



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

**ANDRÉA SANCHES**

**INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO SOBRE OS  
PREJUÍZOS METABÓLICOS E CARDÍACOS INDUZIDOS PELO  
ESTRESSE CRÔNICO EM RATOS**

**PIRACICABA**

**2016**

**ANDRÉA SANCHES**

**INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO SOBRE OS  
PREJUÍZOS METABÓLICOS E CARDÍACOS INDUZIDOS PELO  
ESTRESSE CRÔNICO EM RATOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Odontologia, Área de Concentração em Fisiologia Oral.

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana de Sousa da Cunha

Coorientadora: Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL  
DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA ANDRÉA  
SANCHES E ORIENTADA PELA PROFA. DRA.  
TATIANA DE SOUSA DA CUNHA E COORIENTADA  
PELA PROFA. DRA. FERNANDA KLEIN MARCONDES

PIRACICABA

2016

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** CNPq, 140926/2012-7

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
Marilene Girello - CRB 8/6159

Sa55i Sanches, Andréa, 1983-  
Influência do treinamento físico aeróbio sobre os prejuízos metabólicos e cardíacos induzidos pelo estresse crônico em ratos / Andréa Sanches. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Tatiana de Sousa da Cunha.  
Coorientador: Fernanda Klein Marcondes.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Estresse psicológico. 2. Terapia por exercício. 3. Catecolaminas. 4. Sistema renina-angiotensina. 5. Estresse oxidativo. I. Cunha, Tatiana de Sousa da. II. Marcondes, Fernanda Klein, 1970-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Influence of aerobic exercise training on metabolic and cardiac injury induced by chronic stress in rats

**Palavras-chave em inglês:**

Stress, Psychological

Exercise therapy

Catecholamines

Renin-angiotensin system

Oxidative stress

**Área de concentração:** Fisiologia Oral

**Titulação:** Doutora em Odontologia

**Banca examinadora:**

Tatiana de Sousa da Cunha [Orientador]

Juliana Dinéia Perez Brandão

Ana Paula Tanno

Karina Cogo Müller

Ana Cláudia Rossi

**Data de defesa:** 26-02-2016

**Programa de Pós-Graduação:** Odontologia



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**Faculdade de Odontologia de Piracicaba**



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 26 de Fevereiro de 2016, considerou a candidata ANDRÉA SANCHES aprovada.

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. TATIANA DE SOUSA DA CUNHA

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. JULIANA DINÉIA PEREZ BRANDÃO

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. ANA PAULA TANNO

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. KARINA COGO MÜLLER

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. ANA CLÁUDIA ROSSI

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

## DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, **Angelo** e **Lurdes** e minha irmãs, **Aline** e **Luana**

Ao meu companheiro **Renato** por toda cumplicidade, sinceridade, amizade,  
carinho, respeito e paciência.

## AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento à minha orientadora **Profa. Dra. Tatiana de Sousa da Cunha**, pela dedicação a esse trabalho, ensinamentos, confiança e respeito.

Meu agradecimento à minha coorientadora **Profa. Fernanda Klein Marcondes**, pelos ensinamentos e pela dedicação a esse trabalho.

As minhas irmãs **Aline** e **Luana** pelo amor e carinho.

Às colegas de trabalho do Laboratório de Estresse e acima de tudo grandes amigas **Rafaela** e **Patricia**, pela cumplicidade, amizade, paciência, compreensão e por estarem comigo desde o começo desta jornada.

Às alunas de Iniciação Científica do Laboratório de Estresse **Maria Fernanda**, **Maeline** e **Talita** pela ajuda e companheirismo.

Aos amigos da Fisiologia **Cristina**, **Gizele**, **Henrique**, **Lívia**, **Fabiana**, **Luiz**, **Monaliza**, **Nádia**, **Ricardo** e **Augusto**, pela amizade e pelos bons momentos de descontração.

Às Professoras **Dra. Juliana Trindade Clemente Napimoga**, **Dra. Juliana Almada Colucci Barros** e **Dra. Patricia Oliveira de Lima** pelo aceite e colaborações como componentes da banca de qualificação desse trabalho.

Aos Professores **Dra. Juliana Dinéia Perez Brandão**, **Dra. Ana Paula Tanno**, **Dra. Karina Cogo Muller**, **Dra. Ana Cláudia Rossi**, **Dra. Danielle Yuri Arita**, **Dr. Vander José das Neves**, **Dra. Nádia Cristina Favaro Moreira** pelo aceite e colaborações como componentes da banca de defesa desse trabalho.

À professora **Dra. Juliana Trindade Clemente Napimoga**, por toda ajuda e incentivo, tanto pessoal quanto profissional.

À professora **Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite**, pela disposição e ajuda.

À professora **Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury**, por ser sempre receptiva e colaborativa.

À professora **Dra. Dulce Elena Casarini**, coordenadora do Laboratório de Rim e Hormônios e seus colaboradores e/ou alunos **Roseli**, **Juliana Perez**, **Amanda**, **Lília**, **Ralmony**,

**Kleiton, Daniella Aragão, Daniele Arita, Marie, Fernanda, Larissa e Juliana Colucci** por me receberem tão bem em seus laboratórios e colaborarem muito para a realização desse trabalho.

Ao professor **Dr. Everardo** do Instituto de Biologia da UNICAMP e seus colaboradores, **Dr. Cláudio Zoppi** e **Dra. Emerielle**, pela ajuda e colaboração para a realização da dosagem insulínica.

À **Isabel** e **Lília** (UNIFESP – São José dos Campos) e **Joyce** (UFOP), pela grande ajuda na preparação de amostras para algumas dosagens, bem como no auxílio direto e indireto da operação “Força Tarefa - Andrea”.

Aos técnicos **Carlos Alberto Feliciano** e **Waldomiro** pelo suporte técnico no laboratório da Fisiologia e Bioquímica, respectivamente.

Às secretárias **Eliete** e **Elisa** e **Ana Paula**, sempre prestativas e atenciosas.

À **Universidade Estadual de Campinas** pelas condições oferecidas para realização deste trabalho.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela concessão de 4 anos de Bolsa de Doutorado e apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

À **Fundação de Desenvolvimento da Unicamp – FUNCAMP** e **Fundo de Apoio ao ensino, à pesquisa, e à extensão – FAEPEX** aos auxílios concedidos.

## EPÍGRAFE

“Não há lugar para a sabedoria onde não há paciência”

Santo Agostinho

## RESUMO

O estresse crônico é um fator de risco para o desenvolvimento de hipertensão, aterosclerose e diabetes, e já demonstramos que o protocolo experimental de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI) é capaz de induzir resistência à insulina, dislipidemia, diminuição na produção de óxido nítrico, aumento da atividade do sistema renina-angiotensina e disfunção endotelial em ratos. Por outro lado, é vasta a literatura demonstrando que a prática regular de exercício físico é uma ferramenta não farmacológica eficaz para o tratamento das disfunções induzidas pelo estresse, incluindo os prejuízos cardiovasculares e metabólicos. Dentre os modelos de treinamento mais utilizados em pesquisas experimentais, estão a natação e a esteira rolante. Uma das vantagens do uso da esteira rolante refere-se à facilidade no ajuste da intensidade do exercício. Além disto, o exercício em esteira pode promover menor ativação de biomarcadores do estresse, quando comparado à natação. Apesar destas vantagens, sabe-se que nesta condição os animais são submetidos ao treinamento de forma “forçada” e ainda não está claro qual o impacto deste estímulo sobre o sistema cardiovascular e sobre o metabolismo, principalmente em animais estressados cronicamente. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o papel do treinamento físico de intensidade moderada, em esteira rolante, sobre os prejuízos hormonais, metabólicos e cardiovasculares desencadeados pelo ECMI. Foram utilizados 40 ratos machos Sprague-Dawley, divididos em 4 grupos experimentais: Controle, Estresse, Exercício e Exercício + Estresse. Os animais do grupo Exercício foram submetidos a 8 semanas de treinamento físico em esteira ergométrica adaptada (intensidade moderada, 50-70% do teste de esforço), 5x / semana, 1 hora por dia. Na 4<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semanas, os animais foram também submetidos ao protocolo de ECMI, ao longo de 7 dias, repetindo-se os procedimentos por 3 semanas consecutivas. Durante a 7<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas, os animais foram submetidos apenas ao treinamento físico; portanto duas semanas após a aplicação do último estímulo estressor os animais foram mortos por decapitação para coleta de sangue e do ventrículo esquerdo, e as amostras foram armazenadas para posteriores dosagens. Os resultados foram analisados pela Análise de Variância bifatorial, seguidos do Teste de Tukey. A aptidão física dos animais submetidos ao ECMI foi menor do que a dos animais controle, e o treinamento físico não foi capaz de atenuar este prejuízo. O exercício físico preveniu o desenvolvimento de alterações metabólicas induzidas pelo ECMI, reduzindo a hiperinsulinemia, o índice de resistência à insulina e a dislipidemia. Além disto, também foi capaz de reduzir a concentração cardíaca de serotonina e a atividade circulante da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), aumentadas em resposta ao ECMI. Entretanto, o treinamento físico não foi capaz de reduzir a concentração circulante de noradrenalina,

dopamina, serotonina, e o estresse oxidativo, que mantiveram-se elevados nos grupos submetidos ao ECMI. Assim, os resultados do presente estudo sugerem que o exercício físico melhora os prejuízos metabólicos desencadeados pelo ECMI, bem como a modulação sobre o sistema serotoninérgico cardíaco. Entretanto, pela primeira vez os resultados do presente estudo mostram que alguns dos efeitos maléficos induzidos pelo ECMI não são atenuados em resposta ao treinamento, e podem inclusive ser potencializados por este.

Palavras-chave: Estresse Psicológico; Terapia por Exercício; Catecolaminas; Sistema Renina-Angiotensina, Estresse Oxidativo.

