por eutanásia por decapitação em guilhotina, 48 horas após a última sessão do protocolo de TR.

5.10 Coleta da aorta torácica, ventrículo esquerdo, útero e tibia

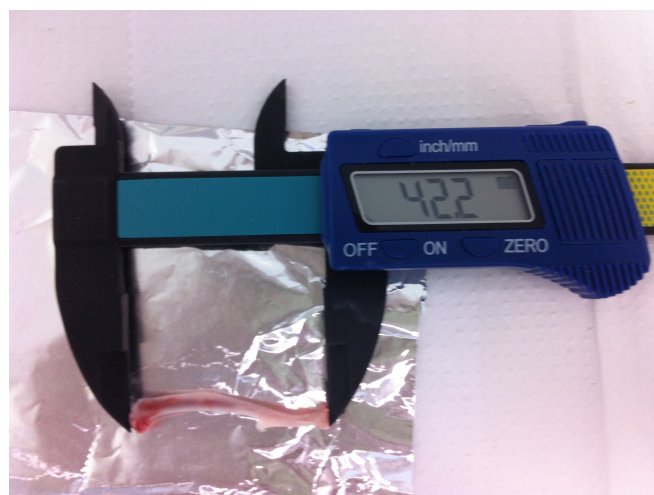
Após a eutanásia, a aorta torácica e o ventrículo esquerdo foram retirados e armazenados de maneira adequada a cada análise.

O ventrículo esquerdo (VE) foi dissecado e posteriormente pesado em balança digital da marca Sartorius (modelo TE 21455). A hipertrofia ventricular esquerda foi avaliada pela massa do VE corrigido pelo comprimento da tibia esquerda (g/mm de tibia) (YIN *et al.*, 1980) e massa do VE corrigido pela massa corporal individual (g/g).

O útero foi retirado, dissecado e pesado em balança como citado acima.

A tibia foi dissecada e medida com o uso de um paquímetro digital (Figura 8).

Figura 8 – Medida da tibia por paquímetro digital.



Fonte: Acervo do próprio autor.

5.10.1 Artéria aorta

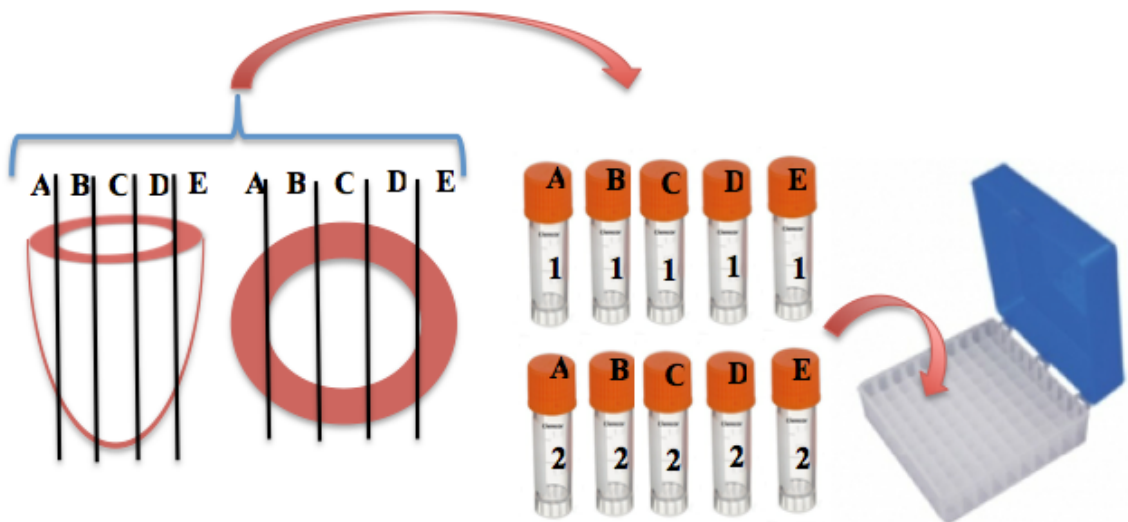
Após a eutanásia, a aorta foi removida cortando-se a extremidade superior da base do coração e a extremidade inferior na linha diafragmal, separada em três (03) porções: uma para análise da reatividade vascular, uma segunda para análise de Zimografia para MMP-2 e a

última para análise morfométrica. Cada porção da aorta foi armazenada de acordo com os procedimentos adequados as análises a serem realizadas.

5.10.2 Ventrículo esquerdo

O coração de cada animal foi retirado, o sangue drenado, lavado com solução salina gelada e pesado. O VE foi separado do restante do coração e pesado. A metade do ventrículo esquerdo, porção média para a base, foi armazenada de maneira adequada para análises morfométricas. O restante, porção média para o ápice, foi separado em cinco porções (Figura 9), armazenados em tubos criogênicos rotulados de A a E, congelado rapidamente em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C para posteriores análises.

Figura 9 - Separação das porções do ventrículo esquerdo (VE).



Fonte: Adaptado de Lino (2013). Legenda: Ilustração da separação das porções das cinco porções (de A a E) do ventrículo esquerdo (VE) para armazenamento em freezer -80°C para evitar o descongelamento e recongelamento das amostras.

5.11 Reatividade vascular

Para realizar o registro da tensão isométrica, foram utilizados anéis de aortas torácicas isoladas de ratas. A aorta foi retirada, dissecada de tecido conjuntivo e separado dois anéis

com ~4 mm de comprimento de cada aorta. Um anel de aorta teve o endotélio mantido, no segundo anel o endotélio vascular foi removido mecanicamente (com endotélio intacto e sem endotélio) para evitar a interferência do NO endógeno sobre o efeito dos doadores de NO e a efetividade dessa remoção foi demonstrada pela ausência de relaxamento à acetilcolina (1 μ M) em aorta pré-contraída com a EC50 da fenilefrina (100 nM).

Os anéis foram montados entre dois ganchos de metal inseridos no lúmen da artéria para produzir tensão. Um dos ganchos estava conectado a um suporte fixo ajustável e o outro, a um transdutor de registro de força. O sistema foi montado em câmara para órgão isolado contendo 10 mL de solução fisiológica de Krebs modificado, com a seguinte composição (em mM): NaCl 130,0; KCl 4,7; KH_2PO_4 1,2; CaCl_2 1,6; MgSO_4 1,2; NaHCO_3 14,9; glicose 5,5 em pH 7,4, sob aeração com mistura de carbogênio (95% O_2 e 5% CO_2), a 37°C. As preparações permaneceram em repouso por 60 minutos sob tensão basal (pré-determinada pela curva de tensão com KCl) constante de 1,5 g, para estabilização. As artérias foram estimuladas com fenilefrina (100 nM) até que as contrações fossem reproduzidas e a seguir iniciamos os protocolos específicos abaixo descritos:

5.11.1 Protocolo

A integridade endotelial dos anéis da aorta foi avaliada pelo grau de relaxamento induzido por 1 μ M/L de acetilcolina (ACh) na presença de tom contrátil induzido pela fenilefrina (0,1 μ M/L). O anel foi descartado se o relaxamento com acetilcolina fosse inferior a 80% nas aortas. Após o teste de integridade endotelial, os anéis aórticos foram pré-contraídos com fenilefrina (0,1 μ M). Quando o platô foi atingido, foram construídas curvas de concentração-efeito para acetilcolina (0,1 nM a 0,1 mM). A potência (pD₂) e o efeito relaxante máximo foram avaliados. Para a preparação do anel sem endotélio, ele foi removido esfregando suavemente a superfície íntima dos anéis com uma haste de metal. O procedimento de remoção do endotélio foi verificado pela incapacidade da acetilcolina (10⁻⁶ M) para relaxar as artérias pré-contraídas com fenilefrina (0,1 μ M/L) (CASTRO *et al.*, 2012).

5.12 Ensáio da atividade enzimática da Metaloproteinase de Matiz 2 (MMP-2) por Zimografia com gelatina

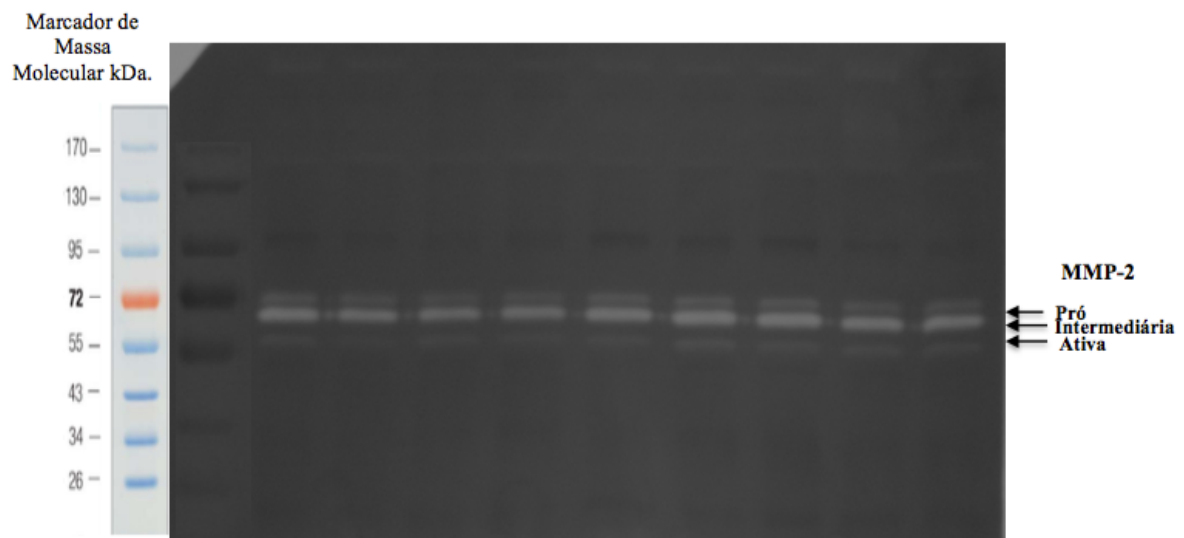
Para a análise da Zimografia da MMP-2 na aorta, foi utilizado uma alíquota da aorta, com cerca de 10 mm de comprimento.

Alíquotas da aorta foram incubadas em tampão de extração (ácido cacodílico 10 mM pH 5,0, NaCl 0,15 mM, ZnCl₂ 1 µM, CaCl₂ 20 mM, NaN₃ 1,5 mM e Triton X-100 0,01% [v/v]) a 4°C, com agitação contínua, durante 24 horas. Após este tempo, o tampão de extração foi coletado por centrifugação a 13.000 x g por 20 minutos.

Primeiramente, foi realizado teste para padronização qualitativa de intensidade das bandas observadas no gel. Para tal, alíquotas da mesma amostra do grupo Sham-SED e OVX-SED em várias concentrações de proteínas diferentes (10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 µg/µL), foram submetidas a SDS- PAGE. Após a identificação da concentração de proteínas adequada foi realizado o protocolo abaixo.

O extrato tecidual foi testado quanto a presença de atividade genatinolítica pela técnica de Zimografia (MARQUETI *et al.*, 2012). Alíquotas das amostras contendo 30 µg/µL de proteínas, para ambos os tecidos, foram submetidas a SDS-PAGE com gelatina (1 mg/mL). A corrida de eletroforese foi realizada em geladeira (com porta de vidro) a 4°C, sem incidência direta de luz, sendo para isso colocado um material preto (cartolina preta) para bloquear a incidência de luz diretamente sobre o gel durante a eletroforese. Após a corrida em eletroforese o gel foi lavado 2 vezes durante 20 minutos em solução 2,5% de Triton X-100 para remoção do SDS. Após a remoção do SDS o gel foi incubado em tampão de substrato (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, CaCl₂ 5 mM e NaN₃ 0,02%) por 10 minutos. O tampão foi trocado e o gel levado para estufa a 37°C para incubação por 20 horas. Após a incubação, o gel foi corado com *Coomassie Blue* por 60 minutos, descorado com ácido acético:metanol:água (1:4:5) por 3 dias para visualização das bandas. Para a identificação da altura das bandas no gel foi utilizado 6 µL de Marcador de massa molecular pré-corado da marca *Fermentas* (SM0671) (Figura 10).

Figura 10 - Análise da metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2) por Zimografia com gelatina.



Fonte: Acervo do próprio autor.

Após o processo de descorante, o gel foi fotografado no equipamento ChemiDoc XRS+ system (Bio Rad) (Figura 11). As medias de intensidade luminosa das bandas foram mensuradas por meio do software Gene Tools. As bandas encontradas em todos os grupos foram de 72–62 kDa, sugerindo a ativação da MMP-2 conforme proposto por (BIRKEDAL-HANSEN, 1995).

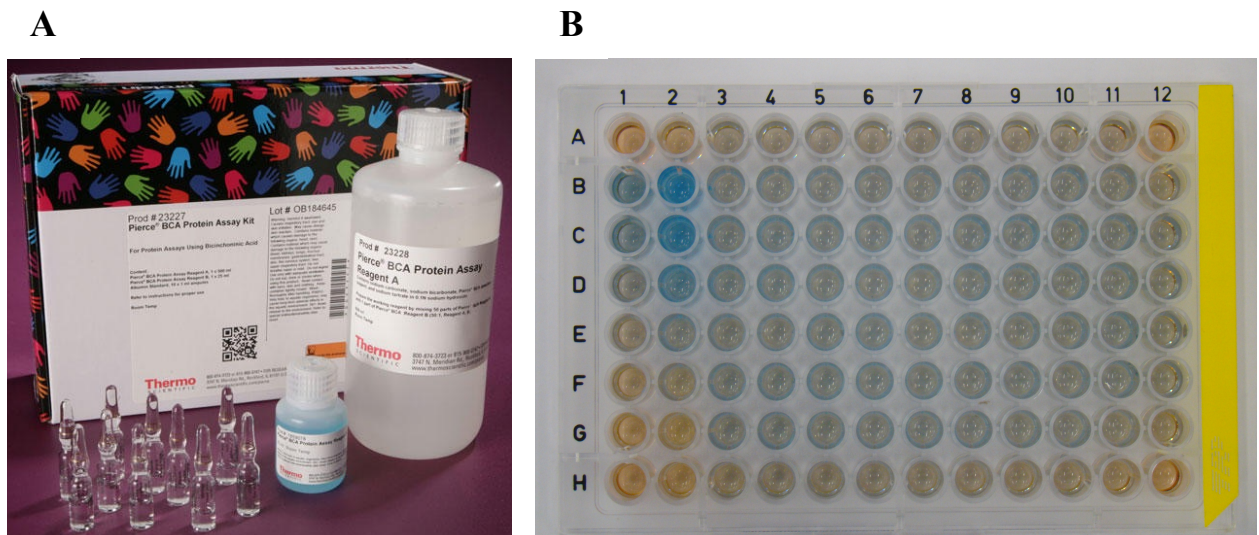
5.13 Quantificação de proteínas totais, Método BCA

A concentração de proteínas totais para os ensaios de Zimografia foi determinada por meio do método BCA, utilizando-se kit comercial (Pierce™ BCA Protein Assay Kit). As concentrações de proteínas totais foram apresentadas em mg/g de tecido.

O método do ácido bicinonínico (BCA) permite a detecção colorimétrica e a quantificação de proteína. Este método combina a redução de Cu_2^+ a Cu^+ por proteínas em meio alcalino (reação do biureto) com a detecção colorimétrica, muito sensível e seletiva, do íon Cu^+ usando um reagente contendo ácido bicinonínico (Pierce). Nesta reação forma-se um produto de cor roxa, solúvel em água, com forte absorbância a 562 nm, que é linear com concentrações crescentes de proteína, ao longo de uma gama extensa de concentrações de proteína (20 mg/ml – 2000 mg/ml, disponível em:

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23227?ICID=search-product>, acessado em 15/02/2017).

Figura 11 – Kitt e placa de 96 poços para quantificação total de proteínas.



Fonte: Figura A, disponível em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23227?ICID=search-product>, acessado em 10/02/2017; figura B, acervo do próprio autor. Legenda: **A**, *BCA Protein Assay Kit* e **B**, de placa de 96 poços com quantificação de proteínas.

5.14 Análise morfometria da aorta

Após a retirada da aorta, uma amostra de cerca de 5 mm foi imediatamente colocada em 30 ml de solução de fixação de formaldeído a 10% (tampão fosfato) por 24 horas, em temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) de cada animal. Após a fixação, estas foram desidratadas em álcool etílico, diafanizados em xilol e incluídas (impregnação) em parafina (Paraplast Plus, Sigma-Aldrich[®]) à 60°C . Os blocos de parafina com as amostras da aorta foram submetidos a cortes histológicos de cinco micrômetros de espessura, semi seriados, em micrótomo modelo rotativo (Microm HM 340e, Walldorf, Germany), com navalhas de alta precisão da marca Leica. Os cortes foram coletados e colocados em lâminas de vidro (Knittel[®], Germany), 8 cortes por animal, 8 animais por grupo. As lâminas com as amostras dos tecidos foram submetidas a colorações Hematoxilina e Eosina (H&E), Tricrômio de Masson e Pricosírius-Red.

As amostras dos tecidos da aorta coradas com H&E e Tricrômio de Masson, foram digitalizadas e transformadas em imagem em escâner de lâminas (Pannoramic Digital Slide Scanners system, 3DHISTECH, Ltd.) com uma objetiva de 40 vezes (X). As imagens eram analisadas pelo software do mesmo fabricante acima citado, segundo as instruções do fabricante.

Pela coloração com H&E, foi possível realizar as seguintes medidas:

A área externa (A_e) e interna (A_i) foram determinadas através da determinação da área circulando o contorno externo e interno, respectivamente das amostras. Para o cálculo do diâmetro externo (D_e) e interno (D_i) foi realizado através do cálculo da raiz quadrada de $4A_e/\pi$ e $4A_i/\pi$, respectivamente. A túnica Média (M) foi calculada pela diferença da D_e e D_i dividido por 2 ($M = D_e - D_i / 2$). A razão da M pelo diâmetro do lúmen (L) através da equação ($\text{razão} = M/L$). A área de secção transversal da M foi calculada pela subtração da área externa (A_e) pela área interna (A_i) ($AST = A_e - A_i$).

O número de fibras elásticas foi determinado pela contagem das estruturas em quatro campos, situados a 0° , 90° , 180° , 270° , corados com Tricrômio de Masson. Foi realizada a média aritmética do número de fibras elásticas observadas em cada campo.

Determinou-se o conteúdo total de colágeno (I e III) como percentagem (%) da área total determinada em quatro campos situados a 0° , 90° , 180° , 270° do corte histológico, corados com a técnica de Picosírius-Red e examinados sobre luz polarizada. As imagens dos campos dos cortes histológicos foram capturadas e analisadas por um sistema composto por uma câmera de vídeo acoplada a um microscópio Olympus modelo BX51, que foi ligado a um microcomputador com uma placa digitalizadora de imagem. Para mais informações sobre o protocolo de medida do conteúdo de colágeno.

Foi utilizado o programa ImageJ (National Institutes of Health) para a realização das análises morfométricas acima citadas.

Pela coloração de Tricrômio de Masson, as estruturas de fibras elásticas, células endoteliais e núcleos de células musculares lisas foram observadas em quatro campos, situados a 0° , 90° , 180° , 270° do corte histológico. Para identificar o grau de alteração histológica da parede aórtica, as amostras histológicas, de cada animal, de cada grupo, foram divididas em três categorias distintas:

Categoria 1 - Células endoteliais bem definidas, células musculares lisas sem alterações visíveis, fibras elásticas lineares e paralelas intercaladas com músculo liso;

Categoria 2 - Menos células endoteliais, células musculares lisas inferiores, fibras elásticas ligeiramente onduladas menor espaço e menos células musculares lisas entre eles;

Categoria 3 - Poucas células endoteliais, estruturas deformadas, poucos músculos lisos, fibras elásticas alteradas, enrugadas, espessas com pouco espaço e menos músculo liso entre elas. Análise subjetiva de células endoteliais, qualidade e quantificações do músculo liso e patologista experiente realizaram morfologia de fibra elástica.

5.14.1 Protocolo de coloração Hematoxilina e Eosina (H&E)

Para realizar os procedimentos de coloração utilizando a Hematoxilina e Eosina (H&E), deve-se primeiro desparafinar os cortes já colocados em lâminas apropriadas. Corar com hematoxilina de Mayer durante cerca de 15 a 20 minutos. Após esse período, lavar em água corrente por 10 minutos. Caso seja necessário, proceder à diferenciação em álcool-ácido: solução alcoólica de HCl a 1% (1 mL de HCl diluído em 99 mL de álcool 70%). Em seguida, realizar o controle da diferenciação ao microscópio até se obter a intensidade desejada. Lavar rapidamente em água corrente após a diferenciação.