## ABSTRACT

Chronic stress is a risk factor for the development of hypertension, atherosclerosis and diabetes. The protocol of chronic mild and unpredictable stress (CMS) is an animal model of chronic stress. Previously, it has been shown that CMS induced insulin resistance, dyslipidemia, oxidative stress, and increase in renin angiotensin system and endothelial dysfunction in rats. On the other hand, the literature is in a vast demonstrating that regular physical exercise is an effective non-pharmacological tool for the treatment of disorders induced by stress, including cardiovascular and metabolic damage. Among the training models most used in experimental research, there are swimming and treadmill. One of the advantages of using treadmill refers to the ease of adjusting the intensity of the exercise. In addition, the treadmill exercise can promote lower activation of stress biomarkers when compared to swimming. Despite these advantages, it is known that in this condition the animals are undergoing to "forced" training and it is not yet clear the impact of this stimulus on the cardiovascular system and metabolism, especially in chronically stressed animals. Thus, the aim of this study was to evaluate the role of physical training of moderate intensity on a treadmill, on the hormonal, metabolic and cardiovascular damage triggered by CMS. Forty male Sprague-Dawley rats were randomized in 4 experimental groups: Control, Stress, Exercise, Exercise + Stress, submitted to CMS protocol or to 8-week treadmill training (50-70% of the maximal exercise test). In the 4<sup>th</sup>, 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> wk, the animals were submitted to CMS protocol over seven days, repeating the procedures for 3 consecutive weeks. During the 7<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> wk, the animals were subjected only to physical training; Two weeks after application of the last stressor stimulus, the animals were killed by decapitation and blood and left ventricle were collected. The samples were stored for future analyzes. The results were analyzed by two-way analysis of variance followed by Tukey test. Physical performance of the animals submitted to the CMS was lower than that of the control animals, and physical training has not been able to alleviate this loss. The exercise prevented the development of metabolic changes induced by CMS, reducing the hyperinsulinemia, insulin resistance index and dyslipidemia. In addition, it was also capable of reducing the cardiac concentration of serotonin and systemic activity of the Angiotensin Converting Enzyme (ACE) increased in response to CMS. However, physical training was not able to reduce the circulating concentration of noradrenaline, dopamine, serotonin, and oxidative stress, which remained high in the groups submitted to the CMS. Thus, the results of this study suggest that exercise improves metabolic losses triggered by CMS and modulation on cardiac serotonergic system. However, for the first time the results of this study show that some of the harmful effects

induced by CMS are not attenuated in response to training, which may even be enhanced by this.

Key words: Stress, Psychological; Exercise Therapy; Catecholamines; Renin-Angiotensin System, Oxidative Stress.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BDNF – (*Brain-derived neurotrophic factor*) Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
- ECA – Enzima Conversora de Angiotensina
- ECA2 – Enzima Conversora de Angiotensina 2
- ECMI – Estresse Crônico Moderado e Imprevisível
- EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido Etilenodiamino Tetra-Acético)
- HADS – (*Hospital Anxiety and Depression Scale*) Escala Hospitalar de Ansiedade e Depressão
- HDL colesterol – (*high density lipoprotein*) Lipoproteína de alta intensidade
- HPA eixo – Hipotálamo Pituitária Adrenal
- HPLC – (*High performance liquid chromatography*) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- HOMA – (*Homeostasis Model Assessment*) Índice de resistência à insulina
- IL-1- Interleucina -1
- IL-6 – Interleucina - 6
- LDL colesterol – (*low density lipoprotein*) Lipoproteína de baixa intensidade
- RNAm – (*Ribonucleic Acid*) Ácido ribonucléico
- SRA – Sistema Renina-Angiotensina
- TNF alfa – (*Tumor Factor Necrosis*) Fator de Necrose Tumoral alfa
- VE - Ventrículo Esquerdo
- VLDL colesterol – (*very low density lipoprotein*) Lipoproteína de muito baixa intensidade

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
3. PROPOSIÇÃO.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
5. RESULTADOS.....	36
6. DISCUSSÃO.....	54
7. CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS .....	65
ANEXO 1 (Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa).....	86

## 1 INTRODUÇÃO

O estresse mental é um grande problema de saúde da sociedade moderna, mas também muito importante para a sobrevivência humana em situações de perigo iminente, responsável por propiciar adaptações cardiometabólicas facilitadoras da resposta de “luta ou fuga”. Essas respostas consistem em diversas alterações homeostáticas do organismo como o aumento da frequência cardíaca e o redirecionamento de substratos energéticos. No entanto, a cronificação deste processo devido à falha e/ou ausência de mecanismos adaptativos, causa uma série de respostas deletérias que podem comprometer o estado de saúde física e mental do indivíduo (Ursin e Eriksen, 2004; Nicolaidis et al., 2014).

As complicações desencadeadas pelo estresse crônico afetam grande parte da população e, segundo a *American Heart Association*, os custos envolvidos com o tratamento de doenças cardiovasculares e acidentes vasculares encefálicos foram de aproximadamente \$316,6 bilhões de dólares entre os anos de 2011 e 2012 (Mozaffarian et al., 2016). Além disso, os custos envolvidos no tratamento de doenças crônicas, como as cardiovasculares (agravadas por fatores de risco como o diabetes e a obesidade), deverão saltar de \$273 para \$818 bilhões de dólares de 2010 até 2030 (Heidenreich, 2011; Mozaffarian et al., 2016).

Nosso grupo de pesquisa já demonstrou em estudos experimentais, alguns dos efeitos crônicos do estresse, como a piora da função vascular e favorecimento da atuação de mecanismos pró-ateroscleróticos de ratos estressados pelo protocolo de ECMI (Estresse Crônico Moderado e Imprevisível) (Neves et al., 2009, 2012). Além disso, o tratamento de ratos estressados com losartan, um antagonista de receptor AT1 de angiotensina II, atenuou a diminuição do relaxamento de anéis aórticos observados pela curva de concentração efeito à acetilcolina e o aumento da pressão arterial observados em ratos estressados, indicando a participação do sistema renina-angiotensina (SRA) como um dos mediadores destas alterações (Sanches, 2012). Considerando os efeitos negativos do estresse, torna-se importante a busca por métodos alternativos como o exercício físico para evitá-lo e/ou controlá-lo.

O exercício físico é reconhecido por atenuar alguns dos efeitos do estresse, promovendo a melhora da concentração e da resistência à insulina, da dislipidemia, do balanço oxidante/antioxidante e do controle da pressão arterial, da sensação de bem-estar geral e melhora de sintomas depressivos (Liu et al., 2015; Marques-Aleixo et al., 2015). No entanto, quando sua execução é forçada, como ocorre em alguns modelos experimentais de ratos em esteira, tende a desencadear adaptações que propiciam respostas positivas, mas também negativas sobre os mecanismos de controle cardiovascular, metabólico e mental (Moraska et

al., 2000). Talvez esta dicotomia de respostas adaptativas seja o principal fator para a falta de consenso na literatura sobre quando, como e quanto a aplicação do exercício físico deve ser prescrita e realizada, embora se saiba que o exercício regular moderado é capaz de promover diversas alterações benéficas ao organismo (Liu et al., 2015; Okame et al., 2015; Shen et al., 2015).

Assim, considerando os efeitos deletérios do estresse crônico, bem como a falta de consenso sobre a modalidade de exercício ideal para promover os supostos efeitos benéficos sobre parâmetros cardiovasculares e metabólicos, estresse oxidativo e SRA, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do exercício físico aeróbio moderado sobre os prejuízos metabólicos e cardiovasculares desencadeados pelo estresse crônico em ratos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O estresse mental e suas alterações homeostáticas

O estresse mental é um dos mais significativos problemas de saúde na sociedade moderna (Kudielka e Wust, 2010) e pode ser definido como qualquer mudança na homeostase, que requer uma resposta adaptativa (Ursin e Eriksen, 2004). Em um organismo saudável, além da ativação estressora de curta duração não ser capaz de promover efeitos maléficos, tende a ativar mecanismos protetores fundamentais para a sobrevivência na presença de situações de perigo iminente (Loures et al., 2002; Ursin e Eriksen, 2004; McEwen, 2006).

Por outro lado, a deficiência dos mecanismos adaptativos pode levar a respostas prejudiciais que geralmente se desenvolvem quando o estímulo estressor é mantido por muito tempo ou é intenso (Loures et al., 2002) ou, se o indivíduo apresenta susceptibilidade genética ou doenças de base, como a hipertensão (Krantz e Manuck, 1984). Com relação à associação entre estresse e doenças cardiovasculares, a ausência de consenso sobre o conceito estresse tem dificultado a determinação do verdadeiro papel que o mesmo exerce na epidemiologia das mesmas. No entanto, vários estudos demonstram a estreita relação entre estresse psicológico, envolvimento do sistema nervoso central, desequilíbrio metabólico, aumento do estresse oxidativo, elevação crônica da pressão arterial e desenvolvimento de complicações cardiovasculares, incluindo a formação de placas de ateroma (McEwen, 2006; Spasojevic et al., 2011; Daubert et al., 2012; Steptoe e Kivimaki, 2012; Ni et al., 2016) (Figura 1).

Devido às limitações inerentes à pesquisa envolvendo seres humanos, modelos animais têm sido muito úteis no estudo dos mecanismos fisiológicos subjacentes aos efeitos deletérios desencadeados pelo estresse. Apesar de estar bem estabelecido que roedores adaptam-se à aplicação repetida de estímulos estressores, esta adaptação não ocorre nos protocolos de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI). Nestes protocolos, a exposição a diferentes estressores, alternadamente, por aproximadamente 3 semanas consecutivas, induz elevação mantida dos níveis de corticosterona em ratos (Moreau et al., 1993; Willner, 2005) que pode ser observada até 15 dias após a aplicação do estímulo estressor (Neves et al., 2009).

Em estudo prévio, nosso grupo de pesquisa demonstrou que ratos submetidos ao protocolo de ECMI desenvolveram anedonia (Costa, 2010), dislipidemia e aumento na resposta vasoconstritora à fenilefrina, 15 dias após a interrupção da aplicação do estímulo estressor (Neves et al., 2009, 2012). Além disso, também demonstramos que a aplicação do protocolo de ECMI, induziu disfunção endotelial na aorta torácica de ratos, evidenciada pela diminuição da

produção de óxido nítrico, aumento da produção de ânion superóxido (Marcondes et al., 2011) e redução da resposta vasodilatadora à acetilcolina (Neves et al., 2012). Adicionalmente, estes efeitos foram acompanhados de desenvolvimento de resistência à insulina, evidenciado por aumento do índice HOMA (*Homeostasis Model Assessment*) (Sondergaard et al., 2006) e da área sob a curva no teste de tolerância à glicose, em ratos submetidos ao ECMI em relação ao grupo não estressado (Neves et al., 2012).