O próximo passo é corar com Eosina por 2 minutos, lavar em água corrente, até que a água esteja limpa. Os passos seguintes serão para desidratação do corte. Passar o corte do tecido pela bateria de desidratação: rapidamente por álcool 70%, em seguida pelo álcool 90%, seguido do mergulho em álcool 100% e finalizar passando o corte em xilol. Após esses processos, colocar a lamínula sobre a lâmina (montagem da lâmina).

A hematoxilina cora os núcleos primariamente em vermelho e a posterior lavagem em água corrente converte a coloração para o azul. Esse processo é chamado de azulecimento da hematoxilina. O procedimento de diferenciação da hematoxilina em álcool-ácido raramente é necessário e deve ser realizado em casos que ocorrer uma supercoloração.

A eosina sofre diferenciação com o álcool 70%, por essa razão essa passagem deve ser rápida. Se, por acaso, o corte ficar muito descorado ao passar pelo álcool 70%, passá-lo novamente pela água e recolocá-lo na eosina. Às vezes, é preferível a passagem pelo álcool 70%, colocando diretamente em álcool 95%.

Como resultado, teremos núcleos corados em azul e o citoplasma e outras estruturas teciduais em rosa a vermelho (ALLEN, 1992).

5.14.2 Protocolo de coloração Tricrômio de Masson

O processo de coloração de Tricrômio de Masson consiste em desparafinar os cortes já colocados em lâminas apropriadas, através de banhos dos cortes em concentrações decrescentes de álcool, 100%, 95% e 70%. Após esses passos, lavar em água destilada. Realizar uma nova fixação dos cortes em solução de Bouin por cerca de 1 hora em estufa a 56°C para melhorar a qualidade da coloração. Esse passo não é estritamente necessário. Lavar os cortes em água por 5 a 10 minutos para remover a cor amarela.

Colocar as lâminas com os cortes na solução de hematoxilina férrica de Weigert por 10 minutos. Lavar em água destilada. Colocar as lâminas na solução ácido escarlata fuchsin de Biebrich por cerca de 10 a 15 minutos. Lavar em água destilada.

Diferenciar em phosphomolybdic-phosphotungstic acid solution por cerca de 10 a 15 minutos. Colocar diretamente as lâminas (sem lavar) em solução de azul de alinina por cerca de 10 a 15 minutos. Lavar rapidamente em água destilada em diferenciado em solução ácido acético 1% por 2 a 5 minutos. Após esses procedimentos, lavar em água, desidratar os cortes rapidamente em álcool etílico 95%, álcool absoluto e clarear em xilol.

As soluções utilizadas no protocolo acima descrito estão no anexo B.

5.14.3 Protocolo de coloração Pricosírius-Red

A coloração do Pricosírius-Red foi realizada utilizando-se cortes histológicos com cinco micrômetros de espessura. Os cortes foram mantidos em estufa a 56°C por 18 horas. Posteriormente, as lâminas foram submetidas à desparafinização em uma passagem, de 10 minutos, em xilol à temperatura ambiente e hidratação em soluções de álcool absoluto I, II e III e 95% e 80%, por três minutos. Após esses passos os cortes eram lavados por dez vezes rápidas em água destilada. Os cortes foram imersos em ácido fosfomolibídico 0,2% por dois minutos, seguido de três lavagens rápidas em água destilada. A coloração com o Pricosírius-Red foi feita por 110 minutos, seguida do uso de ácido clorídrico por dois minutos. Hidratação em soluções de álcool 70% e absolutos I, II e III, seguido de três passagens no xilol e montagem das lâminas.

As soluções utilizadas no protocolo acima descrito estão no anexo C.

5.15 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para analisar a normalidade dos dados. Para testar a diferença estatística das variáveis dependentes dos grupos experimentais, foi utilizado o teste ANOVA de um caminho, seguido do teste Post-Hoc de Tukey com o nível de significância estatística de 5% ($p < 0,05$). O teste *t* de *Student* foi utilizado para as variáveis dependentes para a comparação entre a frequência cardíaca final *VS* inicial dentro do mesmo grupo. Da mesma maneira, foi utilizado o mesmo protocolo estatístico para comparar a Carga máxima de carregamento inicial *VS* Carga máxima de carregamento da semana 7, Carga máxima de carregamento inicial *VS* Carga máxima final, Carga máxima de carregamento da semana 7 *VS* Carga máxima de carregamento final, do mesmo grupo, também com o nível de significância estatística de 5% ($p < 0,05$). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Para análises estatísticas foi utilizado o programa de estatística software IBM SPSS® Statistics, versão 20 para Macintosh.

Todos os gráficos foram confeccionados no software GraphPad Prism®, versão 5 para Macintosh.

6. RESULTADOS

6.1 Parâmetros ponderais, massa do coração, do ventrículo esquerdo e Kitt

Conforme apresentado na tabela 5, no início do período experimental, anterior às intervenções, as massas corporais iniciais dos animais foram similares. Contudo, após 13 semanas de período experimental, foi observado aumento significativo no grupo OVX-SED comparado ao Sham-SED ($p = 0,0001$). Todas as intervenções estudadas no presente trabalho (OVX-TR; OVX-RC e OVX-TR+RC) preveniram o aumento de massa corporal quando comparado ao grupo OVX-SED ($p < 0,05$), mantendo valores próximos ao grupo Sham-SED ($p > 0,05$). A associação do TR com a RC (OVX-TR+RC) foi mais eficiente em controlar o ganho de massa corporal do que o TR (OVX-TR) separado ($p = 0,02$). Entretanto, quando comparado ao grupo submetido somente à RC (OVX-RC) não foi observado diferença para esta variável.

A massa do útero foi utilizada para analisar indiretamente a condição estrogênica nos animais. Observamos que nos grupos OVX a massa dessa variável foi menor comparado ao grupo intacto (Sham-SED) ($p = 0,0001$). A atrofia que ocorre no útero após a OVX comprova a eficiência da cirurgia de castração.

Foi observado menor valor para a razão VE/Tíbia (g/g) no grupo que realizou o TR associado à RC (OVX-TR+RC) quando comparado ao grupo OVX-SED ($p = 0,03$). Para a razão VE/MC, foi observado menor valor para o grupo OVX-SED quando comparado ao Sham-SED ($p = 0,001$). Por outro lado, observou-se maior valor para o grupo treinado (OVX-TR) quando comparado ao grupo Sham-SED ($p = 0,004$). Da mesma forma, foi observado maiores valores para os grupos OVX-RC e OVX-TR+RC quando comparado ao grupo OVX-SED, ($p = 0,02$, $p = 0,001$, respectivamente).

Pelo teste Kitt ($\% \text{min}^{-1}$), foi observada resistência à insulina promovida pela OVX em animais sedentários em comparação com Sham-SED ($p = 0,002$). A associação das intervenções no grupo OVX (OVX-TR+RC) melhorou a sensibilidade à insulina em comparação com o OVX-SED ($p = 0,01$) e observou-se maior sensibilidade em comparação ao grupo OVX-RC ($p = 0,04$). O TR isoladamente também apresentou melhoras na sensibilidade à insulina no grupo treinado (OVX-TR) em comparação aos grupos OVX-SED ($p = 0,006$) e OVX-RC ($p = 0,02$), sem diferença em relação ao Sham-SED. A RC em animais OVX não foi capaz de melhorar a sensibilidade à insulina, em comparação aos animais intactos (Sham-SED).

Neste estudo não foi observado diferenças entre os grupos experimentais para a massa do coração, massa do VE, comprimento da Tíbia e frequência cardíaca inicial e final, assim como para a comparação entre a frequência cardíaca final comparada à inicial dentro do mesmo grupo.

Tabela 5 - Parâmetros ponderais, massa de tecidos, frequência cardíaca e valores do Kitt (%).

	Grupos Experimentais				
	Sham	Ovariectomia (OVX)			
	SED	SED	TR	RC	TR+RC
MC Inicial (g)	276±05	274±05	292±04	293±06	283±06
MC Final (g)	372±14 ^b	468±13 ^a	416±16 ^{b,c}	404±10 ^b	358±09 ^{b,d}
Útero (g)	0,75±0,01 ^a	0,13±0,01 ^b	0,21±0,03 ^b	0,13±0,01 ^b	0,12±0,01 ^b
Coração (g)	1,11±0,03	1,14±0,03	1,11±0,02	1,13±0,03	1,05±0,01
VE (g)	0,86±0,02	0,89±0,02	0,84±0,02	0,86±0,02	0,80±0,02
TÍBIA (mm)	41,20±00,7	41,45±0,26	42,00±0,17	42,07±0,15	42,01±0,30
VE/TÍBIA (g/mm)	2,10±0,06	2,14±0,06 ^a	1,99±0,05	2,05±0,05	1,91±0,04 ^b
VE/MC (g/mm)	2,34±0,07 ^a	1,90±0,04 ^b	2,03±0,06 ^{b,c}	2,15±0,05 ^c	2,25±0,04 ^c
FC Inicial (bpm)	477±14	490±14	449±28	450±21	444±32
FC Final (bpm)	468±17	471±15	437±20	456±14	462±19
Kitt (%min⁻¹)	1,93±0,35 ^b	3,03±0,16 ^a	2,08±0,39 ^b	2,92±0,48 ^{a,c}	2,21±0,32 ^{b,c}

Os valores são apresentados como média ± erro padrão da média. MC, massa corporal (g), VE, ventrículo esquerdo. As letras sobrescritas representam diferença estatística entre os grupos por ANOVA de um caminho seguida por Post-Hoc de Tukey ($p < 0,05$), $a \neq b$, $b \neq c$, $c \neq d$.

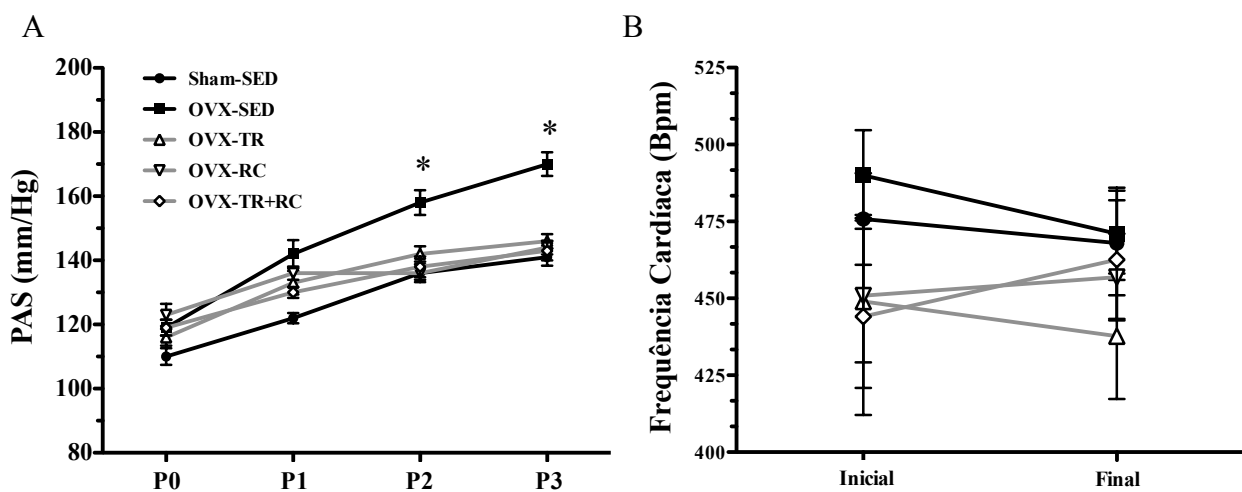
6.2 Frequência cardíaca e pressão arterial sistólica (PAS)

O estudo não apresentou diferenças entre os grupos experimentais para a frequência cardíaca (FC), tanto no período inicial, logo após a OVX, quanto após 13 semanas de TR e RC ($p > 0,05$), ilustrado na figura 12 B.

A medida da PAS (mmHg) realizada 24 horas antes dos procedimentos cirúrgicos (OVX e Sham) (P0) e após dez dias da OVX (P1), não apresentou diferença para todos os

grupos. No entanto, desde a sétima semana do período experimental (P2) até o período experimental final (P3), houve um aumento constante da PAS no grupo OVX-SED comparado ao Sham-SED ($p=0,001$). O protocolo de TR foi capaz de evitar a elevação do PAS no grupo OVX-TR ($p=0,005$) em comparação com o OVX-SED, mantendo os valores a um nível normal em comparação com o grupo Sham-SED, como observado no OVX-RC e no OVX-TR + RC ($p=0,001$, para ambos os grupos). Não houve diferença estatística em relação ao grupo Sham-SED (Figura 12A).

Figura 12 - Frequência cardíaca (FC) e pressão arterial sistólica (PAS)

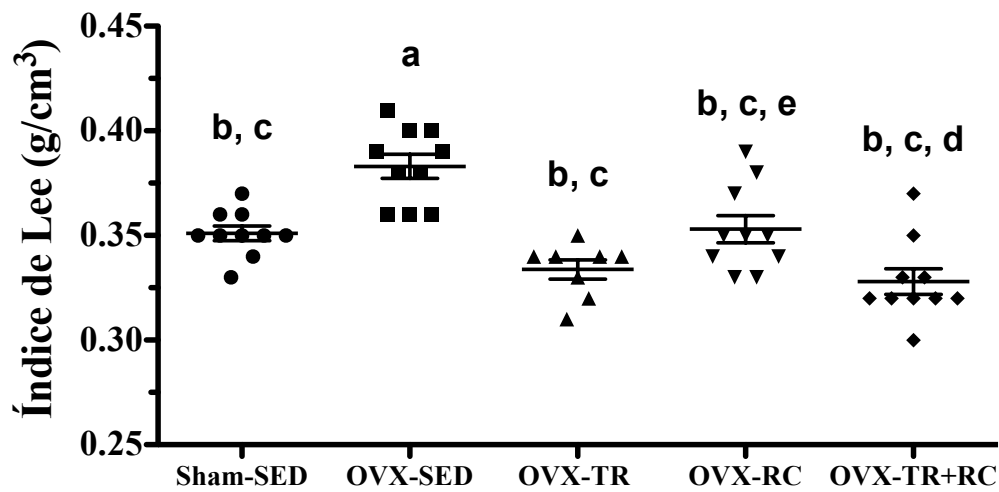


Legenda: Evolução de **A**) Pressão arterial sistólica (mmHg). P0-; P1-; P2-; P3-; e **B**) Frequência cardíaca (FC). As letras sobrescritas representam diferença estatística entre os grupos por ANOVA de um caminho seguida por Post-Hoc de Tukey ($p < 0,05$), $a \neq b$, $b \neq c$, $c \neq d$.

6.3 Índice de Lee

Foi analisado o Índice de Lee como determinação indireta da obesidade, como descrito por Bernardis e Patterson (1968). Observou-se um maior índice no grupo OVX-SED comparado ao grupo Sham-SED ($p=0,001$). Por outro lado, as intervenções associadas (OVX-TR+RC, $p=0,0001$), ou mesmo separadas (OVX-TR, $p=0,0001$; e OVX-RC, $p=0,003$) preveniram o aumento desse índice de obesidade comparado ao OVX-SED. Além disso, o grupo OVX-TR+RC apresentou menor Índice de Lee comparado ao OVX-RC ($p=0,017$), inclusive ao Sham-SED ($p=0,03$), com valores similares ao OVX-TR ($p=0,953$), como ilustrado na figura 13.

Figura 13 - Índice de Lee.



Legenda: Letras representam diferença estatística entre todos os grupos por ANOVA de um caminho seguida por Post-Hoc de Tukey ($p < 0,05$). Letras representam diferença estatística entre todos os grupos por ANOVA de um caminho seguida por Post-Hoc de Tukey ($p < 0,05$), $a \neq b$, $b \neq c$, $c \neq d$.

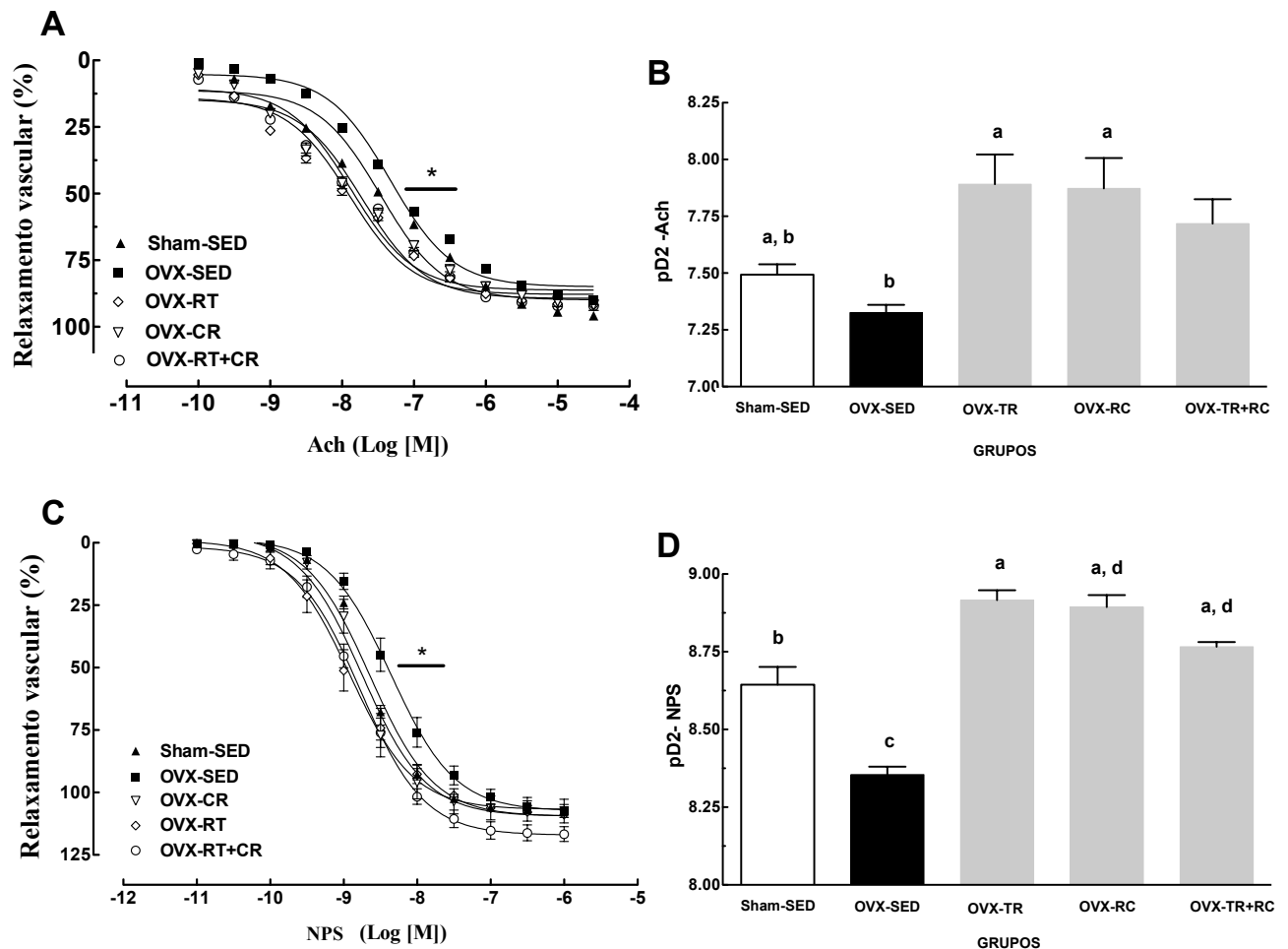
6.4 Reatividade vascular

A cirurgia de OVX diminuiu o relaxamento dependente do endotélio, induzido por Acetilcolina (Ach) (Pd2, Sham-SED: $7,49 \pm 0,04$; OVX-SED: $7,32 \pm 0,07$, $p < 0,05$). O protocolo TR (OVX-TR) e RC foram capazes de aumentar o relaxamento dependente do endotélio induzido por Ach em comparação com OVX-SED (Pd2, OVX-SED: $7,32 \pm 0,07$; OVX-TR: $7,89 \pm 0,13$; OVX-RC: $7,87$ $p = 0,01$, $n=08$). A associação das intervenções de TR+RC não promoveu mudanças em comparação com os grupos Sham-SED e OVX-SED. Não foi observada diferença entre os grupos OVX e Sham-SED (Figuras 14A e B).

O relaxamento independente do endotélio induzido pelo nitroprusiato de sódio (SNP) foi prejudicado nos anéis aórticos do grupo OVX-SED (Pd2, Sham-SED: $8,64 \pm 0,05$; OVX-SED: $8,35 \pm 0,02$; $p = 0,0001$, $n=08$). O protocolo TR (OVX-TR) foi capaz de prevenir o comprometimento promovido pelo OVX, resultando no aumento da potência de relaxamento independente do endotélio (Pd2, Sham-SED: $8,64 \pm 0,05$; OVX-SED: $8,35 \pm 0,02$; OVX-TR: $8,91 \pm 0,03$, $p = 0,0001$). O mesmo resultado foi observado no grupo OVX-RC. A dieta restritiva (RC) aumentou o relaxamento do endotélio independente por SNP em comparação com OVX-SED, mesmo melhorando a potência de relaxamento, quando comparado ao Sham-SED (Pd2, Sham-SED: $8,64 \pm 0,05$; OVX-SED: $8,35 \pm 0,02$; OVX-RC: $8,89 \pm 0,04$, $p = 0,0001$, $n=08$) (Figuras 14C e D). Em relação ao efeito relaxante máximo (E_{max}), tanto no

relaxamento dependente (Ach) quanto no relaxamento independente do endotélio (SNP), não foi observada diferença em todos os grupos.

Figura 14 – Reatividade Vascular

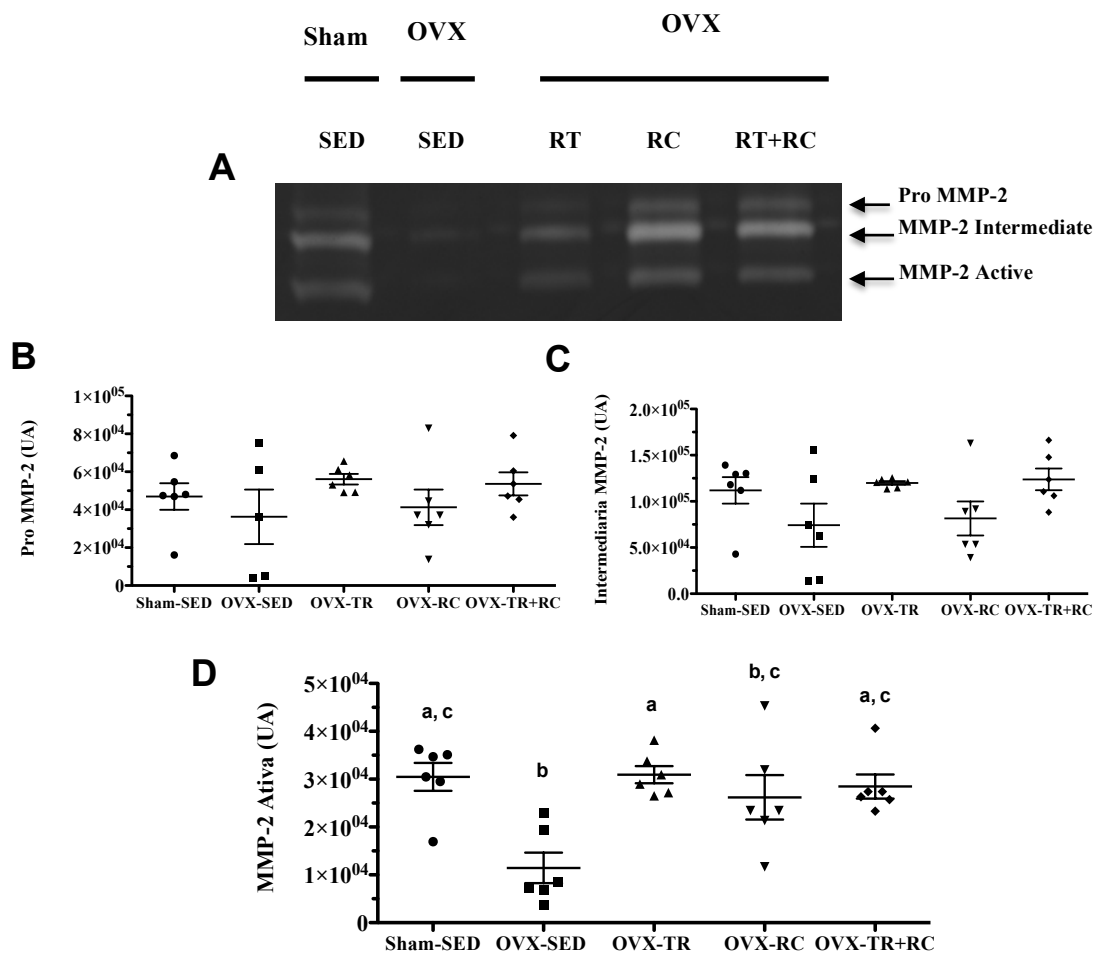


Legenda: Relaxamento dependente do endotélio induzido por acetilcolina (Ach) e relaxamento independente do endotélio induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS). **A)** Curva de resposta de concentração para Ach; **B)** Curva de resposta de concentração para SNP; **C)** O efeito relaxante da potência (pD2) por Ach e **D)** O efeito relaxante da potência (pD2) pelo NPS. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão da média. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) em pD2. Letras representam diferença estatística entre todos os grupos por ANOVA de um caminho seguida por Post-Hoc de Tukey ($p < 0,05$), $a \neq b$, $b \neq c$, $c \neq d$.

6.5 Ensaio da atividade da MMP-2

A figura 15A ilustra os valores da atividade da MMP-2 pelo ensaio de Zimografia de anéis da aorta torácica de todos os grupos. Alterações do relaxamento vascular podem estar associadas ao remodelamento vascular. TR e RC poderiam atenuar esta alteração. Para testar esta hipótese, as amostras da artéria aorta foram submetidas a um ensaio de Zimografia, para identificar a atividade da MMP-2. A OVX produziu uma diminuição da atividade da metaloproteinase de matriz 2 ativa (MMP-2 Ativa) ($p < 0,05$), comparado ao grupo Sham-SED (Figura 5D). No entanto, a associação de ambas intervenções, e as mesmas isoladas, foram capazes de aumentar a atividade de MMP-2 Ativa em relação ao OVX-SED ($p = 0,005$; $p = 0,02$; $p = 0,03$, respectivamente). Nenhuma diferença estatística foi observada na atividade das Isoformas Pro e Intermediária em todos os grupos (Figura 15B e C).

Figura 15 – Metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2)



Legenda: **A**) Imagem representativa da atividade da MMP-2 por Zimografia com gelatina; **B**) Pró MMP-2; **C**) MMP-2 Intermediária; **D**) MMP-2 Ativa. Letras representam diferença estatística entre todos os grupos por ANOVA de um caminho seguida por Post-Hoc de Tukey ($p < 0,05$), $a \neq b$, $b \neq c$, $c \neq d$).

6.6 Análise morfométrica da parede vascular da aorta

A figura 16A mostra ilustrações representativas de todos os anéis de aorta torácica de todos os grupos. Observou-se aumento do diâmetro do Lúmen ($p < 0,05$) no grupo OVX-SED comparado ao Sham-SED. A associação de TR+RC promoveu uma ligeira diminuição do diâmetro do Lúmen, sem diferença estatística ($p > 0,05$) em comparação ao Sham-SED e OVX-SED. Os protocolos TR e RC separados não mostraram alterações no diâmetro do Lúmen comparado aos grupos Sham e OVX-SED ($p > 0,05$) (Figura 15B). Por outro lado, OVX-SED mostrou aumento da espessura da túnica média (TM) em comparação com Sham-SED ($p < 0,05$) (Figura 16C). As intervenções não promoveram modificações em comparação com Sham e OVX-SED ($p > 0,05$). Os mesmos resultados foram observados na área de secção transversal (AST), quando o OVX aumentou o AST em comparação com o Sham-SED ($p < 0,05$) e não houve diferença estatística entre os grupos TR, RC e TR+RC ($p > 0,05$) (Figura 4D). A relação entre TM/L em % (Figura 16E) foi aumentada por OVX no grupo SED em comparação com Sham-SED ($p < 0,05$). A associação do TR com a RC não apresentou efeitos nessa variável, mantendo a relação TM/L elevada em animais OVX (OVX-TR) em comparação ao Sham-SED ($p < 0,05$). A associação dos protocolos TR+RC foi capaz de mitigar o efeito da OVX na relação TM/L em relação ao Sham-SED, não apresentando diferença estatística entre Sham-SED e OVX-SED ($p < 0,05$) (Figura 16E).

Figura 16 - Análise morfométrica da parede vascular da aorta

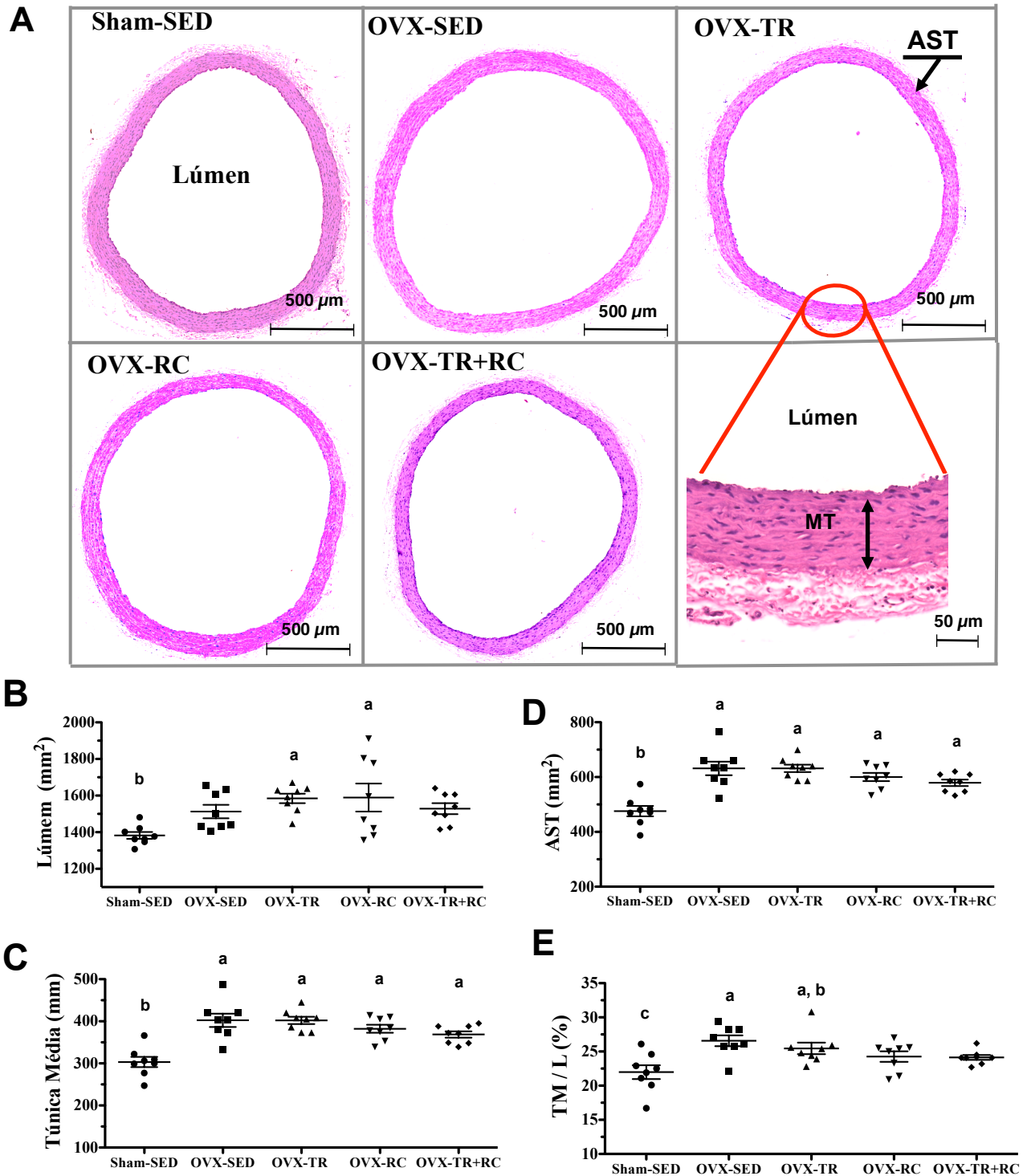
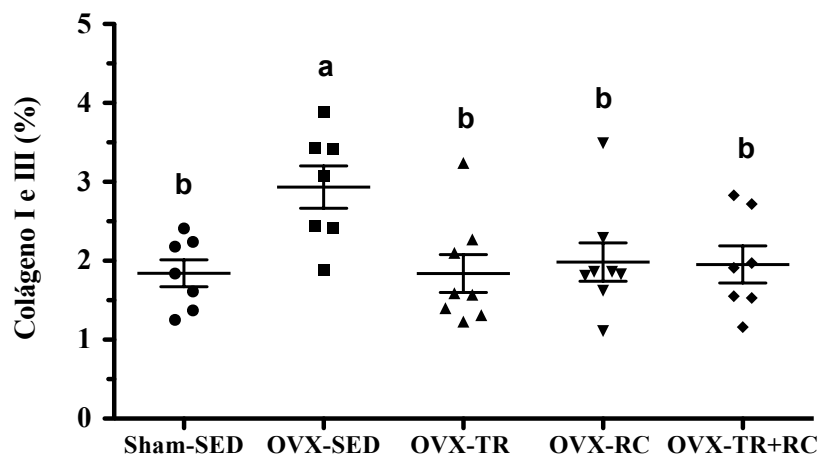
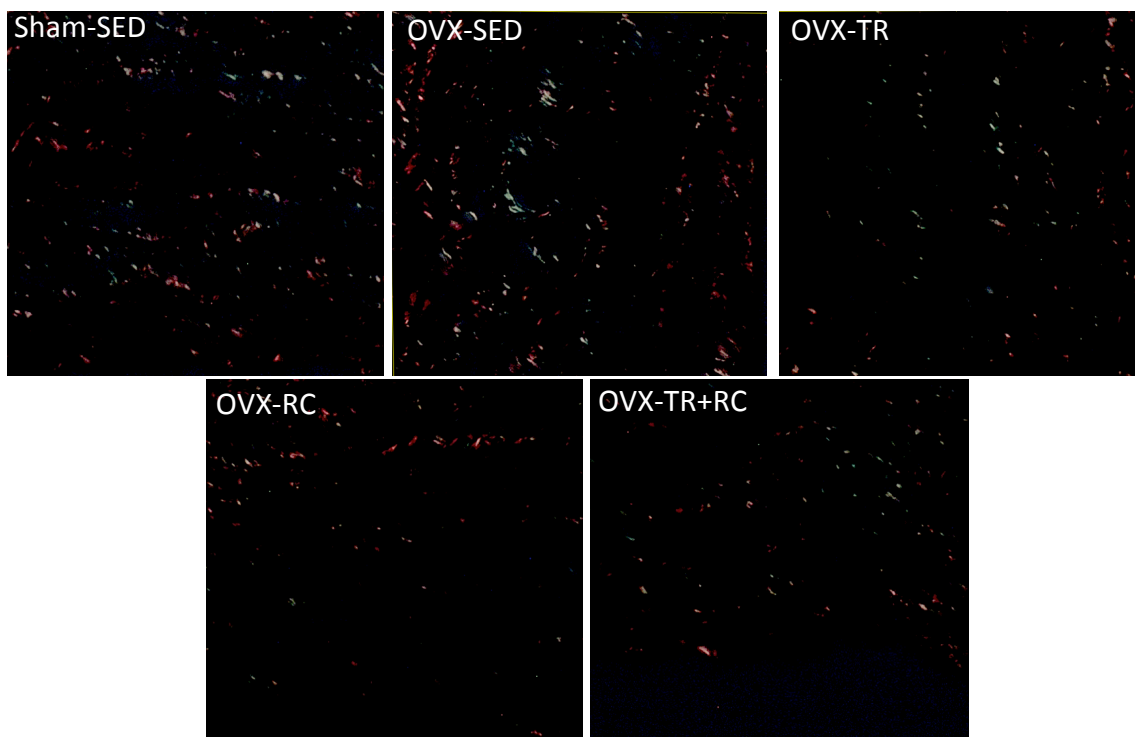


Figura 16 - Legenda: Modificações estruturais induzidas na aorta torácica. **A**) Fotomicrografia representativa de aorta torácica de ratos Holtzman corados por hematoxilina e Eosina (H&E); **B**) Valores da área do Lúmen (mm²); **C**) Espessura da túnica média (mm); **D**) CSA (mm²) (área de secção transversal); e **E**) Valores para a relação túnica média/lúmen (M/L), em porcentagem (%). TM, espessura da túnica média. Letras representam diferença estatística entre todos os grupos por ANOVA de um caminho seguida por Post-Hoc de Tukey ($p < 0,05$), $a \neq b$, $b \neq c$, $c \neq d$).

6.7 Análise de conteúdo de colágeno

Na parede aórtica do grupo OVX-SED, a porcentagem de colágeno I e III foi maior em comparação com Sham-SED ($p=0,02$). No entanto, observamos valores mais baixos de % de colágeno em relação ao TR ($p=0,02$), RC ($p <0,05$), assim como para a associação de ambos TR+RC ($p <0,05$) comparados ao OVX-SED, com porcentagem similar quando comparado ao Sham-SED (Figura 17).

Figura 17 – Porcentagem e conteúdo de colágeno I e III



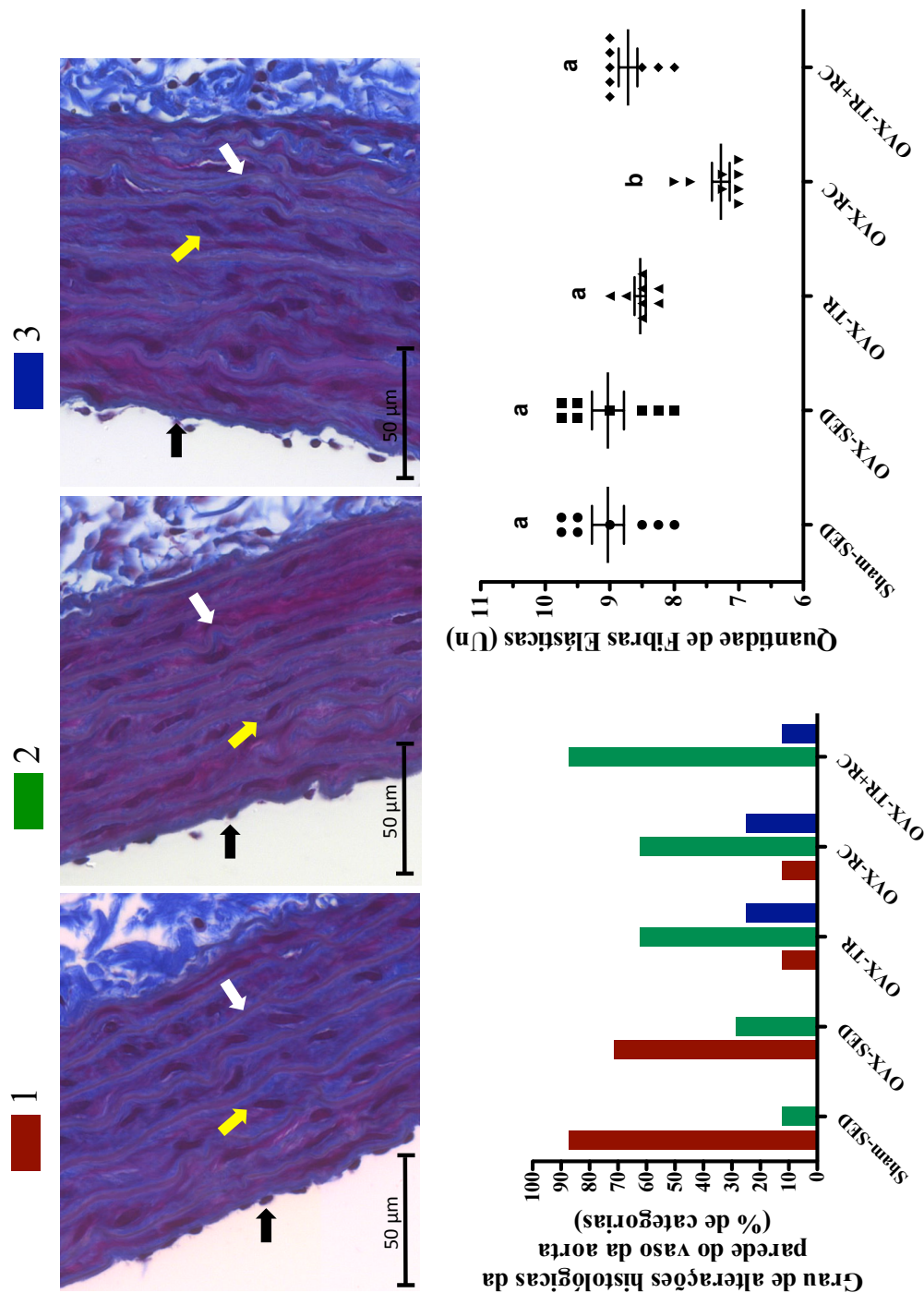
Legenda: Porcentagem de conteúdo de colágeno I e III na parede articular, corada com Pricosírius-Red. Letras representam diferença estatística entre todos os grupos por ANOVA de um caminho seguida por Post-Hoc de Tukey ($p <0,05$), $a \neq b$, $b \neq c$, $c \neq d$).