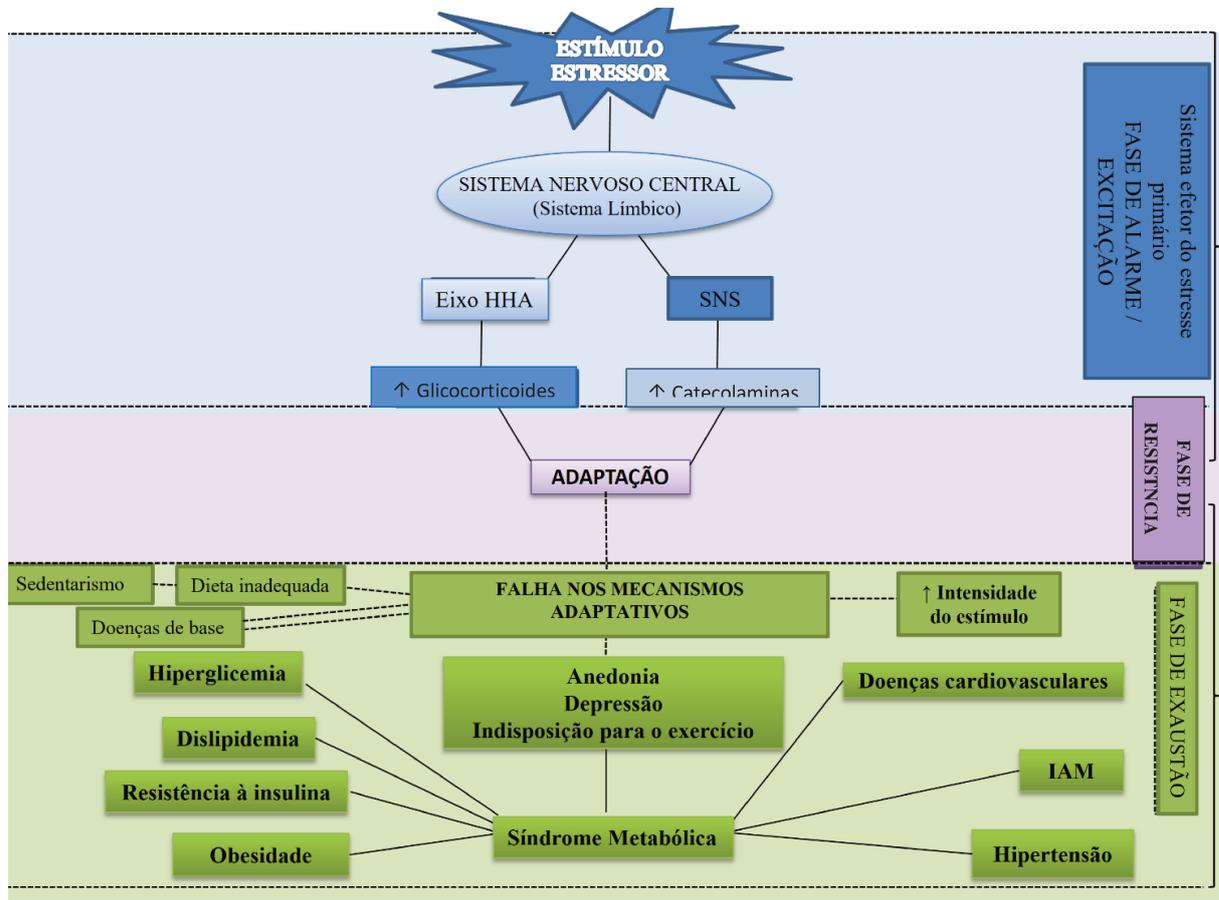
A fim de investigar os mecanismos fisiopatológicos relacionados à disfunção endotelial desencadeada pelo ECMI, demonstramos que parte das alterações metabólicas e cardiovasculares associadas ao estímulo estressor está relacionada ao aumento da atividade do SRA. Apesar do SRA ser um sistema fisiológico fundamental para a manutenção da homeostasia e regulação da pressão arterial, quando ativado de forma exacerbada, como, por exemplo, em resposta ao estresse crônico (Gradman, 2009; Grippo e Johnson, 2009), pode colaborar diretamente para o desenvolvimento de doenças sistêmicas como a hipertensão arterial (Santos et al., 2012). A hipertensão arterial normalmente resulta de anormalidades dos mecanismos de controle da pressão arterial (Irigoyen et al., 2003). Esta, poderá ser afetada devido à constante estimulação simpática induzida pelo estresse, a qual, além de facilitar o estresse oxidativo pela excessiva liberação de catecolaminas (Ni et al., 2016), resulta em maior atividade das fibras simpáticas que inervam as células justaglomerulares renais e ativação dos receptores adrenérgicos presentes nos rins (Phillips, 1987), levando ao aumento da liberação de renina (Harrison-Bernard, 2009), síntese de angiotensina II e aumento da pressão arterial (Loures et al., 2002).

Cabe ressaltar, que este é apenas um dos diversos indícios que apontam para a importante participação do SRA no desenvolvimento das alterações decorrentes do estresse crônico (Loures et al., 2002; Parati e Esler, 2012). Portanto, é de grande relevância estudar as vias deste complexo sistema, também associadas ao desenvolvimento de aterosclerose, dislipidemias, disfunção endotelial, síndrome metabólica, entre outras alterações cardiometabólicas induzidas pelo estresse crônico (Kishi et al., 2012; Marcondes et al., 2012).

Ao avaliarmos a participação do SRA em ratos submetidos ao protocolo de ECMI observamos que animais estressados apresentam aumento da atividade da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) sérica e tecidual (na aorta torácica), aumento da atividade da renina plasmática, bem como aumento nas concentrações de Angiotensina II e Angiotensina (1-7) (Marcondes, 2011; Casarini, 2012). Além disto, o tratamento de animais com o antagonista de receptor AT1 de Angiotensina II, losartan (50mg/Kg/dia, via oral) reverteu algumas das alterações malélicas desencadeadas pelo ECMI, como o aumento da área sob a curva (obtida

pelo teste de tolerância à glicose), a piora do relaxamento induzido pela acetilcolina, o aumento da pressão arterial sistólica, diastólica e média e da frequência cardíaca (Sanches, 2012).

Figura 1. Diferentes fases do Estresse e suas alterações cardiovasculares e metabólicas. Eixo HHA = Hipotálamo Hipófise Adrenal; SNS = Sistema Nervoso Simpático; IAM = Infarto Agudo do Miocárdio.



Fonte: Autoria própria.

## 2.2 O estresse mental, o exercício físico e as alterações psicológicas e cardiometabólicas

Considerando que o estresse é inerente à sociedade moderna, torna-se imprescindível a busca por melhora na qualidade de vida, seja pela adesão a um padrão alimentar de qualidade, menor consumo de cigarros e bebidas alcoólicas, melhora na qualidade do sono e controle do sedentarismo (McGrady, 2010; Holley, 2011). Nesse contexto, torna-se fundamental a prática de atividades ligadas ao lazer e à sensação de bem-estar, responsáveis principalmente por prevenirem e/ou atenuarem algumas consequências negativas relacionadas ao estresse e ao desenvolvimento de doenças crônicas (McGrady, 2010; Holley, 2011). De acordo com o *Medical Expenditure Panel Survey* (MEPS), no ano de 2007, foi estimado um

custo de \$177,5 bilhões com o tratamento de doenças cardíacas e suas complicações (Basu et al., 2011; Roger et al., 2011). Estima-se que entre 2010 e 2030 os valores relacionados a estes gastos possam triplicar (de \$273 bilhões para \$818 bilhões) e que o custo gerado por perda de produtividade devido estas doenças deverá saltar de \$172 bilhões para \$276 bilhões (Heidenreich, 2011; Mozaffarian et al., 2016).

Apesar dos dados serem alarmantes, as complicações decorrentes do estilo de vida inadequado da sociedade moderna podem ser minimizadas e por vezes controladas por medidas de caráter profilático ou curativo, sejam estas farmacológicas (Egami et al., 2010) ou não-farmacológicas (Hansen et al., 2010; Schnyer, 2011). Neste sentido, o exercício físico (Rabin, 2007) ocupa posição de destaque, sendo reconhecido como um fator chave para a manutenção da saúde (Martinez de Morentin e Lopez 2010) podendo os benefícios serem obtidos por meio do exercício aeróbio (Monteiro e Azevedo, 2010), exercício resistido ou combinado (Fett et al., 2009).

A atividade física pode reduzir a percepção de estresse, sendo este um mecanismo importante associado positivamente a uma melhor saúde física (Salmon et al., 2001). Foi observado que quanto maior o nível de estresse do indivíduo, maiores são os benefícios do exercício para a saúde, quando comparados aos indivíduos pouco estressados (Carmack et al., 1999). Além disso, indivíduos idosos e fisicamente treinados têm demonstrado diminuir a reatividade ao eixo HPA em resposta ao estresse psicológico, quando comparados a indivíduos não treinados, demonstrando que a atividade física pode atenuar a liberação de cortisol em resposta ao estresse (Traustadóttir et al., 2005).

Em virtude dos resultados relacionados à sensação de bem-estar e melhora da saúde mental promovidos pelo exercício físico, esta prática também é recomendada como terapia complementar no tratamento de indivíduos que sofrem de depressão. Ao avaliarem alguns estudos epidemiológicos, Hamer et al. (2011) demonstraram que indivíduos fisicamente ativos reduziram em 22% o risco de desenvolverem sintomas depressivos. Neste caso, acredita-se que os mecanismos responsáveis estejam relacionados tanto a aspectos psicológicos, que incluem a distração, melhora do humor e da autoestima e interação social, como também ao aumento na liberação de monoaminas e estimulação da transmissão sináptica, e de endorfinas, promovendo efeitos inibitórios do sistema nervoso central (Peluso e Andrade, 2005). Além disso, é importante ressaltar que pacientes com sintomas depressivos e inativos fisicamente apresentam aumento do risco de mortalidade cardiovascular (Kamphuis et al., 2007), enquanto que o exercício pode inibir a ocorrência de depressão e de sintomas depressivos, melhorar a saúde mental e aumentar a sobrevivência em pacientes que sofreram infarto agudo do miocárdio

(Blumenthal et al., 2004). Em relação ao hipocampo, um estudo clínico observou aumento do volume hipocampal em pacientes depressivos que praticam atividade física quando comparados aos pacientes depressivos sedentários (Head et al., 2012).