6.8 Análise da estrutura e fibras elásticas da parede da aorta

Observamos no presente estudo que a OVX promoveu alterações estruturais na aorta (Figura 18A e B). Observou-se que no grupo OVX-SED, 71,4% enquadram-se na categoria 1, enquanto outros 28,6% se enquadram na categoria 2. O Sham-SED apresentou 87,5% na categoria 1 e 12,5% na categoria 2. Na OVX-TR e OVX-RC grupos, houve mudança na porcentagem dentro das 3 categorias. Ambos apresentaram 12,5% na categoria 1, 62,5% na 2 e 25% na 3. No grupo OVX-TR+RC, observou-se que não havia nenhum corte histológico que se enquadra na categoria 1. Por outro lado, observamos que 75% na categoria 2 e 25% na categoria 3.

Os dados neste trabalho analisados mostram que houve uma alteração significativa no número de fibras elásticas (Figura 17C) no grupo OVX-RC, com menor número dessa estrutura quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$). Nenhuma outra alteração no número de fibras elásticas foi observada entre os grupos experimentais Sham-SED, OVX-SED, OVX-TR e OVX-TR+RC.

Figura 18 – Estrutura da parede da artéria aorta torácica



Legenda: A- Alterações histológicas na estrutura da parede aórtica, em categorias: **Categoria 1** (Vermelho) - Células endoteliais bem definidas, Célula de músculo liso sem alterações visíveis, fibras elásticas lineares e paralelas, intercaladas com células de músculo liso; **Categoria 2** (Verde) - Menos células endoteliais, células musculares lisas inferiores, fibras elásticas ligeiramente onduladas com menor espaço e menos células musculares lisas entre elas; **Categoria 3** (Azul) - Poucas células endoteliais, estruturas deformadas, fibras elásticas alteradas, enrugadas e espessas com pouco espaço e menos músculo liso entre elas. Os valores são apresentados como percentagem (%) sem estatística. As setas de cores indicam: células endoteliais pretas; Células do músculo liso amarelo; E fibras elásticas brancas; E B- Número de fibras elásticas, apresentadas como unidades, coradas com Tricrômio de Masson. Letras representam diferença estatística entre todos os grupos por ANOVA de um caminho seguida por Post-Hoc de Tukey ($p < 0,05$), $a \neq b$, $b \neq c$, $c \neq d$.

7. DISCUSSÃO

A menopausa está fortemente associada a alterações na composição corporal, diminuição da massa muscular (sarcopenia) e aumento do tecido adiposo, favorecendo o desenvolvimento da obesidade (LEITE *et al.*, 2010). Além disso, a mesma pode promover o aumento do risco para o desenvolvimento de doenças como hipertensão (YANES e RECKELOFF, 2011), resistência insulínica, diabetes e hipetrigliceridemia (LEITE *et al.*, 2010). Tanto o TR quanto a RC têm sido estudadas e prescritas como tratamento de doenças relacionadas à menopausa, dentre elas a hipertensão arterial (ASIKAINEN *et al.*, 2004; LEITE *et al.*, 2010; OMODEI e FONTANA, 2011) e disfunção endotelial (HIGASHI e YOSHIZUMI, 2004; WYCHERLEY *et al.*, 2008).

Os principais achados do nosso estudo foram de que a OVX levou ao surgimento de hipertensão arterial com a diminuição da função vascular, em decorrência do aumento da deposição de colágeno e modificação de estruturas na parede da aorta, promovendo um remodelamento deste vaso, com diminuição de sua função. Por outro lado, a associação das intervenções (TR+RC), e mesmo separadas, preveniram o aumento da PAS, a deposição de colágeno na parede da aorta, melhoram o conteúdo de fibras elásticas, contribuindo para a melhora da resposta vasodilatadora da aorta. Ao contrário do esperado, a associação do TR+RC não mostrou efeitos sinérgicos nos parâmetros clínicos de hipertensão estudados, mas mostrou resultados semelhantes ao TR e a RC separadamente. Assim, os resultados do presente estudo confirmam a hipótese levantada de que as intervenções, associadas ou separadamente, podem prevenir o aparecimento da hipertensão em condição experimental de menopausa modulando a resposta vasodilatadora, o remodelando da aorta e modificando os constituintes da parede do vaso aórtico.

Para testar a hipótese levantada, lançamos mão do modelo experimental de menopausa por meio da ovariectomia em ratas. Com o intuito de averiguar a eficácia da cirurgia dos grupos OVX, analisamos a massa uterina dos animais pois esta é dependente dos hormônios ovarianos (PRASANNARONG *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2013). Foi observado que a massa do útero das ratas OVX era inferior, comparado às intactas. Perante isto, pode-se afirmar que as intervenções de TR e RC e ambos associados, não produziram quaisquer efeitos sobre a massa uterina. Portanto, concluímos que a OVX foi eficiente.

O aumento da massa corporal (MC), em decorrência da ausência de hormônios ovarianos, tem sido relatado por vários estudos, já que este fator pode vir a desencadear um quadro de obesidade (PIGHON *et al.*, 2009; DOMINGOS *et al.*, 2012; SHIGUEMOTO *et al.*,

2012; FERESIN *et al.*, 2014). Além disso, percebe-se que há uma forte relação entre hormônios ovarianos e ganho de MC (GEARY e ASARIAN, 1999). Intervenções como o TR (PIGHON *et al.*, 2009; DOMINGOS *et al.*, 2012; SHIGUEMOTO *et al.*, 2012; FERESIN *et al.*, 2014) e a RC (PRASANNARONG *et al.*, 2012) podem prevenir o ganho de MC em animais OVX. Na literatura encontramos informações de que tanto o aumento do gasto energético, quanto a diminuição do consumo de calorias, afetam a composição corporal e parâmetros metabólicos em humanos (FRANK *et al.*, 2005) e roedores (VIEIRA *et al.*, 2009). O presente estudo exibiu em seus resultados que a associação das intervenções (TR+RC) tem efeito similar no controle da evolução da MC, sendo mais efetivo do que o TR isolado. Até a presente data, não foram encontrados na literatura estudos que utilizaram a associação do TR+RC e que avaliaram as mesmas variáveis dependentes do presente estudo.

Além de observar a massa corporal para averiguar a evolução de um possível quadro de obesidade, podemos analisar os valores obtidos através de um índice de obesidade em roedores, como o Índice de obesidade de Lee. Esse índice é utilizado para identificar maior MC, assim como uma forma indireta de se verificar uma possível instalação da condição de obesidade, utilizado em roedores. Estes, quando apresentam um índice maior, podem ser considerados obesos, se comparados aos animais controle (BERNARDIS e PATTERSON, 1968), no caso do presente trabalho, aos intactos (Sham-SED). Observamos que em relação ao grupo OVX-SED, houve uma elevação da MC, perante o uso do Índice de Lee, sugerindo que a OVX promoveu um quadro de obesidade nesses animais, como encontrado por Fitriani *et al.* (2016). Ressalta-se que a cepa de ratas utilizadas no estudo citado foi Wistar. Por outro lado, as intervenções de TR e RC, assim como ambas associadas, preveniram o aumento desse índice. Indo ao encontro da literatura, a OVX promoveu aumento da massa corporal, com instalação de obesidade, observado com aumento do tecido adiposo, como relatado em outro estudo do nosso grupo de pesquisa (LEITE *et al.*, 2009).

Em condição de menopausa associada à obesidade, com um estilo de vida sedentário, observa-se uma diminuição da massa muscular, acarretando deterioração das capacidades físicas (KENDALL, 2014). Além disso, observa-se aumento de mediadores inflamatórios, aumento do estresse oxidativo e diminuição da vasodilatação endotelial, além de resistência a insulina (MATURANA, 2007).

Nossos resultados mostram que a OVX não produziu nenhum efeito sobre a capacidade de carregamento nas ratas, como foi observado em estudo prévio (SHIGUEMOTO *et al.*, 2012). Destaca-se que os animais que treinaram e foram alimentados com dieta restritiva mantiveram a capacidade de carregamento. Estudos têm demonstrado que

independente da condição (intacta ou OVX) a capacidade de carregamento de ratas se mantêm similares (LEITE *et al.*, 2009). Esse fato é observado também em ratos obesos (SPERETTA *et al.*, 2012; LEITE, *et al.*, 2013). Estudos com objetivos de analisar o porque da similaridade de carga de carregamento em roedores em diferentes condições, como as citadas anteriormente, deverão ser conduzidos para elucidar quais os mecanismos de adaptação nesses animais que promovem esses efeitos, do protocolo de TR em escada.

A OVX pode levar a alterações no relaxamento vascular da aorta e a disfunção endotelial (MATURANA, 2007). Estes efeitos podem gerar aumento da pós-carga ventricular esquerda. O aumento na demanda de trabalho ventricular gera um remodelamento hipertrófico cardíaco. Tal efeito pode ser analisado tanto pela massa do VE, quanto pela correção de sua massa pela MC do animal, ou ainda mais adequado, pelo comprimento da tíbia (YIN *et al.*, 1982; MENDONÇA *et al.*, 2007). No presente trabalho, essas variáveis não se alteraram com a OVX, assim como nos grupos submetidos às intervenções estudadas.

Segundo o Manual de Atenção a Mulher no Climatério (BRASIL, 2008), na menopausa a hipertensão arterial aparece como um dos fatores de risco para DCV. O papel do estrógeno endógeno na patogênese da hipertensão arterial é bastante complexo, uma vez que os efeitos das mudanças hormonais pós-menopausa podem ser mascarados por outros fatores de risco cardiovascular, como envelhecimento vascular, rigidez arterial, obesidade, alterações na sensibilidade à insulina, estresse oxidativo, aumento do colesterol, entre outros (MUECK e SEEGER, 2004; COYLEWRIGHT *et al.*, 2008). Efeitos similares são encontrados em mulheres com insuficiência ovariana ou com menopausa induzida pela ooforectomia (MERCURO *et al.*, 2004).

Em algumas espécies de roedores, como Dahl sensível ao sal (DHS), a OVX promove aumento da pressão arterial. No entanto, em ratos Wistar Kyoto espontaneamente hipertensos, a PAS tende a não ser alterada pela OVX (KAHONEN *et al.*, 1998). Murase *et al.* (2012) utilizando ratas DHS, obesas e submetidas à OVX, observaram que a remoção dos ovários foi capaz de aumentar a PAS, levando à hipertensão. No mesmo estudo, a administração de 17 β -estradiol regulou a PAS, prevenindo a hipertensão, mostrando uma clara relação entre hipertensão arterial e hormônio ovariano.

No presente estudo, a associação do TR+RC, assim como isolados, foram capazes de prevenir a evolução da PAS, que pode levar à hipertensão, prevenindo alterações vasculares funcionais e estruturais causadas pela hipertensão induzida pela OVX, regulando a atividade da MMP-2, conseqüentemente o remodelamento da parede do vaso e a propriedade de relaxamento da aorta. Importante ressaltar que a manutenção dos níveis de PAS é

fundamental para a saúde, visto que a diminuição de 10 mmHg em indivíduos com pressão arterial está associada a uma redução de 22% de risco de doenças coronarianas e 41% de acidente vascular cerebral (LAW *et al.*, 2009). Em um estudo prévio (SILVEIRA *et al.*, 2011), observou-se bradicardia e redução da frequência cardíaca intrínseca em ratos OVX normotensos Wistar, após um treinamento com exercícios de resistência de alta intensidade. Não obstante, o TR por 12 semanas pode induzir alterações nos fatores de risco cardiovascular, como diminuição do conteúdo lipídico no fígado, depósito de gordura mesentérica e retroperitoneal, lipídios no sangue e índice aterogênico em ratas ovariectomizadas (LEITE *et al.*, 2009).

A diminuição da PAS, promovida pelo TR, pode ser determinada pelo aumento do tônus vagal (FLUES *et al.*, 2010) que também promove o aumento da sensibilidade ao ganho da função barorreceptora aórtica, mesmo em ratos normotensos e SHR (BRUM *et al.*, 2000). Comparando diferentes protocolos de exercício, o protocolo de esteira foi capaz de diminuir 15% dos valores da PAS em ratas SHR OVX (MARQUES *et al.*, 2006). Em ratos Sprague-Dawley machos, a RC tem efeitos parassimpatomiméticos que podem diminuir a frequência cardíaca e a PAS e PAD (MAGER *et al.*, 2006). Evidências iniciais indicam que a pressão sanguínea pode ser diminuída em roedores submetidos à RC de longo prazo (ANDERSON *et al.*, 2009). Mas ao contrário do citado acima, não houve modulação dos valores de FC em todos os grupos experimentais. Em nosso estudo observamos valores elevados da PAS em ratas OVX. Contudo, a associação entre TR+RC preveniram a elevação da PAS, mantendo-a em valores similares aos animais Sham-SED. Efeito esse também observado os grupos com intervenções separadas.

A FC é controlada pelo sistema autônomo, um bom parâmetro que indica os ajustes hemodinâmicos por este sistema (CONTI *et al.*, 2015). Tanto em mulheres na menopausa como em ratas OVX o tônus simpático eleva-se, com diminuição do tônus parassimpático. Isto determina uma FC mais elevada e conseqüentemente uma elevação da PAS (EL-MAS e ABDEL-RAHMAN, 2009). No entanto, TR e a RC são formas de modular o tônus autonômico, diminuindo uma ação do simpático, elevando a ação parassimpática, em condição de repouso. Tal ação pode diminuir a PAS. Em um estudo prévio os autores observaram que o TR não foi capaz de melhorar a resposta barorreflexa em ratas OVX (MINAMI *et al.*, 2007). Por outro lado, Irigoyen *et al.* (2005) observaram que ratas OVX submetidas ao treinamento aeróbio em esteira por oito semanas reduziram a PA e a FC de repouso, além de melhorar a sensibilidade da resposta barorreflexa. Em nosso estudo, a deficiência de estrogênio (OVX) não aumentou a FC. No mesmo sentido, as intervenções de

TR e RC não modificaram os valores de FC. Relacionando a FC com a PAS, nosso grupo de estudo concorda que a elevação da PAS pela OVX pode ter sido devido a outros fatores, como modificação da reatividade vascular e alterações na morfologia da artéria aorta. As intervenções não promoveram alterações nos sistemas autônomos de controle da PAS, de acordo com os valores de FC. No entanto, observou-se que essas intervenções foram capazes de prevenir o aumento da PAS, mantendo-a próxima aos valores basais, ou mesmo aos do grupo Sham-SED. Assim, temos fortes convicções de que os efeitos preventivos foram devidos a outros mecanismos, como melhora da resposta vascular (reatividade vascular), bem como remodelamento da aorta. Para testar esta hipótese, a reatividade vascular foi realizada em anéis aórticos, visando identificar uma possível disfunção endotelial e sua melhora devido ao exercício e dieta, além de análises morfométricas e de conteúdo de colágeno e de estruturas elásticas na parede do vaso estudado.

A disfunção endotelial é caracterizada por uma redução da biodisponibilidade dos vasodilatadores e aumenta a liberação de vasoconstritores, sendo considerada previsível e associada a doença cardiovascular (DEROSA *et al.*, 2006). A resistência à insulina, observada em animais OVX (PRASANNARONG *et al.*, 2012) e humanos (POEHLMAN e TCHERNOF, 1998; BEN ALI *et al.*, 2016), pode promover a disfunção endotelial.

A insulina, ao se ligar ao receptor de membrana, fosforila o substrato do receptor de insulina do tipo 1 (IRS-1), ativando a via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)/proteína quinase B (AKT) que irá fosforilar (ativar) a eNOS. Esta por sua vez irá converter L-arginina em L-citrulina e NO. Este último atua na musculatura lisa do vaso promovendo vasorelaxamento. Concomitante a essa via, a insulina também ativa a via da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), promovendo a produção de ET-1, que é um potente vasoconstritor. Essas vias atuando de maneira conjunta promovem o equilíbrio entre vasorelaxamento e vasoconstrição. Na condição de resistência à insulina, há uma menor fosforilação do IRS-1, diminuindo a ativação da via PI3K/AKT, ativando menos a eNOS, o que irá promover menor produção de NO e, conseqüentemente, menor vasorelaxamento. Ainda, há pequena elevação a produção de ET-1, por meio da via da MPAK, promovendo maior vasoconstrição. Esses fatores promovem desequilíbrio entre vasorelaxamento e vasoconstrição, podendo elevar a PAS. Não obstante, em um quadro de resistência à insulina, observa-se elevação da concentração de glicemia, gerando glicotoxicidade no organismo. A glicotoxicidade, além de outros fatores, ativa proteínas como a c-janus-n terminal quinase (JNK), assim como a quinase regulada pela sinalização extracelular (ERK) que inibem a fosforilação do IRS-1. Também há a ativação da proteína quina C (PKC) que inibe a

fosforilação da PI3K, diminuindo assim a ativação da eNOS, conseqüentemente, promovendo menor produção de NO (MUNIYAPPA e SOWERS, 2013; JANUS *et al.*, 2016).

Contudo, um dos efeitos do TR e da RC é de melhora a resposta insulínica do organismo, diminuindo a concentrações de glicemia. Essa diminuição promove a redução, ou mesmo a prevenção, da glicotoxicidade, inibindo a ativação das proteínas JNK, ERK e PKC, restalrando assim a normailidade da via de sinalização da insulina mediada pelo IRS-1, por meio da ativação da via PI3K/AKT. Tal ativação das vias citadas pode elevar a produção de NO, equilibrar a produção de ET-1, restaurando o equilíbrio entre vasorelaxamento e vasoconstrição da artéria aorta (MUNIYAPPA e SOWERS, 2013; JANUS *et al.*, 2016).

Estudo prévio mostrou que 12 semanas de treino aeróbio realizado em esteira e dieta com 50% de RC promove aumento na sensibilidade à insulina em ratas Wistar OVX (POSA *et al.*, 2015b). Por outro lado, encontramos um estudo relevante que mostrou que o treinamento de resistência foi capaz de melhorar a sensibilidade à insulina em roedores OVX após oito semanas de treinamento (CHEN *et al.*, 2016). Outro estudo realizado com RC de 35%, melhorou a resistência à insulina em ratas Sprague-Dawley OVX após 12 semanas de período experimental (PRASANNARONG *et al.*, 2012). Até o momento, não foi encontrado na literatura trabalhos que utilizaram o TR e a RC associados em ratas *Holtzman* OVX. Mesmo assim, os resultados das intervenções de TR e RC vão ao encontro dos citados acima, assim como as intervenções associadas, mostrando ser uma importante opção de tratamento preventivo à hipertensão arterial. Claro que estudos nesse sentido, em mulheres na menopausa devem ser realizados para confirmar tal afirmação. Resalta-se que os resultados observados neste estudo são mais elucidativos para o TR isoladamente ao se comparar aos resultados da RC e da associação TR+RC.

Dando prosseguimento a reatividade vascular, no estudo realizado, a associação do TR+RC, e ambos separadamente, aumenta a sensibilidade endotelial à Ach, bem como a resposta vasodilatadora ao nitroprusiato de sódio (NPS) tanto na presença quanto na ausência do endotélio. O TR aumenta o fluxo sanguíneo durante a sessão de treino. Este aumento no fluxo sanguíneo promove estresse de cisalhamento elevado na aorta, o que poderia ocasionar uma melhora da vasodilatação dependente do endotélio (HIGASHI e YOSHIKUNI, 2004). Este estresse de cisalhamento estimula potentemente a liberação de algumas substâncias como NO, prostaciclina (PGI₂) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (GIELEN *et al.*, 2001; HUANG *et al.*, 2005). A força mediada pelo estresse de cisalhamento no endotélio ativa a formação de GMPc. A óxido nítrico sintase tipo III (NOS3) é responsável pela catálise na produção de NO a partir do aminoácido catiónico L-arginina. A mudança na força de

cisalhamento ativa NOS através de mudanças no cálcio intracelular ou através de um processo mediado por receptor. O NO liberado ativa a guanilato ciclase solúvel em células de músculo liso, convertendo GTP em GMPc. Este processo é capaz de ativar a proteína quinase que leva à inibição do influxo de cálcio na célula do músculo liso e diminuição da estimulação de cálcio-calmodulina da quinase de cadeia leve da miosina. O resultado é uma diminuição na fosforilação das cadeias leves de miosina, diminuindo o desenvolvimento da tensão do músculo liso e causando vasodilatação (GALLEY e WEBSTER, 2004). Outra explicação é que a TR aumenta a vasodilatação, provavelmente pela liberação endotelial aumentada de NO, prostaciclina e EDHF (LAUFS *et al.*, 2004).

Além disso, a RC é capaz de reduzir o estresse oxidativo no vaso, produzido pela OVX que inativa a biodisponibilidade do NO levando a disfunção endotelial. A diminuição do estresse oxidativo atenua o grau de inativação do NO pelas EROs, o que melhora a biodisponibilidade do NO (ZANETTI *et al.*, 2010) no endotélio e na função do músculo liso vascular, normalizando a produção de NO (WYCHERLEY *et al.*, 2008). A RC pode modular a atividade do óxido nítrico endotelial eNOS e sua expressão por ativação da SIRT-1, ambas localizadas em células endoteliais. A SIRT-1 desacetila a eNOS, estimulando sua atividade com aumento do NO endotelial levando à normalização da função do endotélio (MATTAJASINGH *et al.*, 2007). Assim, o TR associado a RC poderia incorporar os efeitos benéficos de ambas as intervenções, discutidas acima. Tal fato pode contribuir para melhorar o vasorelaxamento da aorta em animais OVX. Esses fatores poderiam explicar a melhora da resposta do endotélio e da função do músculo liso vascular.

Outros fatores podem influenciar a capacidade de vasorelaxamento, como o conteúdo de colágeno e as fibras elásticas na parede da aorta. A fibra elástica pode ser degradada pela metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2), resultando em alterações na homeostase da MEC (SHERRATT, 2009), com deposição elevada de colágeno, levando a rigidez da artéria (KOHN *et al.*, 2015), como observado no presente estudo. Aliado a este, destaca-se que as intervenções realizadas promoveram aumento tanto da atividade da MMP-2 como diminuição da deposição de colágeno na artéria aorta. Um trabalho prévio revisou a ação de MMPs no vaso da aorta (SHERRATT, 2009). Lam *et al.* (2009) observaram que, em animais OVX, a atividade da MMP-2 tinha uma redução acentuada na aorta torácica, com aumento significativo na deposição de colágeno. Esses efeitos foram revertidos pela reposição de estrogênio. Assim, a inibição da atividade da MMP-2 leva ao acúmulo de colágeno vascular, o que pode estar envolvido na elevação da pressão sanguínea causada pela OVX. Os autores observaram que a elevação da PA em animais OVX foi acompanhada por uma diminuição da

atividade da MMP-2. Resultados semelhantes foram encontrados em nosso estudo. Esses efeitos positivos, sobre o papel da MMP-2 na aorta, observado nos grupos experimentais submetidos ao TR e a RC, nos dão um pouco de compreensão sobre o controle do PAS decorrentes do TR e RC, em animais na hipertensão arterial induzida pela OVX. Importante ressaltar que, no presente trabalho, os mesmos resultados foram observados quando animais OVX foram submetidos a protocolos de TR e RC. No entanto, resultados controversos são encontrados utilizando roedores OVX que receberam reposição de estrogênio, aos quais foi observado elevação da atividade da MMP-2, mostrando a interação do hormônio estrogênio com atividade de MMP-2 no vaso aórtico (ZHANG *et al.*, 2000).

Resultados controversos também são encontrados em ensaios clínicos de hipertensão arterial, indicando aumento da expressão da proteína MMP-2, observado no plasma de pacientes com hipertensão (ZERVOUDAKI *et al.*, 2004). Outros dados encontrados na literatura mostraram resultados semelhantes, evidenciando que as concentrações plasmáticas de MMP-2 ativa estavam diminuídas em pacientes com hipertensão essencial (ZERVOUDAKI *et al.*, 2003). Um estudo clínico em 44 pacientes hipertensos e 44 controles descobriu que os níveis plasmáticos e a atividade da MMP-2 estão aumentados em pacientes hipertensos, o que pode refletir um metabolismo anormal da MEC (DEROSA *et al.*, 2006). As alterações em decorrência da OVX podem diminuir a atividade da MMP-2, o que leva a alterações do conteúdo de colágeno e de fibras elásticas na parede do vaso, modificando assim sua morfologia e capacidade de complacência.

A OVX pode causar um remodelamento caracterizado como remodelamento hipertrófico para fora, ou externa (MULVANY, 2002), como observado no aumento dos constituintes da análise pela área de secção transversal (AST) e pela área do lúmen. Em nosso estudo, apenas o protocolo TR influenciou uma relação túnica média/lúmen (TM/L). A associação entre TR+RC também produziu o mesmo efeito hipertrófico para fora na parede do vaso aorta, bem como TR e RC separadamente. Um trabalho anterior (HORTA *et al.*, 2005) mostrou espessura de parede da aorta reduzida e aumento da densidade de núcleos de células de músculo liso por área de unidade de túnica média em ratos submetidos a exercícios aeróbios. Esse fato é provavelmente devido ao efeito do exercício em produzir aumento do fluxo sanguíneo na aorta, o que promove a sinalização para aumento dos constituintes da Túnica Média e consequente aumento da AST (HORTA *et al.*, 2005), gerando um remodelamento hipertrófico para fora (MULVANY, 2002), conforme observado no presente estudo. A RC é capaz de atenuar o estresse oxidativo, aumentar a quantidade de estruturas

constituintes da túnica média e ampliar a parede da aorta (DOLINSKY *et al.*, 2010; ZANETTI *et al.*, 2010).

Em nosso estudo, as intervenções associadas (TR+RC) os animais OVX, ou separadamente, promoveram um equilíbrio na relação TM/L próximo aos valores dos animais do grupo Sham-SED. Alterações resultantes da OVX podem levar a disfunção endotelial, diminuir a capacidade de resposta de relaxamento do vaso aórtico, levando ao aumento da AST, como discutido acima. Nossos resultados vão ao encontro de um estudo realizado com ratas SHR OVX submetidas a exercício aeróbico (MARQUES *et al.*, 2006). No entanto, o tipo de roedor, protocolos de exercício e ensaio morfológico diferem do presente estudo. Na literatura, um trabalho conduzido para investigar o efeito da substituição de estrogênio na distensibilidade arterial e na função endotelial, em ratos Sprague-Dawley, não observou alterações na histomorfometria após 20 dias de OVX (TATCHUM-TALOM *et al.*, 2002). Comparando os nossos resultados ao da literatura é nítido que, a histomorfometria da aorta é tempo dependente da depleção de hormônios ovarianos, e da cepa das ratas estudadas. Não obstante, as alterações morfológicas podem estar relacionadas com alterações funcionais e disfunção endotelial (MULVANY, 2002).

A composição distinta de cada camada da artéria possui propriedades mecânicas específicas. As proteínas da matriz extracelular, o colágeno e a elastina representam cerca de metade do peso seco do vaso e desempenham papel crucial na mecânica da artéria. O colágeno tipo I e III representam 60% da parede da artéria e a elastina 30% (KOHN *et al.*, 2015). Em baixas cargas mecânicas, as propriedades mecânicas vasculares são predominantemente determinadas por fibras de elastina (SEHGEL *et al.*, 2015). Por outro lado, em cargas mecânicas mais elevadas o colágeno contribui de maneira mais efetiva para as propriedades mecânicas do vaso. Ressaltando que as fibras de colágeno são cerca de 100 a 1.000 vezes mais rígidas do que as fibras elásticas (KOHN *et al.*, 2015). Assim, a maior rigidez arterial está associada a aumentos no conteúdo de colágeno que ocorrem concomitantemente com a diminuição do conteúdo de elastina na artéria aorta, levando ao enrijecimento arterial. Este contribui para a elevação da PAS (SEHGEL *et al.*, 2015).

Com o avançar da idade, a concentração de elastina diminui e é acompanhada por aumento considerável na concentração de colágeno. Em direção oposta às fibras elásticas, a concentração de colágeno nas três camadas da parede arterial aumenta com a idade, o que pode levar à fibrose. A fibrose na túnica média ocorre como consequência de aumento de fibras de colágeno em substituição de células musculares lisas. Essa fibrose também pode contribuir para a diminuição das propriedades vasomotoras da aorta. Tal efeito também leva

ao enrijecimento do vaso, com um conseqüente aumento da PAS, observado em mulheres na menopausa, ou em roedores OVX. Na hipertensão, a fibrose vascular acarreta, em grande parte, a deposição de matriz extracelular, particularmente colágeno, na parede arterial (KOHN *et al.*, 2015).

A aorta é responsável pelo fornecimento de sangue do coração à circulação sistêmica. Para tal, ela possui um alto grau de elasticidade, o que auxilia em propeler o sangue para a vasculatura sistêmica. Para que isso ocorra, a parede do vaso da aorta possui microestrutura que suporta esta função. Mudanças nessa microestrutura, como no conteúdo ou arquitetura, tanto das fibras elásticas como do colágeno, estão associadas às doenças da artéria aorta tanto como envelhecimento (TSAMIS *et al.*, 2013), quanto na condição de menopausa (JANI e RAJKUMAR, 2006), o que pode levar ao enrijecimento da aorta, elevando a PAS (COUTUNHO, 2014). Outro constituinte da parede do vaso da aorta são as células musculares lisas, responsáveis pelo controle do raio do Lúmen do vaso. Alterações nessas células, com aumento de colágeno e diminuição de fibras elásticas também contribuem para a diminuição da complacência do vaso, produzindo assim maiores valores da PAS, podendo gerar um quadro de hipertensão arterial (TSAMIS *et al.*, 2013).

Trabalho prévio, estudando a influência do TR sobre os efeitos da privação de estrogênio no volume de colágeno e tecido elástico aórtico no envelhecimento, em ratas Wistar OVX, submetidas ao TR após oito meses de OVX, encontrou que o TR é capaz de prevenir o aumento do conteúdo de colágeno, sugerindo que o TR pode reduzir o enrijecimento da artéria aorta de ratas Wistar OVX (LIMA *et al.*, 2012). Souza *et al.* (2015), analisando o efeito de 16 semanas de TR sobre modificações na parede da aorta em ratos Wistar idosos, encontraram que o envelhecimento gera diminuição do número de núcleos das células musculares lisas, aumento da espessura da túnica média, aumento do número e da densidade das lamelas elásticas e o aumento do conteúdo de colágeno. Por outro lado, 16 semanas de TR promove redução da espessura da parede da aorta, além de normalizar a quantitativa do conteúdo de colágeno. Marchon *et al.* (2015), estudando o efeito do treinamento aeróbio em esteira em camundongos OVX observaram diminuição do conteúdo de colágeno e aumento do de fibras elásticas. Claro que o modelo de estudo dos dois últimos trabalhos citados foi diferente ao do presente estudo. Mesmo assim os resultados mostraram ser semelhantes para os diferentes tipos de exercícios, de roedores e de gênero.

No mesmo sentido, um trabalho prévio (CASTELLO *et al.*, 2005) utilizando, 40% de RC em ratos machos idosos, mostrou que a RC pode ser capaz de reduzir o conteúdo de colágeno, além de prevenir a perda de células musculares lisas na parede da artéria aorta. Um

trabalho realizado com ratos machos idosos Fisher344, analisando o efeito de 40% de RC, observou menor deposição de colágeno na túnica média, com redução do nível de fibrose da aorta. Weiss e Fontana (2011) realizaram uma elegante revisão sobre os efeitos da RC no envelhecimento cardíaco e vascular, tanto em humanos quanto em animais. Contudo, até a presente data não encontramos trabalhos realizados com RC e ratas OVX, nem mesmo em associação do TR.

Em nosso estudo, foi observado que a OVX é capaz de alterar os constituintes da parede do vaso aórtico, tanto nas fibras elásticas, no conteúdo de colágeno, quanto nas células musculares lisas. Por outro lado, tanto a associação do TR+RC, quanto separadamente, promoveram alterações relevantes na microarquitetura do vaso, modificando os constituintes anteriormente citados. Essa alteração está relacionada ao tipo de remodelamento observado neste estudo. O interessante é que, mesmo prevenindo o aumento da PAS, houve tal modificação, mais acentuada do que observado na OVX, porém com menor conteúdo de colágeno, maior atividade da MMP-2, e melhora da resposta de relaxamento do vaso. A melhora da resposta insulínica no organismo, o menor conteúdo de colágeno, com maior quantidade de fibras elásticas, e manutenção da função das células musculares lisas podem explicar o maior remodelamento do vaso com melhora de sua função.

O objetivo final da prevenção primária e secundária da hipertensão arterial em mulheres na pós-menopausa é a redução da morbidade e mortalidade de eventos clínicos adversos, pela doença cardiovascular, causada pela hipertensão. O sétimo relatório do Comitê Nacional Conjunto de Prevenção, Detecção, Avaliação e Tratamento da Hipertensão Arterial (JNC-7) sugere que as pessoas, principalmente no mundo ocidental, devem mudar o estilo de vida, aumentando e mantendo a prática de exercício físico regular e dieta controlada. Estas alterações são importantes na prevenção da hipertensão arterial (CHOBANIAN, 2003).

Em resumo, a OVX (privação de estrogênio) eleva a PAS, levando o sistema orgânico à hipertensão. Esta evolução da PAS pode não ser devida à alteração do tônus autonômico, observada pela manutenção dos valores de FC, mas por mudanças na responsividade da artéria aorta, que podem ser indicativas de disfunção endotelial, bem como alterações na estrutura da aorta e seu remodelamento, morfologia e em constituintes (colágeno e fibras elásticas) da parede desta artéria. O segundo resultado interessante foi que a associação de exercício e dieta, além de ambos isolados, impediram o surgimento da hipertensão, exercendo efeitos que mantiveram a PAS em níveis normais. Este efeito também não advém da modulação autonômica, pois não se observou alteração da FC nos animais submetidos às intervenções neste estudadas. No entanto, houve uma melhora da responsividade da artéria

aorta devido à prevenção do aparecimento de disfunção endotelial. Ademais, essas intervenções promoveram um remodelamento benéfico da parede aórtica, modulando a deposição de colágeno e as fibras elásticas.

Podemos também salientar que ambas as intervenções ajudaram na prevenção da hipertensão e da disfunção endotelial no modelo proposto, com ênfase aos resultados do TR isalado. Além disso, nosso estudo encontrou um modelo de indução da hipertensão dependente da função ovariana sem manipulação genética em roedores. Assim, acreditamos que a OVX é, portanto, um modelo experimental em animal útil para estudar o remodelamento vascular e de disfunção endotelial mediada por ausência de hormônios ovarianos, em roedores.

8. CONCLUSÃO

Perante o que relatado, após a execução deste estudo, comprova-se que os efeitos do treinamento resistido e restrição calórica, associados ou realizados separados, foram eficientes para melhorar os parâmetros clínicos e moleculares, prevenindo o surgimento da condição de hipertensão, melhorando a função vascular, a resposta insulínica, a atividade MMP-2 e remodelamento da aorta com aumento da complacência vascular, na condição de hipertensão induzida pela OVX em ratas *Holtzman*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, T. C. **Hematoxillin and eosin**, In: **Prophet, EB, Mills, B. Arington, JB, Sobin, LH. Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington. DC: Armed Forces Institute of Pathology. , 1992.

AMALINEI, C.; CARUNTU, I. D.; BALAN, R. A. Biology of metalloproteinases. **Rom J Morphol Embryol**, v. 48, n. 4, p. 323-34, 2007. ISSN 1220-0522 (Print) 1220-0522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18060181> >.

ANDERSON, R. M.; SHANMUGANAYAGAM, D.; WEINDRUCH, R. Caloric restriction and aging: studies in mice and monkeys. **Toxicol Pathol**, v. 37, n. 1, p. 47-51, Jan 2009. ISSN 1533-1601 (Electronic) 0192-6233 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19075044> >.

ANTON, S.; LEEUWENBURGH, C. Fasting or caloric restriction for healthy aging. **Exp Gerontol**, v. 48, n. 10, p. 1003-5, Oct 2013. ISSN 1873-6815 (Electronic) 0531-5565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23639403> >.

ASIKAINEN, T. M.; KUKKONEN-HARJULA, K.; MIILUNPALO, S. Exercise for health for early postmenopausal women: a systematic review of randomised controlled trials. **Sports Med**, v. 34, n. 11, p. 753-78, 2004. ISSN 0112-1642 (Print) 0112-1642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15456348> >.

AT SMA, F. *et al.* Postmenopausal status and early menopause as independent risk factors for cardiovascular disease: a meta-analysis. **Menopause**, v. 13, n. 2, p. 265-79, Mar-Apr 2006. ISSN 1072-3714 (Print) 1072-3714 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16645540> >.

AZAMBUJA, M. I. *et al.* Economic burden of severe cardiovascular diseases in Brazil: an estimate based on secondary data. **Arq Bras Cardiol**, v. 91, n. 3, p. 148-55, 163-71, Sep 2008. ISSN 1678-4170 (Electronic) 0066-782X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18853056> >.

BARRY, D. I. Cerebrovascular aspects of antihypertensive treatment. **Am J Cardiol**, v. 63, n. 6, p. 14C-18C, Feb 02 1989. ISSN 0002-9149 (Print) 0002-9149 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2643848> >.

BELZ, G. G. Elastic properties and Windkessel function of the human aorta. **Cardiovasc Drugs Ther**, v. 9, n. 1, p. 73-83, Feb 1995. ISSN 0920-3206 (Print) 0920-3206 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7786838> >.

BEN ALI, S. et al. Postmenopausal hypertension, abdominal obesity, apolipoprotein and insulin resistance. **Clin Exp Hypertens**, v. 38, n. 4, p. 370-4, 2016. ISSN 1525-6006 (Electronic) 1064-1963 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27149156> >.

BERILLIS, P. The Role of Collagen in the Aorta's Structure. **The Open Circulation and Vascular Journal**, v. 6, p. 1-8, 2013.

BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **J Endocrinol**, v. 40, n. 4, p. 527-8, Apr 1968. ISSN 0022-0795 (Print) 0022-0795 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4868415> >.

BIRKEDAL-HANSEN, H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. **Curr Opin Cell Biol**, v. 7, n. 5, p. 728-35, Oct 1995. ISSN 0955-0674 (Print) 0955-0674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8573349> >.

BONORA, E. et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 68, n. 2, p. 374-8, Feb 1989. ISSN 0021-972X (Print) 0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2645308> >.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Manual de Atenção à Mulher no Climatério/Menopausa / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. SAÚDE.**, M. R. D. Brasília: Ministério da Saúde 2008.

BRINTON, R. D. Minireview: Translational Animal Models of Human Menopause: Challenges and Emerging Opportunities. **Endocrinology**, v. 153, n. 8, p. 3571-3578, 2012.

BRIONES, A. M. et al. Alterations in structure and mechanics of resistance arteries from ouabain-induced hypertensive rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 291, n. 1, p. H193-201, Jul 2006. ISSN 0363-6135 (Print) 0363-6135 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16473962> >.

BROCHU, M. et al. Resistance training does not contribute to improving the metabolic profile after a 6-month weight loss program in overweight and obese postmenopausal women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, n. 9, p. 3226-33, Sep 2009. ISSN 1945-7197 (Electronic) 0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19567540> >.

BRUM, P. C. et al. Exercise training increases baroreceptor gain sensitivity in normal and hypertensive rats. **Hypertension**, v. 36, n. 6, p. 1018-22, Dec 2000. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11116118>>.

BUTTAR, H. S.; LI, T.; RAVI, N. Prevention of cardiovascular diseases: Role of exercise, dietary interventions, obesity and smoking cessation. **Exp Clin Cardiol**, v. 10, n. 4, p. 229-49, Winter 2005. ISSN 1205-6626 (Print)
1205-6626 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19641674> >.

CANTINI, C. et al. Aminoguanidine and aortic wall mechanics, structure, and composition in aged rats. **Hypertension**, v. 38, n. 4, p. 943-8, Oct 2001. ISSN 1524-4563 (Electronic)
0194-911X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11641314>>.

CARDIOLOGIA, S. B. D. 7a Diretriz Brasileira De Hipertensão arterial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, n. 3, 2016.

CASIGLIA, E. et al. Lack of influence of menopause on blood pressure and cardiovascular risk profile: a 16-year longitudinal study concerning a cohort of 568 women. **J Hypertens**, v. 14, n. 6, p. 729-36, Jun 1996. ISSN 0263-6352 (Print)
0263-6352 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8793695> >.

CASTELLO, L. et al. Calorie restriction protects against age-related rat aorta sclerosis. **FASEB J**, v. 19, n. 13, p. 1863-5, Nov 2005. ISSN 1530-6860 (Electronic)
0892-6638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16150801> >.

CERAVOLO, G. S. et al. Efeitos do estrógeno no sistema cardiovascular. **Hipertensão**, v. 10, n. 4, p. 124-130, 2007.

CHEN, C. H. et al. Exercise training ameliorates glucosamine-induced insulin resistance in ovariectomized rats. **Menopause**, Dec 05 2016. ISSN 1530-0374 (Electronic)
1072-3714 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27922941> >.