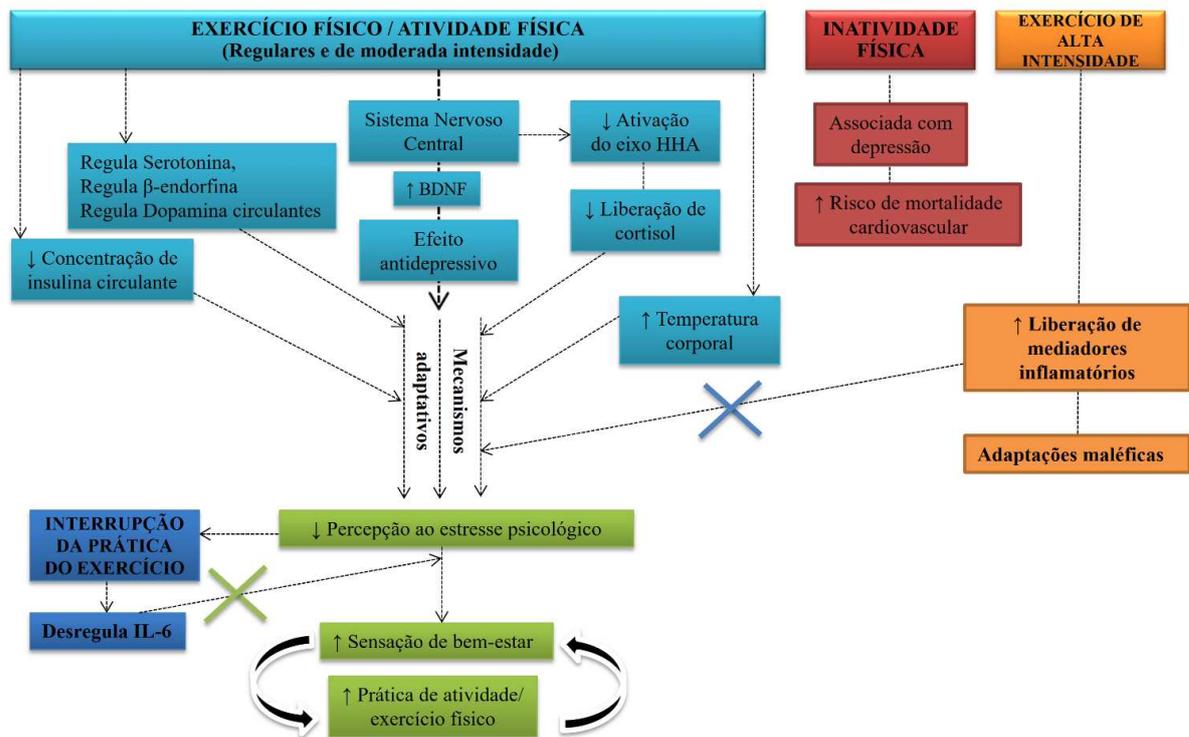
De fato, Sanches et al (2008) observaram que o exercício físico aeróbio de intensidade moderada, praticado de forma lúdica, por pacientes portadores do diabetes tipo II (3x/semana, durante três meses consecutivos) reduziu a pressão arterial sistólica e diastólica, o índice de massa corpórea, a glicemia e o LDL-colesterol (lipoproteína de baixa intensidade), além de reduzir a concentração salivar de cortisol e o nível de ansiedade e depressão, avaliados pelo HADS (Escala Hospitalar de Ansiedade e Depressão).

Em modelos animais, também tem sido demonstrado que o exercício induz respostas antidepressivas (Greenwood et al., 2003). Em ratos, o exercício aeróbio voluntário em roda de correr diminuiu a anedonia (principal sintoma da depressão) sugerindo que o treinamento pode induzir alterações biológicas semelhantes às alterações causadas por drogas antidepressivas (Greenwood et al., 2003). No sistema nervoso central, o exercício pode aumentar a circulação do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Figura 2), o qual é conhecido por melhorar a saúde e a sobrevivência das células nervosas, sugerindo que o exercício pode influenciar a saúde cerebral (Yarrow et al., 2010). O exercício também pode equilibrar as concentrações cerebrais de monoaminas durante o período de estresse (He et al., 2012). He et al. (2012) demonstraram que o exercício por natação preveniu e reverteu a diminuição dos níveis hipocampais de serotonina e noradrenalina induzida pelo estresse crônico e promoveu aumento nos níveis de dopamina no hipocampo quando a atividade física por natação foi realizada antes de iniciar o período de estresse (He et al., 2012). Além disso, o exercício pode desempenhar um importante papel protegendo o hipocampo de danos causados pela exposição aos glicocorticoides secretados em situações estressoras (Sigwalt et al., 2011), uma vez que foi demonstrado que a atividade física foi capaz de estimular a proliferação de células do hipocampo (Ehninger et al., 2003), promover alterações na plasticidade sináptica, estimular a neurogênese e a sinaptogênese (Castrén et al., 2005).

Ao evidenciar as alterações cardíacas e metabólicas proporcionadas pelo exercício, cabe ressaltar que os estudos experimentais (com ratos ou camundongos) que abordam os efeitos profiláticos do exercício sobre o desenvolvimento de complicações cardiovasculares ainda são escassos; entretanto já foi demonstrado em um modelo de diabetes por estreptozotocina, que apenas 4 semanas de treinamento físico aeróbio, aplicado previamente ao desenvolvimento da doença, atenuam significativamente os efeitos deletérios do diabetes sobre os sistemas renal e cardiovascular (Silva, 2011). Além disso, sabe-se que a prática regular de

exercício físico é responsável por reduzir a ansiedade, a concentração sanguínea de insulina (Schnohr et al., 2005; Filho et al., 2008), auxiliar na regulação de componentes do SRA (Zucker et al., 2009), diminuir a expressão de receptores AT1 (diminuindo a formação de espécies reativas de oxigênio na doença arterial coronária) (Adams, et al., 2005), aumentar e/ou controlar a secreção de noradrenalina, dopamina (Gavrilovic et al., 2013), serotonina e  $\beta$ -endorfina (Struder e Weicker, 2001; Schnohr et al., 2005; Cunha et al., 2008), além de modular a atividade da glândula adrenal (Gavrilovic et al., 2013) reduzindo a atividade do eixo HPA em resposta ao estresse repetido (Nyhuis et al., 2010) (Figura 2).

**Figura 2.** Relação entre a prática de exercício e/ou atividade física de moderada e alta intensidade e o efeito do destreinamento físico e/ou da interrupção do exercício sobre parâmetros fisiológicos. Eixo HHA = Hipotálamo Hipófise Adrenal; IL-6 = Interleucina-6; BDNF = Fator Neurotrófico derivado do cérebro.



Fonte: Autoria própria.

Com relação ao SRA, embora estudos que envolvam a participação deste sistema nos efeitos cardiovasculares induzidos pelo exercício físico ainda sejam escassos e por vezes, contraditórios (Barauna et al., 2008; Barreti et al., 2012), estes, por sua vez, têm sido cada vez mais evidenciados (Barauna et al., 2008; Alves et al., 2009). Nesse contexto, já foi mostrado que o exercício físico aeróbio é capaz de reduzir a expressão do RNAm de angiotensinogênio

em áreas cerebrais de controle cardiovascular, favorecendo o controle da pressão arterial (Félix e Michelini, 2007), bem como pode aumentar os níveis de Angiotensina (1-7) e o RNAm e expressão proteica de receptores *Mas* no ventrículo esquerdo de ratos espontaneamente hipertensos (Filho et al., 2008). Além disso, também pode normalizar a atividade do SRA em animais com infarto agudo do miocárdio e em pacientes com insuficiência cardíaca. Adicionalmente, é sugerido que, em resposta ao exercício, a modulação da atividade do SRA (em casos de insuficiência cardíaca) e da atividade nervosa simpática (em ratos espontaneamente hipertensos) estão envolvidas na redução da resistência vascular sistêmica e da pressão arterial observada em indivíduos pré-hipertensos (Liu et al., 1997; Braith et al., 1999; Fagard e Cornelissen, 2005; Wan et al., 2007; Bertagnolli et al., 2008; Negrão e Middlekauff, 2008; Pereira et al., 2009).

Também tem sido sugerido, em estudos clínicos (Diet et al., 2001) e experimentais (Fernandes et al., 2011; Oliveira et al., 2009), que o SRA local exerce importante influência sobre os mecanismos regulatórios durante o processo de hipertrofia ventricular esquerda (HVE) fisiológica. Além disto, já foi demonstrado que a HVE patológica pode ser minimizada pelo treinamento físico aeróbio e envolve mecanismos relacionados à diminuição da resistência vascular e aumento do fluxo sanguíneo cardíaco, atribuídos à redução da concentração sistêmica e local da ECA e da Angiotensina II, bem como aumento do efeito vasodilatador de Angiotensina (1-7) e da atividade da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) (Li et al., 1997; Carvalho et al., 2007).

As alterações vasodiladoras em tecido cardíaco, também podem ocorrer devido à melhora da biodisponibilidade do óxido nítrico em resposta ao exercício físico. Sabe-se que o aumento da atividade simpática pode favorecer a produção de espécies reativas de oxigênio, as quais atuam como uma importante via intracelular durante o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca (Neri et al., 2007). Por outro lado, a inibição destas espécies pode atenuar tanto a hipertrofia cardíaca de ratos wistar (Neri et al., 2007) quanto a cardiomiopatia observada em camundongos diabéticos (Ni et al., 2016). Adicionalmente, o exercício físico é capaz de atenuar a ativação simpática e melhorar o estresse oxidativo (Li et al., 2015). Dessa forma, o exercício físico pode reduzir a atividade simpática e, conseqüentemente, o estresse oxidativo além de alguns danos desencadeados por determinadas doenças de origem cardiovascular ou metabólica (Bertagnolli et al., 2008; Li et al., 2015).