CHOBANIAN, A. V. et al. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1206-52, Dec 2003. ISSN 1524-4563 (Electronic)
0194-911X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14656957>>.

CHOW, A. K.; CENA, J.; SCHULZ, R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 2, p. 189-205, 2007. ISSN 00071188
14765381.

CONTI, F. F. et al. Positive effect of combined exercise training in a model of metabolic syndrome and menopause: autonomic, inflammatory, and oxidative stress evaluations. **Am J**

Physiol Regul Integr Comp Physiol, v. 309, n. 12, p. R1532-9, Dec 15 2015. ISSN 1522-1490 (Electronic) 0363-6119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26423710> >.

COUTINHO, T. Arterial stiffness and its clinical implications in women. **Can J Cardiol**, v. 30, n. 7, p. 756-64, Jul 2014. ISSN 1916-7075 (Electronic) 0828-282X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24970788> >.

COYLEWRIGHT, M.; RECKELOFF, J. F.; OUYANG, P. Menopause and hypertension: an age-old debate. **Hypertension**, v. 51, n. 4, p. 952-9, Apr 2008. ISSN 1524-4563 (Electronic) 0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18259027> >.

DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L.; SNYDER, S. H. A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. **Ann Neurol**, v. 32, n. 3, p. 297-311, Sep 1992. ISSN 0364-5134 (Print) 0364-5134 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1384420> >.

DE RICHELIEU, L. T. et al. NO-independent mechanism mediates tempol-induced renal vasodilation in SHR. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 289, n. 6, p. F1227-34, Dec 2005. ISSN 1931-857X (Print) 1522-1466 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16033921> >.

DEROSA, G. et al. Matrix metalloproteinase-2, -9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in patients with hypertension. **Endothelium**, v. 13, n. 3, p. 227-31, May-Jun 2006. ISSN 1062-3329 (Print) 1026-793X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16840178> >.

DITA FITRIANI; ANDREANYTA MELIALA; AGUSTININGSIH, D. The effect of long-term high-fat diet in ovariectomized Wistar rat on leptin serum levels. **J Med Sci**, v. 48, n. 2, p. 69-80, 2016.

DiPIETRO, L. Exercise training and fat metabolism after menopause: implications for improved metabolic flexibility in aging. **J Appl Physiol**. v.109, p.1569-1570, 2010.

DOLINSKY, V. W. et al. Calorie restriction prevents hypertension and cardiac hypertrophy in the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v. 56, n. 3, p. 412-21, Sep 2010. ISSN 1524-4563 (Electronic) 0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20696994> >.

DOMINGOS, M. M. et al. Resistance training restores the gene expression of molecules related to fat oxidation and lipogenesis in the liver of ovariectomized rats. **Eur J Appl Physiol**, v. 112, n. 4, p. 1437-44, Apr 2012. ISSN 1439-6327 (Electronic)

1439-6319 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21830097> >.

DROZDA, J., JR. et al. ACCF/AHA/AMA-PCPI 2011 performance measures for adults with coronary artery disease and hypertension: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Performance Measures and the American Medical Association-Physician Consortium for Performance Improvement. **Circulation**, v. 124, n. 2, p. 248-70, Jul 12 2011. ISSN 1524-4539 (Electronic) 0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21670226> >.

DUSSE, L. M. S. A., ET AL., . Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343-2003, 2003.

EL-MAS, M. M.; ABDEL-RAHMAN, A. A. Longitudinal assessment of the effects of oestrogen on blood pressure and cardiovascular autonomic activity in female rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 36, n. 10, p. 1002-9, Oct 2009. ISSN 1440-1681 (Electronic) 0305-1870 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19413598> >.

FERESIN, R. G. et al. Effects of obesity on bone mass and quality in ovariectomized female Zucker rats. **J Obes**, v. 2014, p. 690123, 2014. ISSN 2090-0716 (Electronic) 2090-0708 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25309751> >.

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

FLUES, K. et al. Exercise training associated with estrogen therapy induced cardiovascular benefits after ovarian hormones deprivation. **Maturitas**, v. 65, n. 3, p. 267-71, Mar 2010. ISSN 1873-4111 (Electronic) 0378-5122 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20004069> >.

FONTANA, L. et al. Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 17, p. 6659-63, Apr 27 2004. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15096581> >.

FRANK, L. L. et al. Effects of exercise on metabolic risk variables in overweight postmenopausal women: a randomized clinical trial. **Obes Res**, v. 13, n. 3, p. 615-25, Mar 2005. ISSN 1071-7323 (Print) 1071-7323 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15833948> >.

FU, Q.; VONGPATANASIN, W.; LEVINE, B. D. Neural and nonneural mechanisms for sex differences in elderly hypertension: can exercise training help? **Hypertension**, v. 52, n. 5, p. 787-94, Nov 2008. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18852385> >.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-6, Nov 27 1980. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6253831> >.

GALLEY, H. F.; WEBSTER, N. R. Physiology of the endothelium. **Br J Anaesth**, v. 93, n. 1, p. 105-13, Jul 2004. ISSN 0007-0912 (Print)
0007-0912 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15121728> >.

GEARY, N.; ASARIAN, L. Cyclic estradiol treatment normalized body weight and test meal size in ovariectomized rats. . **Physiol Behav**, v. 67, p. 371-7, 1999.

GIELEN, S.; SCHULER, G.; HAMBRECHT, R. Exercise training in coronary artery disease and coronary vasomotion. **Circulation**, v. 103, n. 1, p. E1-6, Jan 02 2001. ISSN 1524-4539 (Electronic)
0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11136704> >.

GUYTON, A. C. et al. A Systems Analysis Approach to Understanding Long-Range Arterial Blood Pressure Control and Hypertension. **Circulation Research**, v. 35, n. 2, 1974.

HARLOW, S. D. et al. Executive summary of the Stages of Reproductive Aging Workshop + 10: addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 97, n. 4, p. 1159-68, Apr 2012. ISSN 1945-7197 (Electronic)
0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22344196> >.

HARRIS, K. A.; HOLLY, R. G. Physiological response to circuit weight training in borderline hypertensive subjects. **Med Sci Sports Exerc**, v. 19, n. 3, p. 246-52, Jun 1987. ISSN 0195-9131 (Print)
0195-9131 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3600238> >.

HART, E. C.; CHARKOUDIAN, N. Sympathetic neural regulation of blood pressure: influences of sex and aging. **Physiology (Bethesda)**, v. 29, n. 1, p. 8-15, Jan 2014. ISSN 1548-9221 (Electronic)
1548-9221 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24382867> >.

HICKEY, M.; AMBEKAR, M.; HAMMOND, I. Should the ovaries be removed or retained at the time of hysterectomy for benign disease? **Hum Reprod Update**, v. 16, n. 2, p. 131-41, Mar-Apr 2010. ISSN 1460-2369 (Electronic)
1355-4786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19793841> >.

HIGASHI, Y.; YOSHIKUMI, M. Exercise and endothelial function: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. **Pharmacol Ther**, v. 102, n. 1, p. 87-96, Apr 2004. ISSN 0163-7258 (Print) 0163-7258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15056500> >.

HINOJOSA-LABORDE, C. et al. Ovariectomy augments hypertension in aging female Dahl salt-sensitive rats. **Hypertension**, v. 44, n. 4, p. 405-9, Oct 2004. ISSN 1524-4563 (Electronic) 0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15337736> >.

HORTA, P. P.; DE CARVALHO, J. J.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Exercise training attenuates blood pressure elevation and adverse remodeling in the aorta of spontaneously hypertensive rats. **Life Sci**, v. 77, n. 26, p. 3336-43, Nov 12 2005. ISSN 0024-3205 (Print) 0024-3205 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15964024> >.

HUANG, A. et al. Epoxyeicosatrienoic acids are released to mediate shear stress-dependent hyperpolarization of arteriolar smooth muscle. **Circ Res**, v. 96, n. 3, p. 376-83, Feb 18 2005. ISSN 1524-4571 (Electronic) 0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15637296> >.

IRIGOYEN, M. C. et al. Exercise training improves baroreflex sensitivity associated with oxidative stress reduction in ovariectomized rats. **Hypertension**, v. 46, n. 4, p. 998-1003, Oct 2005. ISSN 1524-4563 (Electronic) 0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16157791> >.

JACOB, H. J. The rat: a model used in biomedical research. **Methods Mol Biol**, v. 597, p. 1-11, 2010. ISSN 1940-6029 (Electronic) 1064-3745 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20013222> >.

JANI, B.; RAJKUMAR, C. Ageing and vascular ageing. **Postgrad Med J**, v. 82, n. 968, p. 357-62, Jun 2006. ISSN 1469-0756 (Electronic) 0032-5473 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16754702> >.

JANUS, A. et al. Insulin Resistance and Endothelial Dysfunction Constitute a Common Therapeutic Target in Cardiometabolic Disorders. **Mediators Inflamm**, v. 2016, p. 3634948, 2016. ISSN 1466-1861 (Electronic) 0962-9351 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27413253> >.

KAESS, B. M. et al. Aortic stiffness, blood pressure progression, and incident hypertension. **JAMA**, v. 308, n. 9, p. 875-81, Sep 5 2012. ISSN 1538-3598 (Electronic)

0098-7484 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22948697> >.

KAHONEN, M. et al. Influence of gender on control of arterial tone in experimental hypertension. **Am J Physiol**, v. 275, n. 1 Pt 2, p. H15-22, Jul 1998. ISSN 0002-9513 (Print) 0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9688891> >.

KALU, D. N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone Miner**, v. 15, n. 3, p. 175-91, Dec 1991. ISSN 0169-6009 (Print) 0169-6009 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1773131> >.

KANDASAMY, A. D. et al. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. **Cardiovasc Res**, v. 85, n. 3, p. 413-23, Feb 1 2010. ISSN 1755-3245 (Electronic) 0008-6363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19656780> >.

KENDALL, K. L. Women and exercise in aging **Journal of Sport and Health Science**, v. 3, n. 2, p. 170-178, 2014.

KHALIL, R. A. Sex hormones as potential modulators of vascular function in hypertension. **Hypertension**, v. 46, n. 2, p. 249-54, Aug 2005. ISSN 1524-4563 (Electronic) 0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15983238> >.

KOHN, J. C.; LAMPI, M. C.; REINHART-KING, C. A. Age-related vascular stiffening: causes and consequences. **Front Genet**, v. 6, p. 112, 2015. ISSN 1664-8021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25926844> >.

KOLETSKY, S. Animal model: obese hypertensive rat. **Am J Pathol**, v. 81, n. 2, p. 463-6, Nov 1975. ISSN 0002-9440 (Print) 0002-9440 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1190297> >.

KULLER, L.H.; SIMKIN-SILVERMAN, L.R.; WING, R.R.; MEILAHN E.N.; IVES D.G. Women's Healthy Lifestyle Project: A Randomized Clinical Trial Results at 54 Months Circulation. v.103, p.32-37, 2001.

KUNES, J.; DOBESOVA, Z.; ZICHA, J. Altered balance of main vasopressor and vasodepressor systems in rats with genetic hypertension and hypertriglyceridaemia. **Clin Sci (Lond)**, v. 102, n. 3, p. 269-77, Mar 2002. ISSN 0143-5221 (Print) 0143-5221 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11869167> >.

LAM, K. K. et al. Estrogen deficiency-induced alterations of vascular MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 in ovariectomized rats. **Am J Hypertens**, v. 22, n. 1, p. 27-34, Jan 2009. ISSN 1941-7225 (Electronic)

0895-7061 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19023275> >.

LAUFS, U. et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. **Circulation**, v. 109, n. 2, p. 220-6, Jan 20 2004. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14691039> >.

LAW, M. R.; MORRIS, J. K.; WALD, N. J. Use of blood pressure lowering drugs in the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of 147 randomised trials in the context of expectations from prospective epidemiological studies. **BMJ**, v. 338, p. b1665, May 19 2009. ISSN 1756-1833 (Electronic)

0959-535X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19454737> >.

LEITE, R. D. et al. Resistance Training may concomitantly benefit body composition, blood pressure and muscle MMP-2 activity on the left ventricle of high-fat fed diet rats. **METABOLISM CLINICAL AND EXPERIMENTAL**, 2013.

LEITE, R. D. et al. Effects of ovariectomy and resistance training on lipid content in skeletal muscle, liver, and heart; fat depots; and lipid profile. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 34, n. 6, p. 1079-86, Dec 2009. ISSN 1715-5312 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20029517> >.

LEITE, R. D. et al. Menopause: Highlighting the Effects of Resistance Training. **Int J Sports Med** v. 31, p. 761-767, 2010.

LEWIS, C. E. et al. Overview of women's decision making regarding elective hysterectomy, oophorectomy, and hormone replacement therapy. **J Womens Health Gend Based Med**, v. 9 Suppl 2, p. S5-14, 2000. ISSN 1524-6094 (Print) 1524-6094 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10714741> >.

LIFTON, R. P.; GHARAVI, A. G.; GELLER, D. S. Molecular mechanisms of human hypertension. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 545-56, Feb 23 2001. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11239411> >.

LIMA, N. et al. Effects of resistance exercise on ascendent aorta on ovariectomized elderly rats. **J. Morphol. Sci.**, v. 9, n. 4, p. 248-252, 2012.

LIMA, R.; WOFFORD, M.; RECKELOFF, J. F. Hypertension in postmenopausal women. **Curr Hypertens Rep**, v. 14, n. 3, p. 254-60, Jun 2012. ISSN 1534-3111 (Electronic) 1522-6417 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22427070> >.

LINDSTEDT, S. Krogh 1929 or 'the Krogh principle'. **J Exp Biol**, v. 217, n. Pt 10, p. 1640-1, May 15 2014. ISSN 1477-9145 (Electronic) 0022-0949 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24829321> >.

MAGER, D. E. et al. Caloric restriction and intermittent fasting alter spectral measures of heart rate and blood pressure variability in rats. **FASEB J**, v. 20, n. 6, p. 631-7, Apr 2006. ISSN 1530-6860 (Electronic) 0892-6638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16581971> >.

MARCHON, C. et al. Effects of moderate exercise on the biochemical, physiological, morphological and functional parameters of the aorta in the presence of estrogen deprivation and dyslipidemia: an experimental model. **Cell Physiol Biochem**, v. 35, n. 1, p. 397-405, 2015. ISSN 1421-9778 (Electronic) 1015-8987 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25591780> >.

MARQUES, C. M. et al. Exercise training attenuates cardiovascular adverse remodeling in adult ovariectomized spontaneously hypertensive rats. **Menopause**, v. 13, n. 1, p. 87-95, Jan-Feb 2006. ISSN 1072-3714 (Print) 1072-3714 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16607103> >.

MATTAGAJASINGH, I. et al. SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 37, p. 14855-60, Sep 11 2007. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17785417> >.

MATTEI, P. et al. Endothelial function in hypertension. **J Nephrol**, v. 10, n. 4, p. 192-7, Jul-Aug 1997. ISSN 1121-8428 (Print) 1121-8428 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9377726> >.

MATTHEWS, K. A. et al. Body mass index in mid-life women: relative influence of menopause, hormone use, and ethnicity. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 25, n. 6, p. 863-73, Jun 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11439301> >.

MATURANA, M. A., MARIA CLAUDIA IRIGOYEN, M. C., SPRITZER, P. M. . MENOPAUSE, ESTROGENS, AND ENDOTHELIAL DYSFUNCTION- CURRENT CONCEPTS. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 62, n. 1, p. 77-86, 2007.

MAYET, J.; HUGHES, A. Cardiac and vascular pathophysiology in hypertension. **Heart**, v. 89, n. 9, p. 1104-9, Sep 2003. ISSN 1468-201X (Electronic) 1355-6037 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12923045> >.

MENDELSON, M. E.; KARAS, R. H. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. **N Engl J Med**, v. 340, n. 23, p. 1801-11, Jun 10 1999. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10362825> >.

MENDONCA LDE, S.; FERNANDES-SANTOS, C.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Cardiac and aortic structural alterations due to surgically-induced menopause associated with renovascular hypertension in rats. **Int J Exp Pathol**, v. 88, n. 4, p. 301-9, Aug 2007. ISSN 0959-9673 (Print)

0959-9673 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17696911> >.

MERCURO, G. et al. Menopause induced by oophorectomy reveals a role of ovarian estrogen on the maintenance of pressure homeostasis. **Maturitas**, v. 47, n. 2, p. 131-8, Feb 20 2004. ISSN 0378-5122 (Print)

0378-5122 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14757272> >.

MINAMI, N. et al. Exercise training fails to modify arterial baroreflex sensitivity in ovariectomized female rats. **Tohoku J Exp Med**, v. 211, n. 4, p. 339-45, Apr 2007. ISSN 0040-8727 (Print)

0040-8727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17409673> >.

MUECK, A. O.; SEEGER, H. Effect of hormone therapy on BP in normotensive and hypertensive postmenopausal women. **Maturitas**, v. 49, n. 3, p. 189-203, Nov 15 2004. ISSN 0378-5122 (Print)

0378-5122 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15488347> >.

MULVANY, M. J. Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. **News Physiol Sci**, v. 17, p. 105-9, Jun 2002. ISSN 0886-1714 (Print)

0886-1714 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12021380> >.

MUNIYAPPA, R.; SOWERS, J. R. Role of insulin resistance in endothelial dysfunction. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 14, n. 1, p. 5-12, Mar 2013. ISSN 1573-2606 (Electronic)

1389-9155 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23306778> >.

MURASE, T. et al. Effects of estrogen on cardiovascular injury in ovariectomized female DahlS.Z-Lepr(fa)/Lepr(fa) rats as a new animal model of metabolic syndrome. **Hypertension**, v. 59, n. 3, p. 694-704, Mar 2012. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22275535> >.

NELSON, H. D. Menopause. **Lancet**, v. 371, n. 9614, p. 760-70, Mar 1 2008. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18313505> >.

OMODEI, D.; FONTANA, L. Calorie restriction and prevention of age-associated chronic disease. **FEBS Lett**, v. 585, n. 11, p. 1537-42, Jun 6 2011. ISSN 1873-3468 (Electronic)

0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21402069> >.

ORGANIZATION, W. H. Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020., Geneva, Switzerland 2013. Disponível em: < <http://www.who.int/en/> >.

ORGANIZATION, W. H. Cardiovascular diseases (CVDs). 2017. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> >.

PAPAZAFIROPOULOU, A.; TENTOLOURIS, N. Matrix metalloproteinases and cardiovascular diseases. **Hippokratia**, v. 13, n. 2, p. 76-82, Apr 2009. ISSN 1790-8019 (Electronic) 1108-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19561775> >.

PHILLIPS, J.; HOGAN, A.; LYNCH, E. Animals in research: rats. 2017. Disponível em: < <http://theconversation.com/animals-in-research-rats-16634> >. Acesso em: 23 May.

PIGHON, A. et al. Resistance training attenuates fat mass regain after weight loss in ovariectomized rats. **Maturitas**, v. 64, n. 1, p. 52-7, Sep 20 2009. ISSN 1873-4111 (Electronic) 0378-5122 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19683884> >.

POEHLMAN, E. T.; TCHERNOF, A. Traversing the menopause: changes in energy expenditure and body composition. **Coron Artery Dis**, v. 9, n. 12, p. 799-803, 1998. ISSN 0954-6928 (Print) 0954-6928 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9894924> >.

POSA, A. et al. Cardioprotective effects of voluntary exercise in a rat model: role of matrix metalloproteinase-2. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2015, p. 876805, 2015. ISSN 1942-0994 (Electronic) 1942-0994 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25874025> >.

POSA, A. et al. Exercise training and calorie restriction influence the metabolic parameters in ovariectomized female rats. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2015b, p. 787063, 2015. ISSN 1942-0994 (Electronic) 1942-0994 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25874022> >.

PRASANNARONG, M.; VICHAIWONG, K.; SAENGSRISUWAN, V. Calorie restriction prevents the development of insulin resistance and impaired insulin signaling in skeletal muscle of ovariectomized rats. **Biochim Biophys Acta**, v. 1822, n. 6, p. 1051-61, Jun 2012. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22406051> >.

PUG, T.D.; KLOPP, R.G.; WEINDRUCH R. Controlling caloric consumption: protocols for rodents and rhesus monkeys. **Neurobiology of aging**. v.20, p. 157-165, 1999.

RECKELOFF, J. F. Gender differences in the regulation of blood pressure. **Hypertension**, v. 37, n. 5, p. 1199-208, May 2001. ISSN 1524-4563 (Electronic) 0194-911X (Linking).
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11358929> >.

RIVERA, C. M. et al. Increased mortality for neurological and mental diseases following early bilateral oophorectomy. **Neuroepidemiology**, v. 33, n. 1, p. 32-40, 2009. ISSN 1423-0208 (Electronic) 0251-5350 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19365140> >.

ROLIM, R. M. C. A., S. L.; MONTEIRO, H. L. Hipertensão e exercício: custos do tratamento ambulatorial, antes e após a adoção da prática regular e orientada de condicionamento físico. . **Hipertensão**, v. 10, n. 2, p. 54-61, 2007.

ROTH, G. S.; INGRAM, D. K. Manipulation of health span and function by dietary caloric restriction mimetics. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1363, p. 5-10, Jan 2016. ISSN 1749-6632 (Electronic) 0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26214681> >.

SANDBERG, K. Response to Can the Study of Female Rats Help Our Understanding of Women? **Hypertension**, v. 52, n. 6, Dec 2008. ISSN 1524-4563 (Electronic) 0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25278642> >.

SCHULZ, R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 47, p. 211-42, 2007. ISSN 0362-1642 (Print) 0362-1642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17129183> >.

SEHGEL, N. L.; VATNER, S. F.; MEININGER, G. A. "Smooth Muscle Cell Stiffness Syndrome"-Revisiting the Structural Basis of Arterial Stiffness. **Front Physiol**, v. 6, p. 335, 2015. ISSN 1664-042X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26635621> >.

SERGIO GIRÃO BARROSO; VIRGÍNIA GENELHU DE ABREU; FRANCISCHETTI, E. A. A Participação do Tecido Adiposo Visceral na Gênese da Hipertensão e Doença Cardiovascular Aterogênica. Um Conceito Emergente. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 78, n. 6, 2002.

SEYMOUR, E. M. et al. Moderate calorie restriction improves cardiac remodeling and diastolic dysfunction in the Dahl-SS rat. **J Mol Cell Cardiol**, v. 41, n. 4, p. 661-8, Oct 2006. ISSN 0022-2828 (Print) 0022-2828 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16934290> >.

SHELLING, A. N. Premature ovarian failure. **Reproduction**, v. 140, n. 5, p. 633-41, Nov 2010. ISSN 1741-7899 (Electronic)

1470-1626 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20716613> >.

SHERRATT, M. J. Tissue elasticity and the ageing elastic fibre. **AGE**, v. 31, p. 305-325, 2009.

SHIGUEMOTO, G. E. et al. Effects of resistance training on matrix metalloproteinase-2 activity and biomechanical and physical properties of bone in ovariectomized and intact rats. **Scand J Med Sci Sports**, v. 22, n. 5, p. 607-17, Oct 2012. ISSN 1600-0838 (Electronic) 0905-7188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21362057> >.

SILVEIRA, L. C. et al. Comparison of the effects of aerobic and resistance training on cardiac autonomic adaptations in ovariectomized rats. **Auton Neurosci**, v. 162, n. 1-2, p. 35-41, Jul 5 2011. ISSN 1872-7484 (Electronic) 1566-0702 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21429820> >.

SON, W. M. et al. Combined exercise reduces arterial stiffness, blood pressure, and blood markers for cardiovascular risk in postmenopausal women with hypertension. **Menopause**, v. 24, n. 3, p. 262-268, Mar 2017. ISSN 1530-0374 (Electronic) 1072-3714 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27779565> >.

SOUZA, R. R. D. et al. Resistance training attenuates the effects of aging in the aorta of Wistar rats. **Motriz, Rio Claro**, v. 21, n. 4, p. 421-427, 2015.

SPERETTA, G. F. et al. The effects of exercise modalities on adiposity in obese rats. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 67, n. 12, p. 1469-77, Dec 2012. ISSN 1980-5322 (Electronic) 1807-5932 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23295603> >.

TATCHUM-TALOM, R.; MARTEL, C.; MARETTE, A. Influence of estrogen on aortic stiffness and endothelial function in female rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 282, n. 2, p. H491-8, Feb 2002. ISSN 0363-6135 (Print) 0363-6135 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11788396> >.

TIBIRIÇA, E. **Fisiopatologia em Medicina Cardiovascular**. Revinter, 2001.

TOMIYAMA, A. J. Beyond interventions: caloric restriction as a scientific model. **Psychosom Med**, v. 74, n. 6, p. 665-6, Jul-Aug 2012. ISSN 1534-7796 (Electronic) 0033-3174 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22753628> >.

TREPANOWSKI, J.F.; CANALE, R.E.; MARSHALL, K.E.; KABIR, M.M.; BLOOMER, R. impact of caloric and dietary restriction regimens on markers of health and longevity in humans and animals: a summary of available findings. **Nutr J**. v.10, p.107-118, 2011.

TSAMIS, A.; KRAWIEC, J. T.; VORP, D. A. Elastin and collagen fibre microstructure of the human aorta in ageing and disease: a review. **J R Soc Interface**, v. 10, n. 83, p. 20121004, Jun 06 2013. ISSN 1742-5662 (Electronic)
1742-5662 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23536538> >.

TSUJIMOTO, G.; LEE, C. H.; HOFFMAN, B. B. Age-related decrease in beta adrenergic receptor-mediated vascular smooth muscle relaxation. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 239, n. 2, p. 411-5, Nov 1986. ISSN 0022-3565 (Print)
0022-3565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2430092> >.

VIEIRA, V. J. et al. Effects of exercise and low-fat diet on adipose tissue inflammation and metabolic complications in obese mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, n. 5, p. E1164-71, May 2009. ISSN 0193-1849 (Print)
0193-1849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19276393> >.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ Res**, v. 92, n. 8, p. 827-39, May 2 2003. ISSN 1524-4571 (Electronic)
0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12730128> >.

WAGENSEIL, J. E.; MECHAM, R. P. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. **Physiol Rev**, v. 89, n. 3, p. 957-89, Jul 2009. ISSN 0031-9333 (Print)
0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19584318> >.

_____. Elastin in large artery stiffness and hypertension. **J Cardiovasc Transl Res**, v. 5, n. 3, p. 264-73, Jun 2012. ISSN 1937-5395 (Electronic)
1937-5387 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22290157> >.

WALFORD, R. L.; HARRIS, S. B.; GUNION, M. W. The calorically restricted low-fat nutrient-dense diet in Biosphere 2 significantly lowers blood glucose, total leukocyte count, cholesterol, and blood pressure in humans. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 23, p. 11533-7, Dec 01 1992. ISSN 0027-8424 (Print)
0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1454844> >.

WEISS, E. P.; FONTANA, L. Caloric restriction: powerful protection for the aging heart and vasculature. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 301, n. 4, p. H1205-19, Oct 2011. ISSN 1522-1539 (Electronic)
0363-6135 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21841020> >.

WIECEK, E. M.; MCCARTNEY, N.; MCKELVIE, R. S. Comparison of direct and indirect measures of systemic arterial pressure during weightlifting in coronary artery disease. **Am J Cardiol**, v. 66, n. 15, p. 1065-9, Nov 01 1990. ISSN 0002-9149 (Print)

0002-9149 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2220633> >.

WILDMAN, P.R.; SCHOTT, L.L.; BROCKWELL, S.; KULLER,L.H.;SUTTON-TYRRELL, K. A dietary and exercise intervention slows menopause-associated progression of subclinical atherosclerosis as measured by intima-media thickness of the carotid arteries. *J Am Coll Cardiol*. v. 44, p. 579 – 85, 2004.

WILLIAMS, J. M.; POLLOCK, J. S.; POLLOCK, D. M. Arterial pressure response to the antioxidant tempol and ETB receptor blockade in rats on a high-salt diet. **Hypertension**, v. 44, n. 5, p. 770-5, Nov 2004. ISSN 1524-4563 (Electronic) 0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15452035> >.

WHITCROFT, S.; HERRIOT, A. Insulin resistance and management of the menopause: a clinical hypothesis in practice. *Menopause Int*. 2011;17(1):24-8.

WYCHERLEY, T. P. et al. Effect of caloric restriction with and without exercise training on oxidative stress and endothelial function in obese subjects with type 2 diabetes. **Diabetes Obes Metab**, v. 10, n. 11, p. 1062-73, Nov 2008. ISSN 1463-1326 (Electronic) 1462-8902 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18435772> >.

YANES, L. L.; RECKELOFF, J. F. Postmenopausal hypertension. **Am J Hypertens**, v. 24, n. 7, p. 740-9, Jul 2011. ISSN 1941-7225 (Electronic) 0895-7061 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21509049> >.

YETIK-ANACAK, G.; CATRAVAS, J. D. Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease. **Vascul Pharmacol**, v. 45, n. 5, p. 268-76, Nov 2006. ISSN 1537-1891 (Print) 1537-1891 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17052961> >.

YIN, F. C. et al. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. **Am J Physiol**, v. 243, n. 6, p. H941-7, Dec 1982. ISSN 0002-9513 (Print) 0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6216817> >.

ZANETTI, M. et al. Caloric restriction improves endothelial dysfunction during vascular aging: Effects on nitric oxide synthase isoforms and oxidative stress in rat aorta. **Exp Gerontol**, v. 45, n. 11, p. 848-55, Nov 2010. ISSN 1873-6815 (Electronic) 0531-5565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20637278> >.

ZERVOUDAKI, A. et al. The effect of Ca²⁺ channel antagonists on plasma concentrations of matrix metalloproteinase-2 and -9 in essential hypertension. **Am J Hypertens**, v. 17, n. 3, p. 273-6, Mar 2004. ISSN 0895-7061 (Print) 0895-7061 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15001203> >.

ZERVOUDAKI, A. et al. Plasma levels of active extracellular matrix metalloproteinases 2 and 9 in patients with essential hypertension before and after antihypertensive treatment. **J Hum Hypertens**, v. 17, n. 2, p. 119-24, Feb 2003. ISSN 0950-9240 (Print) 0950-9240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12574790> >.

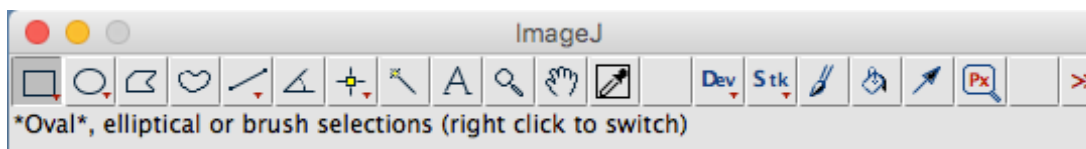
ZHANG, Y.; STEWART, K. G.; DAVIDGE, S. T. Estrogen replacement reduces age-associated remodeling in rat mesenteric arteries. **Hypertension**, v. 36, n. 6, p. 970-4, Dec 2000. ISSN 1524-4563 (Electronic) 0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11116109> >.

ZHAO, Q. et al. Bone selective protective effect of a novel bone-seeking estrogen on trabecular bone in ovariectomized rats. **Calcif Tissue Int**, v. 93, n. 2, p. 172-83, Aug 2013. ISSN 1432-0827 (Electronic) 0171-967X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23780350> >.

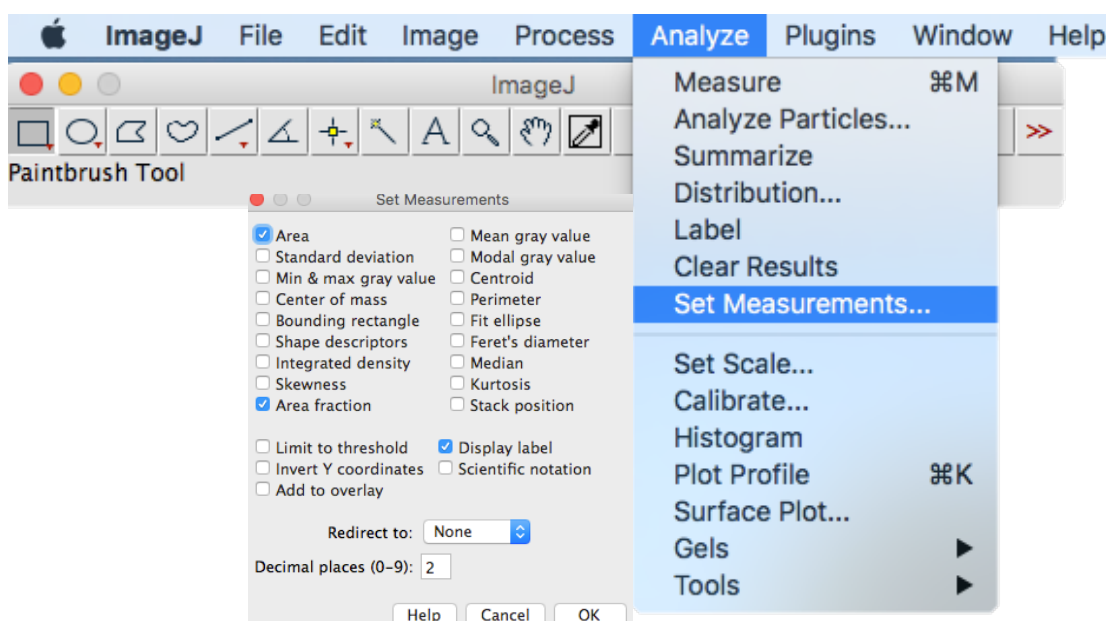
ZITKA, O. et al. Matrix metalloproteinases. **Curr Med Chem**, v. 17, n. 31, p. 3751-68, 2010. ISSN 1875-533X (Electronic) 0929-8673 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20846107> >.

APÊNDICE A – PASSO A PASSO DA QUANTIFICAÇÃO DO COLÁGENO COM PRICOSÍRIUS-RED

Abrir a imagem no ImageJ;

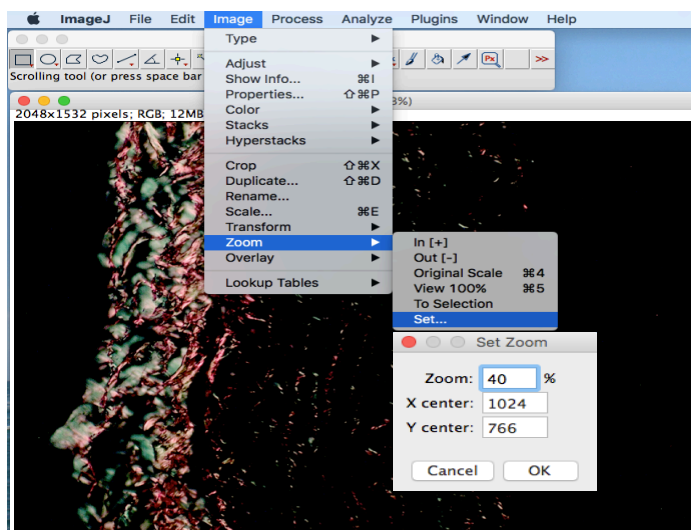


Clicar em *Analyze – Set Measurement* – Seleccione “Area” e “Area Fraction”;



File – Open, abrir a imagem desejada. Com a imagem aberta, clicar em:

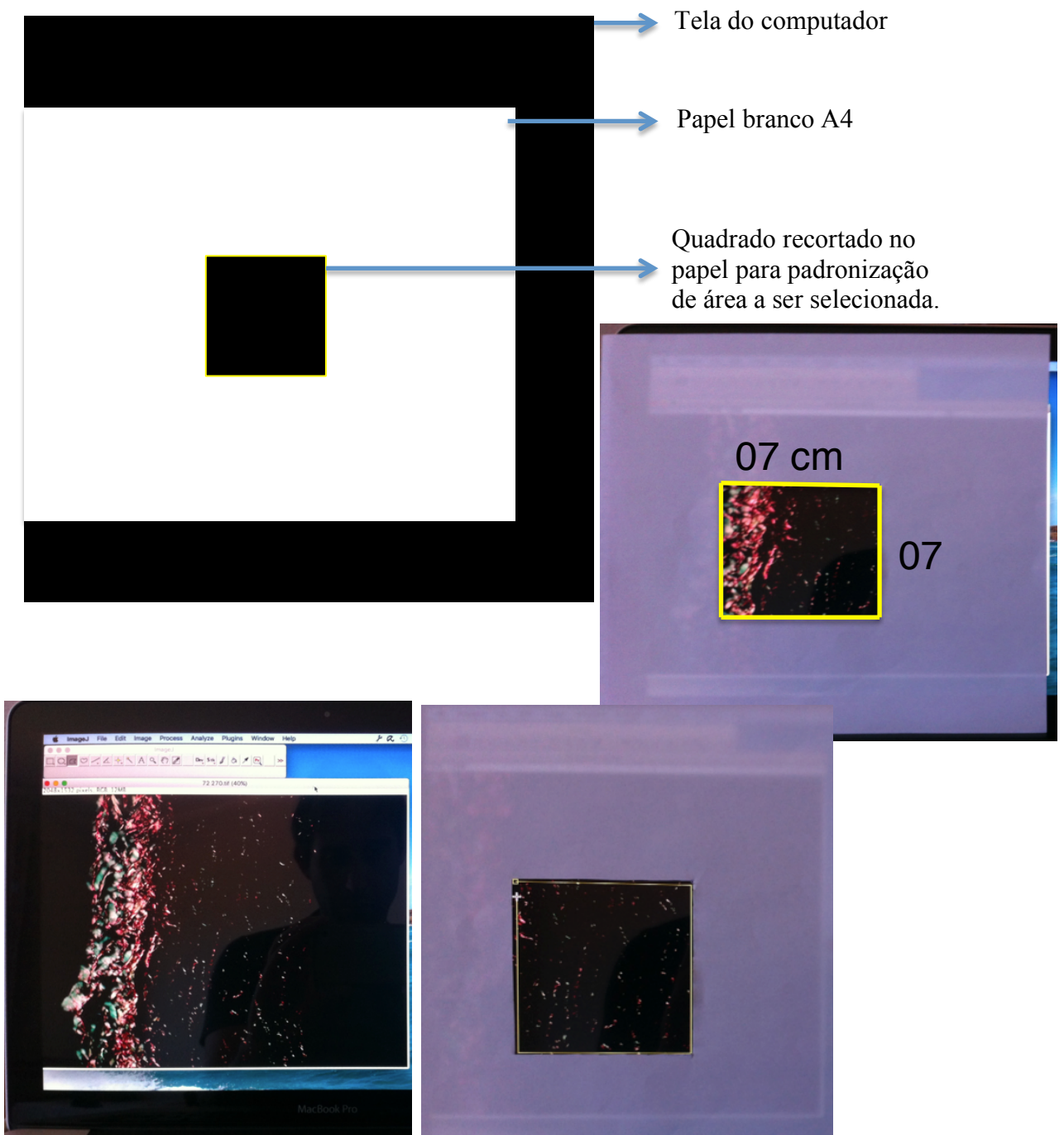
Image – Zoom – Set..., digitar o quanto de Zoom que se deseja padronizar do tamanho de visualização da imagem, no nosso caso, para a aorta, foi de 40%, clicar em Ok.



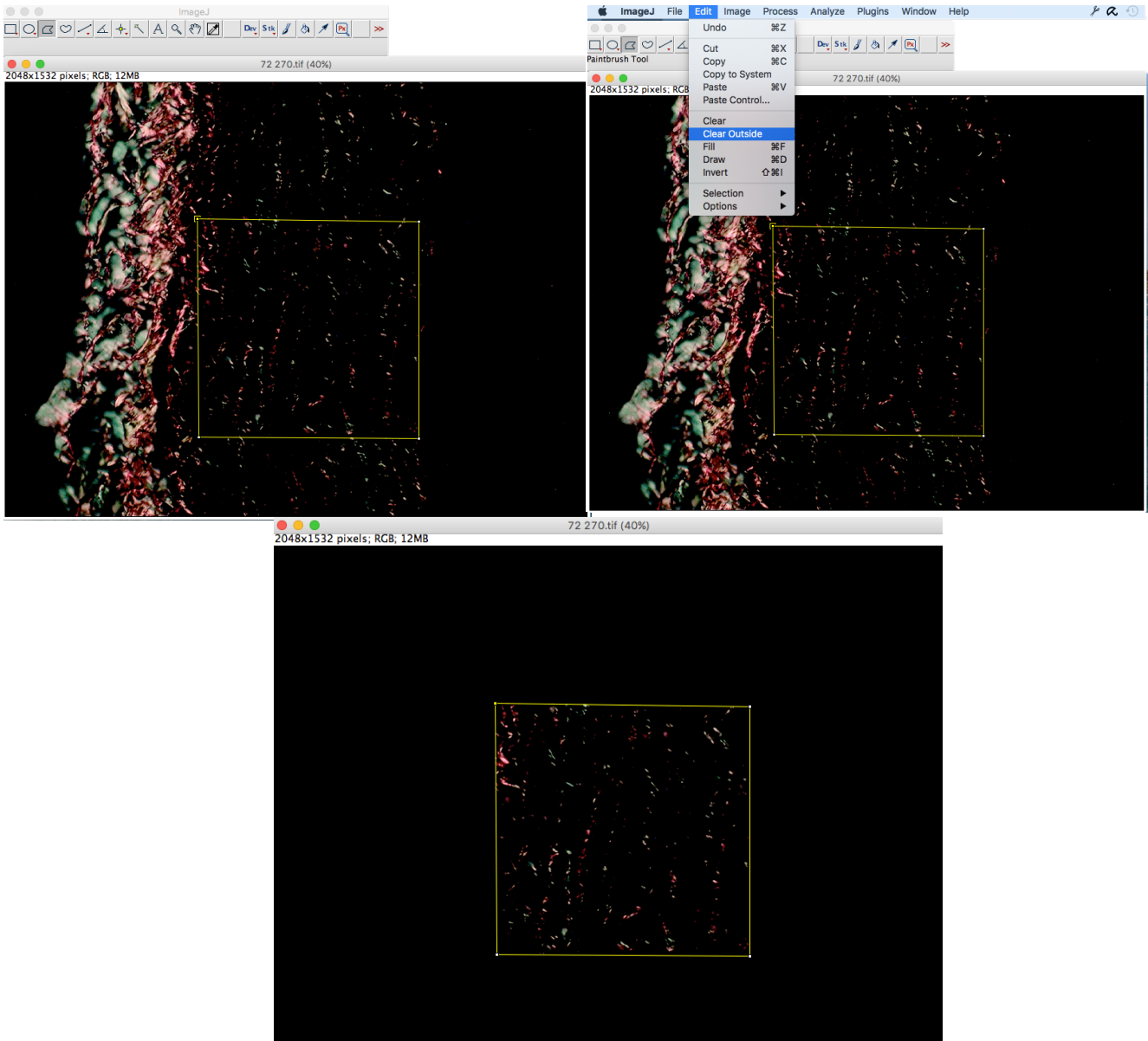
Clicar em “*Polygon selections*” (seleção em polígonos, terceiro ícone), da esquerda para a direita;

Para padronizar o tamanho a ser analisado, foi utilizado um papel sulfite A4, com área marcada e cortada de 7 cm².