Em nosso laboratório, Cunha et al. (2007) observaram que os efeitos deletérios do diabetes por estreptozotocina, e da hipertensão arterial em ratos espontaneamente hipertensos foram atenuados pelo treinamento físico aeróbio de intensidade moderada. Os animais

hipertensos-diabéticos treinados apresentaram melhora significativa nos parâmetros metabólicos e hemodinâmicos, redução da glicemia, além de atenuação na progressão das alterações morfológicas e funcionais do músculo cardíaco, aumentando significativamente seu índice de sobrevivência (Cunha, 2007). Entretanto, não se sabe, até o momento, qual o papel do exercício físico aeróbico moderado nas alterações cardiovasculares e metabólicas induzidas pelo ECMI sobre o balanço oxidante/antioxidante, bem como, sobre os componentes do SRA.

### **2.3 O estresse mental e o exercício físico forçado**

Sabe-se que a atividade física pode promover benefícios físicos e psicológicos que estão envolvidos tanto na ação indireta desta atividade em reduzir o estresse mental, quanto em sua ação direta sobre as funções metabólicas proporcionadas ao organismo, como por exemplo, os rápidos efeitos tranquilizantes desencadeados pelo aumento de temperatura corporal (Schnohr et al., 2005; Marcondes et al., 2012). Adicionalmente, a prática regular de exercício pode favorecer diversos mecanismos modulatórios sobre o sistema nervoso central, sistema cardiovascular e metabólico (Marcondes et al., 2012).

As diferenças conceituais entre a atividade e o exercício físico ocorrem principalmente pelo fato de a atividade poder ser qualquer atividade física que promova gasto calórico, enquanto o exercício, é uma atividade física programada, com modalidade, intensidade, tempo, séries e repetições pré-estabelecidos (Caspersen et al., 1985). À luz desse conceito, o exercício físico pode ser dividido em exercício aeróbico/anaeróbico ou resistido. Durante sua aplicação, ele pode ser dividido em exercício voluntário (quando sua realização é espontânea/voluntária) como em rodas de correr ou forçado (quando sua realização é obrigatória), principalmente no que diz respeito aos modelos experimentais de ratos em esteira (Moraska et al., 2000; Okame et al., 2015).

Embora sejam diversos os estudos que mencionam os efeitos benéficos do exercício, como já relatado no subcapítulo anterior do presente estudo, é importante ressaltar que o treino de alta intensidade pode aumentar o estresse oxidativo e promover exacerbação da resposta imune (Suchánek et al., 2010). Adicionalmente, independente da intensidade de treino, a interrupção de sua prática tende a prejudicar o bom estado de humor, resposta que foi relacionada à diminuição da concentração de IL-6 (Poole et al., 2011), uma importante citocina que mobiliza substratos extracelulares durante o exercício (Petersen e Pedersen, 2005). Por outro lado, a alta intensidade da prática de exercício foi relacionada ao aumento da estimulação de linfócitos, leucócitos e liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6),

fatores que podem levar o organismo a adaptações malélicas (Suchánek et al., 2010), sugerindo a importância do equilíbrio entre os mediadores inflamatórios para com os efeitos benéficos do exercício regular de moderada intensidade (Suchánek et al., 2010; Poole et al., 2011) (Figura 2).

Por isso, em algumas situações, o exercício pode ser reconhecido como um estímulo estressor (Goldstein e Kopin, 2007), considerando que seus efeitos sobre o sistema imune são mediados por hormônios como o cortisol (em humanos) ou corticosterona (roedores), além de catecolaminas (Nicolaidis et al., 2015).

Em modelos experimentais, o exercício em esteira é escolhido e aplicado por diversos pesquisadores para se avaliar os efeitos fisiológicos do exercício aeróbio sobre parâmetros cardíacos e metabólicos (Bequet et al., 2001; Bertagnolli et al., 2008; Sertie et al., 2015). Porém, esta forma de exercício forçado pode vir a desencadear todos os mecanismos já mencionados anteriormente, ativados em resposta ao estresse mental. Portanto, o exercício em esteira pode desencadear estresse psicológico e físico, causando adaptações fisiológicas positivas (como por exemplo, a perda de peso corporal) e negativas (reforçando o aumento da liberação de hormônios do estresse), principalmente no que diz respeito à sua aplicação durante o estresse crônico. (Moraska et al., 2000). Assim, torna-se necessário a investigação sobre a prática de exercício físico de baixa à moderada intensidade, previamente, durante e após o estresse crônico.

### 3 PROPOSIÇÃO

Avaliar e caracterizar o papel do treinamento físico de intensidade moderada, em esteira rolante, sobre os prejuízos hormonais, metabólicos e cardiovasculares desencadeados pelo estresse crônico em ratos, por meio dos seguintes parâmetros:

- a. A regulação do peso corporal, a glicemia e a concentração plasmática de insulina, a área sob a curva e o Índice HOMA;
- b. As concentrações circulantes de corticosterona, catecolaminas e serotonina;
- c. As concentração cardíacas de catecolaminas e serotonina;
- d. A concentração sérica de ácidos graxos, colesterol total, triglicerídeos e HDL;
- e. A atividade da ECA e ECA 2 no plasma e coração;
- f. O balanço oxidante/antioxidante em tecido cardíaco.

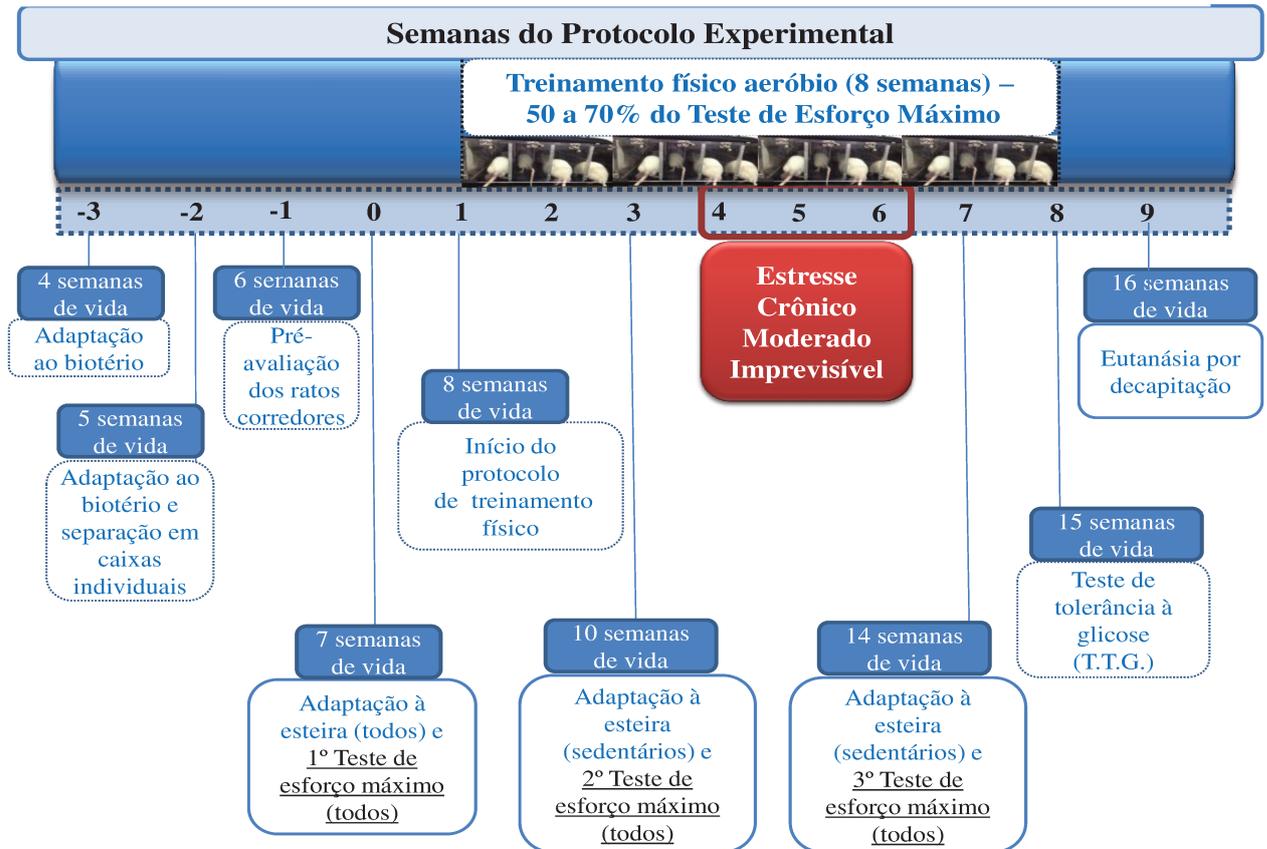
## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Nesse estudo, ao total, foram utilizados 40 ratos machos Sprague-Dawley SPF ("specific pathogen free") pesando 150 - 180 g no início do experimento, fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciências em Animais de Laboratório - UNICAMP (CEMIB). Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (Processo CEUA nº 2931-1; ANEXO 1) e estão de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Os animais chegaram com 1 mês de idade e passaram por um período de adaptação durante 1 semana (equivalente a semana -3 do fluxograma do delineamento experimental, Figura 3) no Biotério de Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP/UNICAMP. Eles foram alojados em gaiolas individuais com maravalha autoclavada, em estante ventilada para ratos Alesco<sup>®</sup>, em sala climatizada ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), com ciclo claro/escuro de 12/12 h (luzes acendendo às 06h00min) e foram alimentados com ração para ratos Purina<sup>®</sup>. A entrada no biotério foi rigorosamente controlada, permitida apenas para o experimentador responsável pelo projeto, vestido adequadamente com avental, luvas, máscara e proteção para os pés.

Figura 3. Fluxograma do delineamento experimental.



Fonte: Autoria própria.