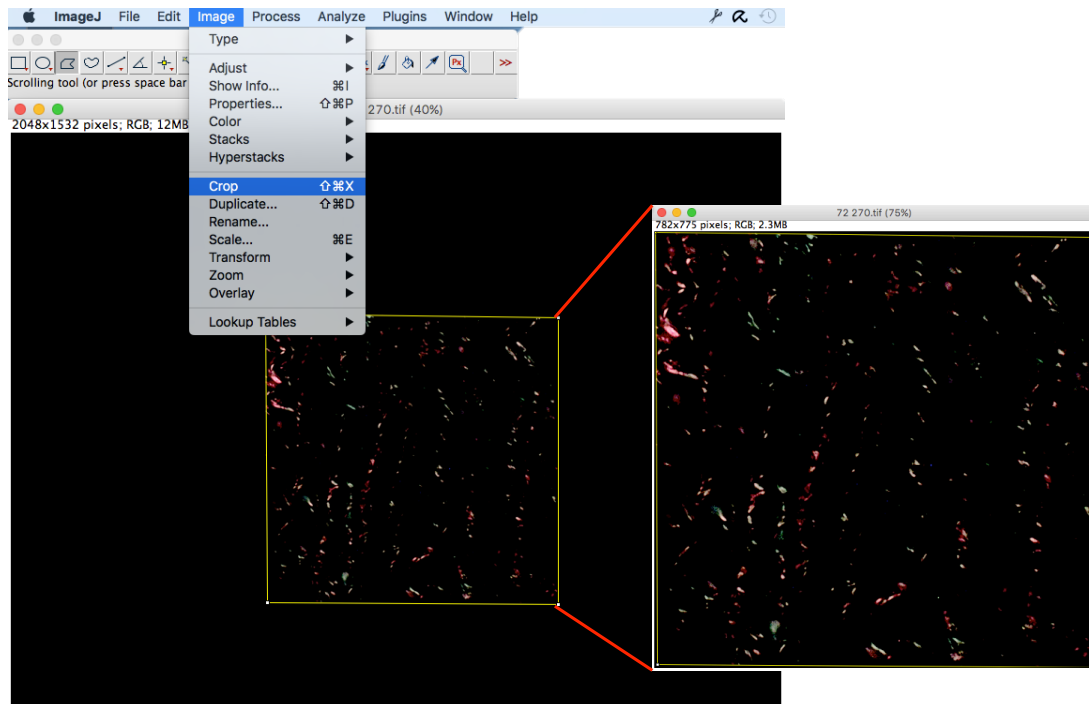
Com a imagem com o zoom padronizado, colocar o papel com o quadrado desenhado sobre a tela. Com o mouse, ajustar a imagem com o quadrado na tela. Com o cursor do mouse, em +, delimitar a área a ser analisada, contornar (virtualmente) o quadrado;



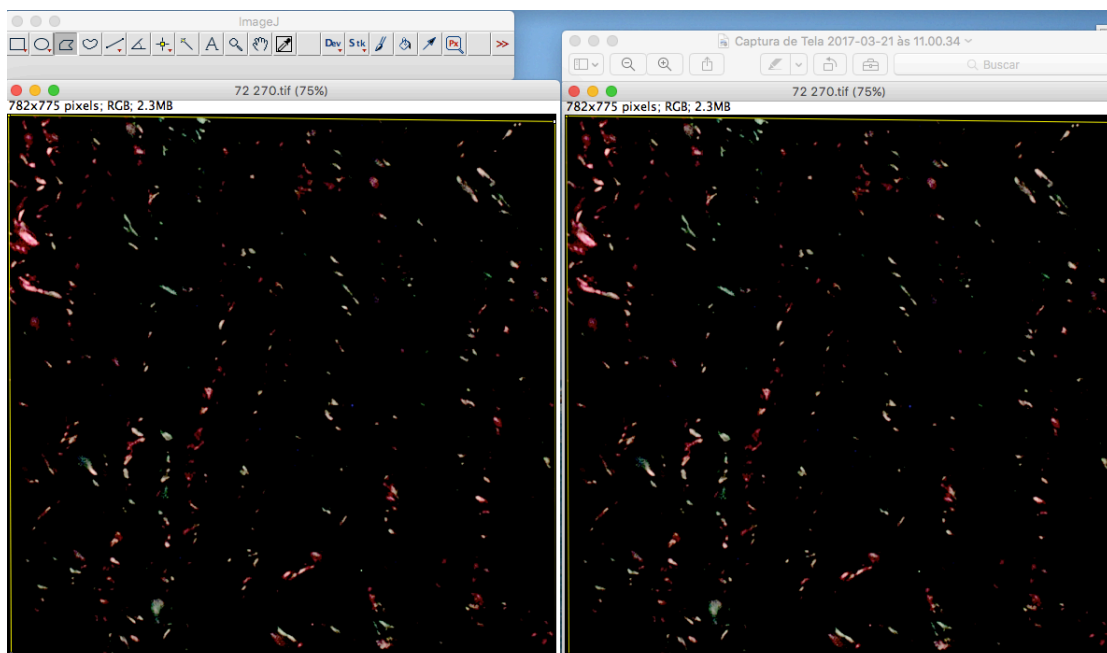
Clicar em *Edit – Clear outside*; o programa corta a imagem e deixa apenas a nossa área de interesse.



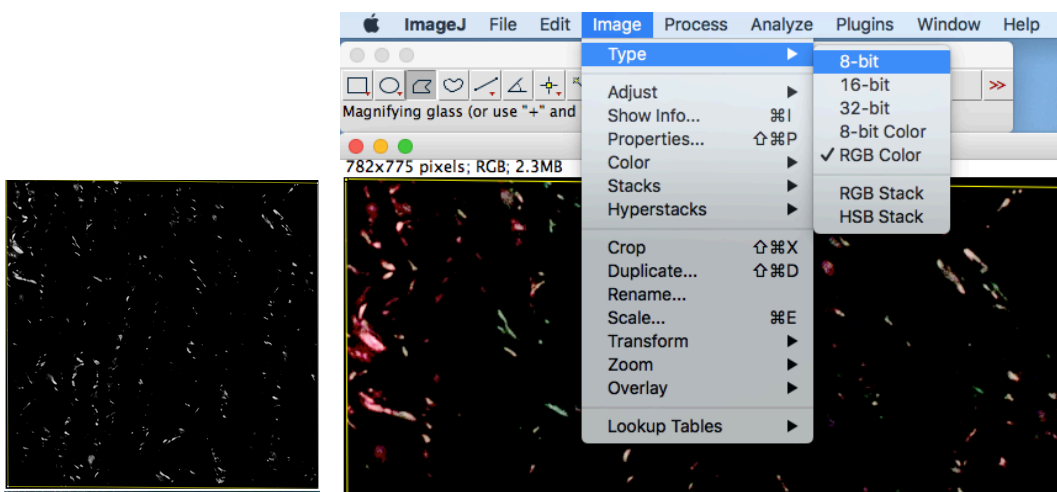
Para deletar a região em preto, clique em *Image – Crop*. Mantenha a área delimitada;



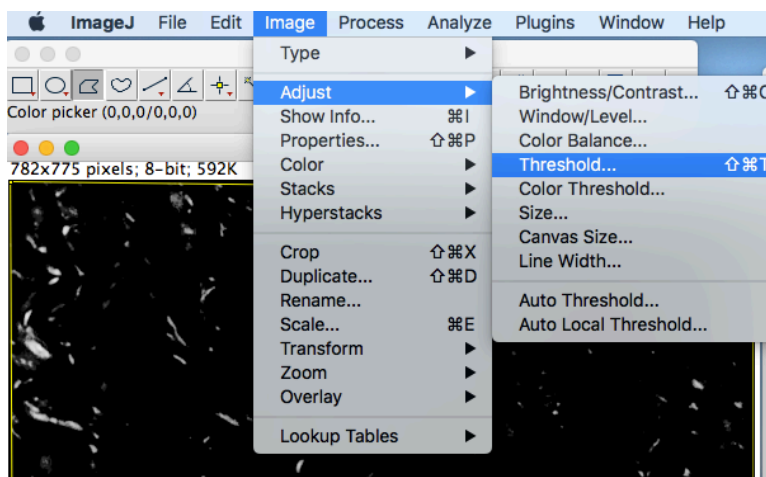
Recortar a janela com a imagem delimitada para conferência. Para tal, utilize uma ferramenta para recortar a imagem. No Mac, pode-se usar o comando “*Command+Shift+4*” e como mouse recortar a imagem. Abra a imagem recortada, coloque paralela à figura que será analisada para comparar se a área selecionada condiz com o que aparece na figura destinada a tal comparação.



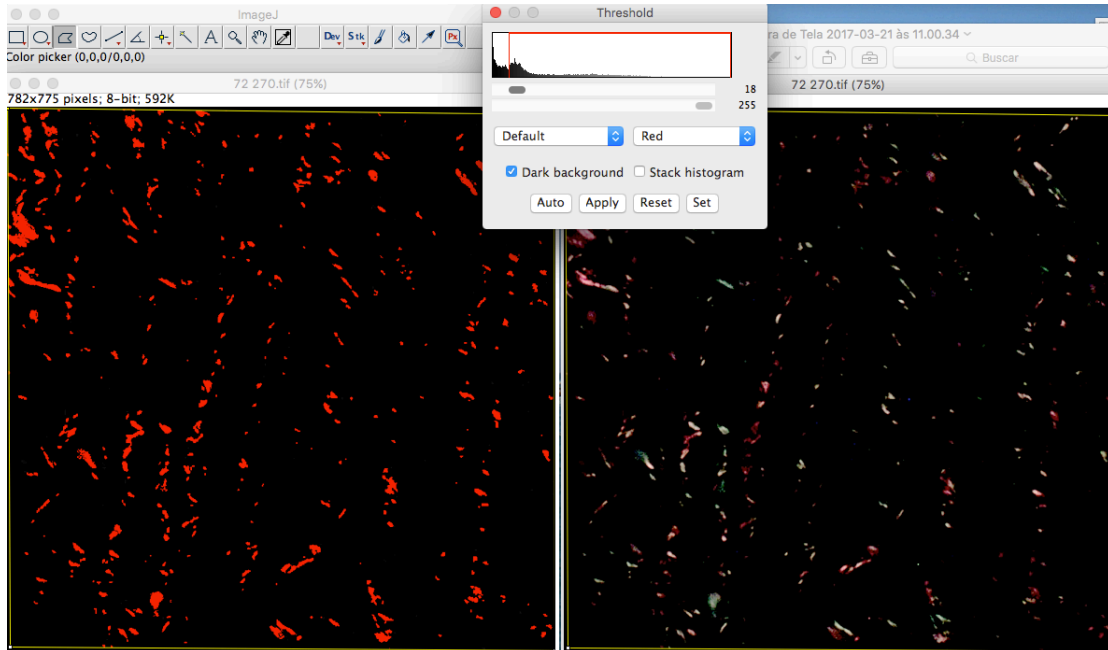
Agora é necessário transformar a imagem em escalas de cinza, para isso clicar em *Image Type* – 8 bits;



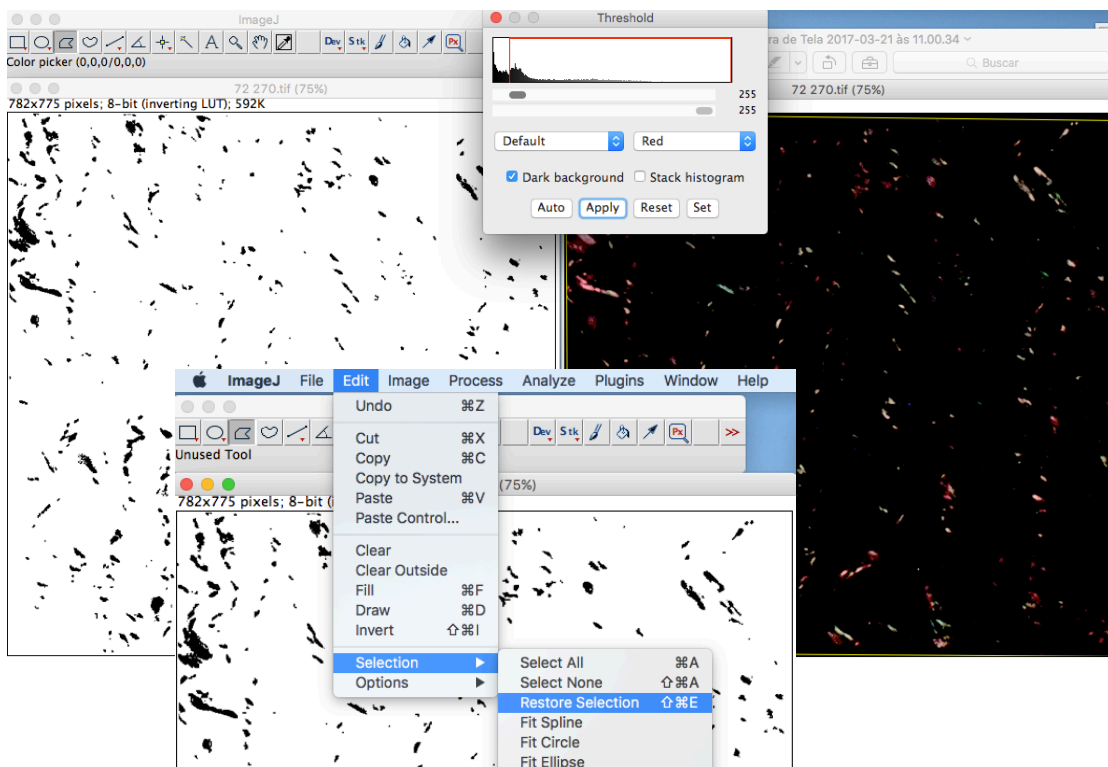
Com a imagem selecionada, deve-se fazer uma segmentação pelo método de limiarização. Clicar em *Image Threshold* – ajustar o que está selecionado, comparando com a imagem recortada; clicar em *Apply*;



A janela que se abre, mostra o histograma de tons de cinza da imagem aberta. Quando selecionado “default” (algoritmo global *histogram threshold*) mostrará em vermelho os objetos de interesse, caso o resultado não seja satisfatório pode-se alterar a amplitude nas duas barras de rolagem e aplicar (*Apply*), como mencionado acima.



Após a aplicação do limiar obteremos uma imagem binarizada (preta e branco). Com nosso objeto de interesse em preto e o fundo em branco. Quando aplicado a limiarização a seleção (quadrado de padronização) é perdida. É necessário que ela retorne para a correta análise da porcentagem da área ocupada. Assim, clicar em *Edit – Slection – Restore selection*;

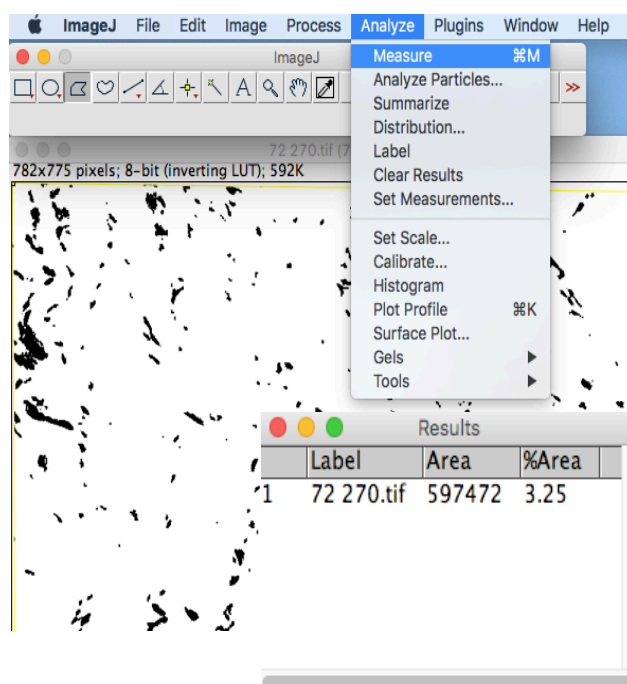


Para se obter o valor da área ocupada pelo colágeno, selecionado pelos passos acima, clicar em *Análise – Measurement*;

Observe a janela “Results”, nela consta a área selecionada (demarcada) e a porcentagem (%) de objeto em preto (colágeno) que há na área selecionada.

Clicar na janela que abriu com os valores da área, clicar em *File – Save*. Os valores serão salvos na pasta que for indicada, em planilha do Excel.

Caso deseje, salve a figura em preto e branco para posterior conferências.



ANEXO A - CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA).



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética no Uso de Animais
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8025 / 3351.9679
Fax: (016) 3351.8025
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
ceua@ufscar.br - www.propq.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais nº 004/2013

Protocolo nº. 004/13

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar **APROVOU** o projeto de pesquisa intitulado *"Efeito do treinamento físico e da restrição calórica na composição corporal, na via de sinalização da insulina e na remodelação óssea de ratas ovariectomizadas"* submetido pela pesquisadora *Daiana Vianna Amianti*.

São Carlos, 21 de fevereiro de 2013.

Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

ANEXO B - SOLUÇÕES PARA COLORAÇÃO DE TRICROMIO DE MASSON

Solução de Bouin

Ácido Pírico (saturado) ----- 75 mL
 Formaldeído (37-40%) ----- 25 mL
 Ácido Acético Glacial ----- 05 mL

Hematoxilina férrica de Weigert

Solução estoque A:

Hematoxilina ----- 1 g 95%
 Álcool ----- 100 mL

Solução estoque B:

29% Ferric chloride in water ----- 4 mL
 Água destilada ----- 95
 ml
 Ácido hidrocloreídrico, concentrado -- 1mL

Solução de Hematoxilina férrica de Weigert

Misturar parte iguais das soluções estoque A e B. Esta solução é estável por três meses. Não usa-la após esse período.

Solução Ácida de Biebrich Scarlet-Acid

Fuchsin:

Biebrich scarlet, 1% aquosa ----- 90 mL
 Ácido fuchsin, 1% aquosa -----10 mL
 Ácido Acético Glacial ----- 1 mL

Solução Ácido fosfomolibdenico-fosfotungstenico:

5% Ácido fosfomolibdenico ----- 25 mL
 5% Ácido fosfotungstenico ----- 25 mL

Solução Azul de Anilina:

Azul de Anilina ----- 2.5 g
 Ácido Acético Glacial ----- 2 mL
 Água destilada ----- 100 mL

Solução 1% Ácido Acético:

Ácido Acético Glacial ----- 1 mL
 Água destilada ----- 99 mL

ANEXO C – SOLUÇÕES PARA COLORAÇÃO DE PRICOSÍRIUS-RED

Sirius red F3B (C.I. 35782) ----- 0.5 g

Solução aquosa saturada de ácido pícrico -----500 mL

Sirius red pode ser adquirido pela empresa Sigma-Aldrich, sob o nome de "Direct Red 80", Catálogo # 36-554-8.