#### 4.2 Delineamento Experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais (n = 6-8 ratos/grupo):

- 1) Controle (C)
- 2) Estresse (ECMI)
- 3) Controle + Exercício (EX)
- 4) Exercício + Estresse (EX+ ECMI)

Na sexta semana de vida dos animais (equivalente a semana -1 do fluxograma do delineamento experimental, Figura 3), houve pré-avaliação dos animais, e foram excluídos os não-corredores, ou seja aqueles que não caminharam na esteira em velocidade incremental de 5 m/min até 10 m/min, durante 10 minutos. Na sétima semana de vida (semana 0), todos os animais foram adaptados em esteira ergométrica, durante 5 dias e foi realizado o *primeiro teste de esforço* com a finalidade de obter a resposta máxima ao exercício de cada animal. A partir de então, foi possível prescrever o treinamento físico de intensidade leve à moderada (50-70%

do teste de esforço) para as 3 primeiras semanas de treinamento (equivalentes às semanas 1, 2 e 3, do fluxograma do delineamento experimental, Figura 3).

Na décima semana de vida (equivalente a semana 3 do fluxograma do delineamento experimental, Figura 3), foi realizado *um novo teste de esforço*, com a finalidade de novamente obter a resposta máxima ao exercício (avaliação do desempenho físico) dos animais e assim, prescrever o treinamento físico de intensidade leve à moderada para as próximas 5 semanas de treinamento. Cabe ressaltar que os animais sedentários realizaram novamente 5 dias de adaptação à esteira para a realização do segundo teste de esforço.

Assim, o protocolo de exercício físico foi iniciado na semana 1 e mantido até a semana 8 (Figura 3). O *terceiro e último teste de esforço* foi realizado na semana 7 (para não sofrer interferência do teste de tolerância à glicose, realizado na semana 8), em todos os animais, como descrito anteriormente. A finalidade do 3º teste de esforço foi avaliar a evolução do desempenho físico dos animais, em resposta ao exercício (Figura 3).

O peso corporal foi registrado semanalmente, durante 10 semanas. O estresse foi aplicado nas semanas 4, 5 e 6 do período experimental (Figura 3). O treinamento teve início antes da aplicação do protocolo de estresse com o objetivo de avaliar seu efeito não só terapêutico, mas também profilático, sobre o desenvolvimento das complicações induzidas pelo estresse. Por este motivo, os animais foram treinados durante as 3 semanas iniciais do protocolo experimental, antes de serem submetidos ao protocolo de estresse. Na semana 8 foi avaliada a concentração de glicose e insulina em jejum, bem como a resposta ao teste de tolerância à glicose. Os ratos foram eutanasiados, por decapitação, 15 dias após o término da aplicação do protocolo de ECMI, no início da 9ª semana experimental (Figura 3), para coleta de sangue e tecidos. Os animais foram eutanasiados 15 dias após o término do protocolo, uma vez que o nosso objetivo não foi avaliar os efeitos agudos desencadeados pelo estresse, que sabidamente estavam presentes, mas sim os efeitos crônicos do mesmo, que se mantiveram mesmo após a interrupção da aplicação do protocolo (Neves et al., 2009; Sanches, 2012). Adicionalmente, nos animais treinados, a eutanásia ocorreu em até 48 horas após a realização do último treino, com a finalidade de se obter os resultados relacionados aos efeitos crônicos do exercício físico regular.

### **4.3 Protocolo de Estresse**

Na 4ª, 5ª e 6ª semanas do período experimental, os animais foram submetidos ao protocolo de ECMI, adaptado pela modificação realizada por Neves et al. (2009), a partir da metodologia descrita por Moreau (1997). O protocolo de ECMI consiste na aplicação de

diferentes estímulos estressores, como a imobilização (Figura 4) e a inclinação de gaiolas a 45° (Figura 5) ao longo de 7 dias, repetindo-se os procedimentos por 3 semanas consecutivas (Tabela 1).

Figura 4. Estímulo estressor de imobilização aplicado em rato Sprague – Dawley



Fonte: Autoria própria.

Figura 5. Estímulo estressor de inclinação de gaiolas a 45° aplicado em ratos Sprague – Dawley.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 1. Protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível.

	Manhã	Tarde
Segunda-feira	8:00 – 9:00 h: Imobilização	13:00-14:00 h: Imobilização 18:00 h: Iluminação contínua durante a noite
Terça-feira	8:00 – 9:00 h: Imobilização	14:00 - 15:00 h: Imobilização seguida de inclinação de gaiola durante 15 horas.
Quarta-feira	8:00 - 10:00 h: Imobilização	13:00 - 14:00 h: Imobilização seguida de inclinação de gaiola durante 15 horas.
Quinta-feira	8:00 – 10:00 h: Imobilização 11:00 – 12:00 h: Imobilização	14:00 - 15:00 h: Imobilização seguida de alojamento em gaiolas com maravalha úmida durante 17 horas.
Sexta-feira	8:00 – 9:00 h: Imobilização	18:00 h: Ciclo claro/escuro invertido (até 08:00 h da segunda-feira seguinte)

Fonte: Adaptado de Neves et al., 2009.

#### 4.4 Avaliação da Capacidade Física Máxima e Protocolo de Treinamento Aeróbio incremental

O protocolo de treinamento aeróbio foi realizado em esteira ergométrica (AVS Projetos<sup>®</sup>) adaptada para ratos, sem o estímulo de choque. A esteira foi constituída por raias de alumínio com tampas de acrílico transparente, pintadas em preto na parte frontal. Além disso, para proporcionar um ambiente escuro a fim de facilitar o direcionamento e a permanência do animal em sua raia, durante as sessões de exercício, foi colocado sobre a metade distal da esteira um tecido preto (Figura 6). Para o deslocamento dos animais sobre a esteira, foi necessário um período de adaptação de uma semana (15 minutos/dia, 5 – 10 m/min) antes do 1º teste de esforço máximo. A capacidade aeróbia máxima foi avaliada individualmente por meio do teste de esforço máximo escalonado em esteira ergométrica, no qual foi avaliada a capacidade aeróbia máxima do rato quantificando-se a velocidade máxima e o tempo em que o animal conseguiu correr até a exaustão [o teste de esforço consistiu em um protocolo de exercício aeróbio escalonado, com incrementos de velocidade de 5 m/min a cada 3 minutos (Felix e Michelini, 2007) até que os animais atingissem a exaustão]. O teste de esforço máximo foi realizado 3 vezes durante o protocolo experimental, no final da semana 0 e ao final da 3ª e 7ª semanas de treinamento e/ou equivalentes a estas, para os ratos sedentários (Figura 3). É importante ressaltar que os animais de todos os grupos realizaram o teste de esforço, possibilitando assim, a comparação do desempenho físico entre os animais treinados e os sedentários, bem como a evolução temporal intra-grupo. O protocolo de treinamento físico aeróbio foi realizado por 8 semanas consecutivas, com intensidade baixa a moderada (50% a 70% da velocidade máxima

atingida no teste de esforço máximo) (Silva et al., 1997; Lehen et al., 2011), com duração de uma hora por dia (das 16:30 até as 17:30), 5 vezes por semana.

Figura 6. Treinamento aeróbio realizado em esteira ergométrica adaptada para ratos



Fonte: Autoria própria.

#### 4.5 Teste de tolerância à glicose e avaliação da ocorrência de resistência à insulina

Na semana 8 do protocolo experimental (Figura 3), após jejum de seis horas (e 48 horas após a última sessão de exercício físico para os grupos treinados), os animais foram anestesiados superficialmente por inalação de halotano e uma amostra de sangue foi coletada da veia caudal, para determinação da glicemia e insulina em jejum (Liang et al., 2005; Neves et al., 2012). Em seguida, foi administrada solução de glicose (2 g / kg) por via oral (gavagem). Após 30, 60, 90 e 120 minutos, o sangue de cada animal foi novamente coletado, para determinação da glicemia (Liang et al., 2005). Uma gota de sangue foi utilizada para determinação da glicemia, imediatamente após cada coleta, em glicosímetro Optium Xceed®. O volume restante da coleta de sangue de cada rato foi centrifugado e o plasma foi armazenado em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para posterior determinação da concentração de insulina e do índice de

resistência à insulina, Índice HOMA (*Homeostasis Model Assessment*), calculado pela fórmula descrita por Sondergaard et al. (2006):

$$\frac{[\text{glicose em jejum plasmática (mmol/L)} \times \text{Insulina em jejum plasmática (mU/mL)}]}{22,5}$$

#### 4.6 Dosagem de insulina

A dosagem de insulina plasmática foi realizada por radioimunoensaio, segundo método descrito por Scott e Rojas (1981). Foi utilizado a insulina padrão de rato (com curva de 0,0195 a 5 ng/mL em diluição seriada), Human Recombinant 125I – Insulina (PerkinElmer®, Waltham, USA).

#### 4.7 Obtenção das amostras

Os animais foram mortos por decapitação, ao final do período experimental. A eutanásia ocorreu sem anestesia prévia, a fim de evitar qualquer influência sobre a concentração sanguínea de corticosterona (Vahl et al., 2005). O sangue de cada animal foi coletado em três diferentes tubos de ensaio [um para obtenção do soro sanguíneo e dois para obtenção do plasma, sendo em um com heparina e outro com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético)] que foram centrifugados e distribuídos em 4 alíquotas de eppendorf de 200 µL cada. O coração foi isolado, rapidamente congelado em gelo seco e posteriormente o ventrículo esquerdo foi isolado. Todas as amostras foram congeladas e armazenadas a - 80°C para posteriores dosagens bioquímicas.

#### 4.8 Dosagem de corticosterona

A determinação da concentração plasmática de corticosterona foi realizada por ensaio enzimático colorimétrico, utilizando-se kit comercial produzido por Enzo Life Sciences® (Ann Arbor, MI, USA), com sensibilidade de 0,027 ng/mL e com coeficiente de variação intra e inter-ensaio de 7,7% e 9,7%, respectivamente.

#### 4.9 Avaliação de ácidos graxos circulantes

Os ácidos graxos livres séricos foram quantificados por ensaio enzimático-colorimétrico, utilizando-se kit comercial Bio Assay Systems® (Hayard, CA, EUA), conforme orientações do fabricante.

#### **4.10 Avaliação da concentração de colesterol total, triglicerídeos e HDL**

As concentrações séricas de lipídios foram determinadas por ensaio enzimático-colorimétrico, utilizando-se kits comerciais Gold Analisa® (Belo Horizonte, MG, Brasil) (Dantas et al., 2006)

#### **4.11 Quantificação de catecolaminas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**

Para a dosagem de catecolaminas do coração, um fragmento do VE (ventrículo esquerdo) (100 mg) foi processado em homogeneizador (Polytron) mantido em gelo, em 7 mL solução de ácido perclórico 1 mM, contendo 0,02 % de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (metabissulfito de sódio) e 10 µL do padrão interno de cálculo DHBA (dihidroxibenzilamina) 1 mM. O homogenato foi mantido em refrigeração overnight, centrifugado a 10000 rpm por 50 min, e o sobrenadante filtrado em membrana filtrante de PVDF (0,22µm).

Para dosagem plasmática de Catecolaminas, utilizamos 200 uL de plasma juntamente com 50 mg de alumina (Al<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), tampão TRIS (pH 8,6), 40 µL (8 ng) de DHBA (padrão interno, dihidroxibenzilamina). As catecolaminas extraídas foram eluídas com 400 µL de ácido perclórico 0,1 M. O sobrenadante foi centrifugado a 10000 rpm e filtrado em membrana filtrante de PVDF (0,22 µm).

As amostras obtidas a partir do VE e do plasma foram injetadas em coluna de fase reversa (Cavalheiro et al., 1994; Di Marco et al., 2003), e as catecolaminas foram separadas usando um par iônico acoplado com detecção eletroquímica (0,75 V). A separação isocrática foi obtida usando uma coluna C18 Spheri-5 ODS 5 µm. O sistema de HPLC consistiu em uma bomba (modelo LC-10 ADVP- Shimadzu), detector eletroquímico (modelo L-ECD- 6A- Shimadzu), injetor automático (SIL- 20AC- Shimadzu), pré-coluna RP 18, 7 µm (15x3,2 mm). No plasma, as aminas biogênicas foram separadas por eluição isocrática, fluxo de 0,8 mL/min durante aproximadamente 25 min, e em tecido (VE), em um fluxo de 1 mL/min durante aproximadamente 60 minutos, sendo que a fase móvel foi composta de fosfato de sódio 0,02 M (Merck), citrato de sódio 0,02 M (Merck), EDTA 0,12 mM (Merck), heptano sulfônico 566 mg/L (Sigma) e metanol (Licrosolv) 10 % e ajustado o pH para 2,53 com ácido perclórico a 50% (Merck). Para cálculo da concentração foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Pg A/mL} = \text{PsA/PsDHBA} \times \text{quantidade do padrão} \times \text{fator de diluição}}{\text{PstA/PstDHBA}}$$

Onde: A=amina; Ps= área do pico da amina na amostra; PstA= área do pico da amina no padrão; PsDHBA= área do pico do DHBA na amostra, e PstDHBA= área do pico de DHBA no padrão. DHBA foi o padrão interno de extração, usado para o cálculo de recuperação nos tempos de retenção esperados.

#### 4.12 Dosagem de serotonina

Para o preparo do homogenato, um fragmento do VE (100 mg) foi processado em homogeneizador (Polytron) mantido em gelo, em 7 mL solução de ácido perclórico 1 mM, contendo 0,02 % de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (metabissulfito de sódio) e 10 µL DHBA (dihidroxibenzilamina) 1 mM. Para dosagem de serotonina sérica, foi utilizado um volume de 100 µL. As concentrações de serotonina no VE foram determinadas por HPLC, utilizando uma coluna Spheri-5 ODS 5 µm. A serotonina foi separada por eluição isocrática, fluxo de 1,0 mL/min. O soro (100 µL) foram desproteinizados com 50 µL ácido perclórico 0,34 M gelado, seguido de congelamento (nitrogênio líquido) por 5 min, centrifugado a 10000 rpm a 4 °C por 40 min. Foram adicionados 834 µL de metabissulfito de sódio e 66 µL de padrão interno a 100 µL do sobrenadante. A amostra (100 µL) foi injetada na coluna (fase reversa), C18 50-4,6mm fluxo 1,0/min por 8 minutos e as concentrações de serotonina no VE (Cavalheiro et al., 1994) e no soro foram expressas em pg/g e pg/mL, respectivamente. Para dosagem de serotonina do homogenato do tecido segue o mesmo protocolo de tecido para Catecolaminas.

#### 4.13 Determinação da atividade enzimática da ECA

O fragmento do ventrículo esquerdo (25 mg) foi homogeneizado em 1 mL de tampão borato, contendo PMSF (1 mM). Em seguida, o conteúdo foi submetido à centrifugação (5000 rpm, 15 min, 4 °C), e a partir de uma alíquota do sobrenadante, determinou-se concentração proteica das amostras (Bradford et al., 1976). Foi utilizada uma curva de albumina bovina sérica como padrão, com leitura da absorbância a 595 nm (Bio-Rad Protein Assay).

A atividade da ECA no ventrículo esquerdo e no plasma foi determinada fluorimetricamente, utilizando Z-Phe-His-Leu-OH (ZPhe-His-Leu) (Bachem Bioscience Inc., EUA) (Piquilloud et al., 1970; Friedland et al., 1976) como substrato. As amostras (10 µL do homogenato de ventrículo esquerdo ou 10 µL de soro) foram incubadas, por 10 minutos a 37 °C, com 200 µL (5 mM) do substrato ZPhe-His-Leu, sendo a reação enzimática interrompida

com 1,5 mL de NaOH 0,28 N. O dipeptídeo His-Leu liberado foi acoplado ao marcador fluorescente ortoftaldialdeído (Sigma Chemical CO, EUA) (20 mg/mL, em metanol) e a reação fluorimétrica interrompida após 10 minutos, pela adição de 200 µL HCl 3 N. A leitura da fluorescência (excitação: 360 nm; emissão: 500 nm) foi realizada (Infinite 200, TECAN, Suíça), e as medidas de fluorescência, dadas em unidades arbitrárias, registradas para posterior cálculo. A atividade enzimática da ECA no soro e no ventrículo esquerdo foi expressa em nmol/mL/min e nmol/mL/mg, respectivamente.

#### **4.14 Determinação da atividade enzimática da ECA2**

Para o preparo do homogenato das amostras, um fragmento do ventrículo esquerdo (25 mg) foi homogeneizado (Polytron), em 1 mL de Tampão Tris-HCl 75 mM, NaCl 1M contendo 0,5 µM de ZnCl<sub>2</sub>, 10 µM de captopril e coquetel de inibidores de protease Complete Mini EDTA Free (Roche®), seguido de centrifugação (12000 rpm, 5 min., 4 °C). A partir do sobrenadante foi determinado o conteúdo de proteínas totais das amostras Bradford et al. (1976), utilizando-se uma curva de albumina bovina sérica como padrão, com leitura da absorbância a 595 nm (Bio-Rad Protein Assay).

A atividade enzimática da ECA2 no homogenato e no soro foi determinada fluorimetricamente, utilizando 10 µM de Mca-APK (Dnp) (Biomol International, EUA), como substrato, na presença e ausência de 10 µM de DX600 (Phoenix Pharmaceuticals, EUA) em tampão Tris-HCl 75 mM, NaCl 1, pH 6,5 contendo 10 µM de captopril, 0,5 µM de ZnCl<sub>2</sub> e coquetel de inibidores de protease Complete mini EDTA free (Roche®), diluído conforme recomendação do fabricante, como descrito por Pedersen et al. (2011), com algumas modificações. Após o período de incubação de 0 e 30 min a 37 °C, a leitura fluorimétrica (excitação: 320 nm; emissão: 420 nm) foi realizada (Infinite 200, TECAN, Suíça), sendo as medidas de fluorescência, em unidades arbitrárias, registradas para posterior cálculo. A atividade enzimática da ECA2 no soro e no ventrículo esquerdo foi expressa em nmol/mL/min e nmol/mL/mg, respectivamente.

#### **4.15 Balanço oxidante/antioxidante em tecido cardíaco**

##### **4.15.1 Biomarcador da Peroxidação Lipídica em Tecido Cardíaco (TBARS)**

A peroxidação lipídica foi determinada por meio do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico utilizando o método de Buege e Aust (1978). A determinação da concentração de TBARS se baseia na capacidade do ácido tiobarbitúrico (TBA) em se ligar a

lipídios oxidados. Resumidamente, 100 mg do ventrículo esquerdo foram homogeneizados em 1 mL de tampão Tris HCl 20 mM (pH 7,4) e em seguida centrifugado por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica. Dessa forma, 500 µL do sobrenadante do homogenato foram misturados com TCA (28% p/v em HCl 0,25 M), TBA (1% em ácido acético 0,25 M) e BHT (125 mM em etanol), aquecidos por 15 min a 95 °C e imediatamente a seguir colocados em banho de gelo. O precipitado foi removido por centrifugação a 10.000 g por 15 minutos a 4 °C, e a absorbância do sobrenadante determinada a 535 nm. Água destilada foi utilizada como branco.

Os níveis de TBARS foram calculados utilizando o coeficiente de extinção molar do malondialdeído (MDA) ( $154000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) segundo a lei de Lambert Beer.

#### 4.15.2 Catalase

A atividade da catalase foi determinada de acordo com Aebi (1984). O método baseia-se na decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela enzima, durante 3 min. Resumidamente, 100 mg de ventrículo esquerdo foram homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato 100 mM (pH 7,2) e em seguida centrifugados a 10.000 g por 10 minutos à 4 °C. O sobrenadante retirado foi usado como amostra biológica. Em um tubo de polipropileno foram colocados 50 µL de tampão fosfato 100 mM (pH 7,2) e 40 µL de água destilada e mantido em banho maria a 30 °C por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 10 µL da amostra e a reação iniciada pela adição de 900 µL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 mM). As absorbâncias foram determinadas exatamente a cada minuto, durante três minutos a 240 nm. Água destilada foi utilizada como branco.

A atividade da catalase foi calculada segundo a lei de Lambert Beer. A absorbância utilizada foi correspondente ao delta de absorbância por minuto. Foi utilizado o coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio ( $39,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Os resultados foram expressos em unidade por miligrama de proteína. Uma unidade de catalase é equivalente a hidrólise de 1 µmol de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por minuto.

#### 4.15.3 Proteínas Totais em Tecido

A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com o método de Lowry et al. (1951), sendo esta análise realizada para fazer a correção das dosagens de catalase e TBARS. O princípio do método baseia-se na redução do reagente de Folin Ciocalteu, ao reagir com aminoácidos aromáticos, catalisada por íons cobre, em meio alcalino, formando uma coloração azul.

Inicialmente foram preparadas as soluções de trabalho conforme descrito abaixo:

Reagente A: Foram dissolvidos 0,25 g de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) e 0,5 g de citrato de sódio em 100 mL de água destilada.

Reagente B: Foram dissolvidos 5 g de carbonato de sódio e 1 g de hidróxido de sódio em 250 mL de água destilada.

Reagente C: Em 50 mL de reagente B foram adicionados 1 mL de reagente A.

Reagente D: Em 1 mL de reagente de Folin foram adicionados 1 mL água destilada.

Para a realização do ensaio, 10  $\mu\text{L}$  do sobrenadante do homogenato de tecido cardíaco, foram diluídos em 90  $\mu\text{L}$  de água destilada. Em tubos de polipropileno foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  da amostra diluída ou soluções padrão de albumina e água destilada (branco). Em seguida, foi adicionado 1 mL do reagente C. Os tubos foram agitados no vórtex e incubados a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do reagente D em todos os tubos, agitando vigorosamente, e após 30 minutos de incubação no escuro as absorbâncias das amostras relativas ao branco foram determinadas a 660 nm. Diluições seriadas de uma solução de concentração conhecida de albumina bovina sérica foram utilizadas para a construção da curva de calibração. Após análise de regressão linear, foi determinada a equação da reta que foi utilizada para determinar a concentração de proteínas totais no homogenato cardíaco.

#### **4.16 Análise estatística**

Os resultados dos diferentes grupos experimentais foram comparados utilizando-se Análise de Variância bifatorial (Two-way ANOVA, para comparação inter-grupo) ou Análise de Variância para medidas repetidas (para comparação intra-grupo, durante os três testes de esforço), seguidas do Teste de Tukey para comparação múltipla das médias. Valores de  $p$  menores do que 0,05 foram indicativos de significância estatística.

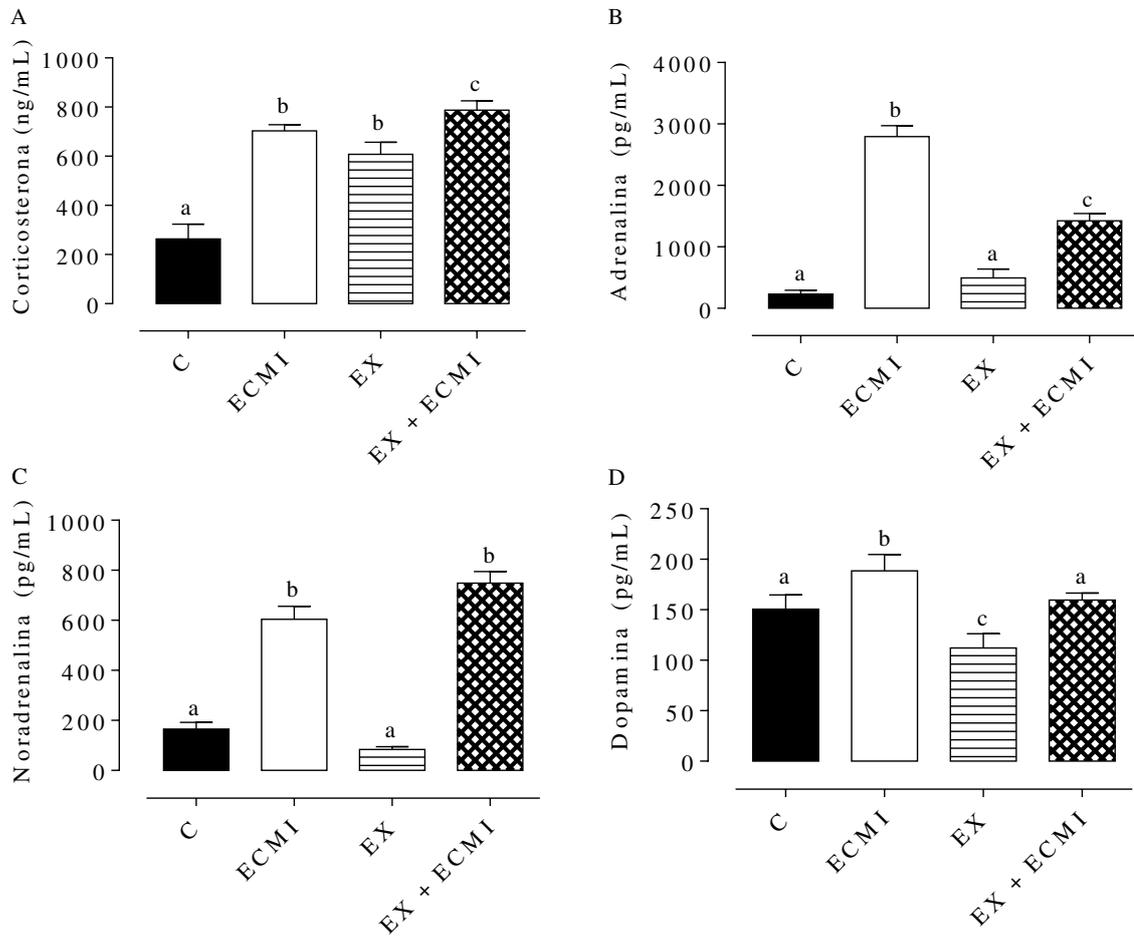
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação do protocolo de ECMI

Na Figura 7 estão apresentados os resultados referentes às concentrações circulantes de corticosterona, adrenalina, noradrenalina e dopamina dos 4 grupos experimentais. O ECMI (ECMI:  $702,8 \pm 25,4$ ) e o exercício (EX:  $607,7 \pm 49,1$ ) induziram aumento significativo da concentração plasmática de corticosterona, comparada ao grupos controle (C:  $263,4 \pm 60,0$ ) e este aumento foi maior no grupo em que ambos estiveram presentes (EX + ECMI:  $787,8 \pm 37,8$  ng/mL  $p < 0,05$ , Figura 7A).

O ECMI também induziu aumento das concentrações circulantes de adrenalina (ECMI:  $2796 \pm 174,4$ ), noradrenalina (ECMI:  $603,7 \pm 52,2$ ) e dopamina (ECMI:  $188,5 \pm 16,2$  ng/mL  $p < 0,05$ , Figuras 7B, C e D). Porém, no grupo submetido apenas ao exercício a adrenalina e a noradrenalina permaneceram equivalentes aos seus grupos controles (EX:  $493,9 \pm 145,1$  vs. C:  $232,4 \pm 61,0$ ) e (EX:  $83,8 \pm 10,8$  vs. C:  $165 \pm 27$  pg/mL,  $p > 0,05$ ) respectivamente. Já a concentração de dopamina apresentou-se reduzida no grupo exercício (EX:  $112,1 \pm 14,1$ ) em relação aos demais grupos (C:  $150,7 \pm 1$ ; ECMI:  $188,5 \pm 16,2$ ; EX + ECMI:  $159,7 \pm 6,8$  pg/mL  $p < 0,05$ ). Além disto, é importante mencionar que o exercício físico foi capaz de prevenir o aumento da concentração circulante de adrenalina (EX + ECMI:  $1423,0 \pm 120,6$ ) e dopamina ( $p < 0,05$ ), mas não de noradrenalina ( $748,9 \pm 46,1$  pg/mL  $p > 0,05$ ), dos animais submetidos ao ECMI (Figuras 7B, C e D).

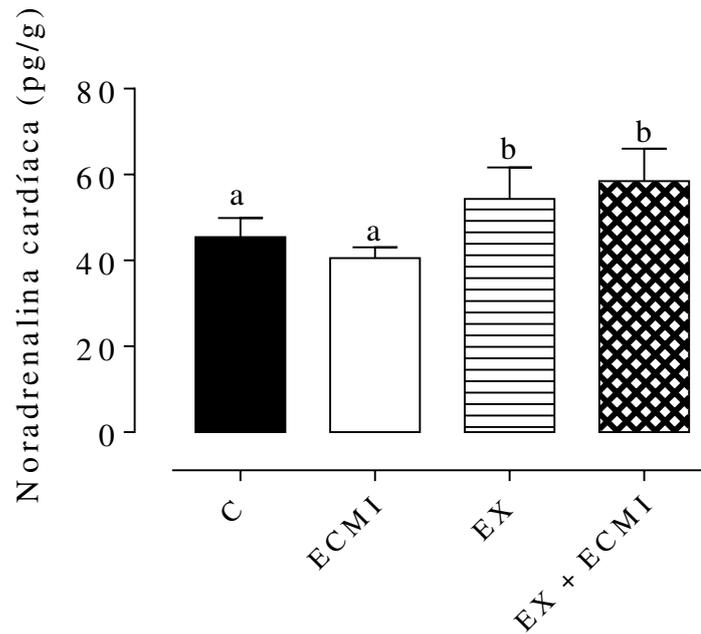
Figura 7. Concentração circulante de corticosterona e de catecolaminas



Concentração circulante de corticosterona (ng/mL) (A), adrenalina (B), noradrenalina (C) e dopamina (D) (pg/mL) de ratos controle ou submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI) e/ou ao treinamento físico aeróbico (EX). Os resultados estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão. N = 6-8/grupo. Letras diferentes indicam significância estatística entre os grupos (ANOVA bifatorial seguido de Tukey;  $p < 0,05$ ). C = Controle; ECMI = Estresse Crônico Moderado e Imprevisível; EX = Exercício; EX + ECMI = Exercício + ECMI.

Na figura 8 estão apresentados os dados referentes à concentração tecidual de noradrenalina. O treinamento físico aeróbico aumentou significativamente a concentração cardíaca de noradrenalina nos grupos que realizaram o exercício (EX:  $54,4 \pm 7,3$  pg/g) e (EX + ECMI:  $58,5 \pm 7,5$  pg/g), comparados aos grupos controle (C:  $45,41 \pm 4,5$  pg/g) ou somente estressado (ECMI:  $40,57 \pm 2,5$  pg/g, Figura 8,  $p < 0,05$ ), respectivamente.

Figura 8. Concentração de noradrenalina em tecido cardíaco

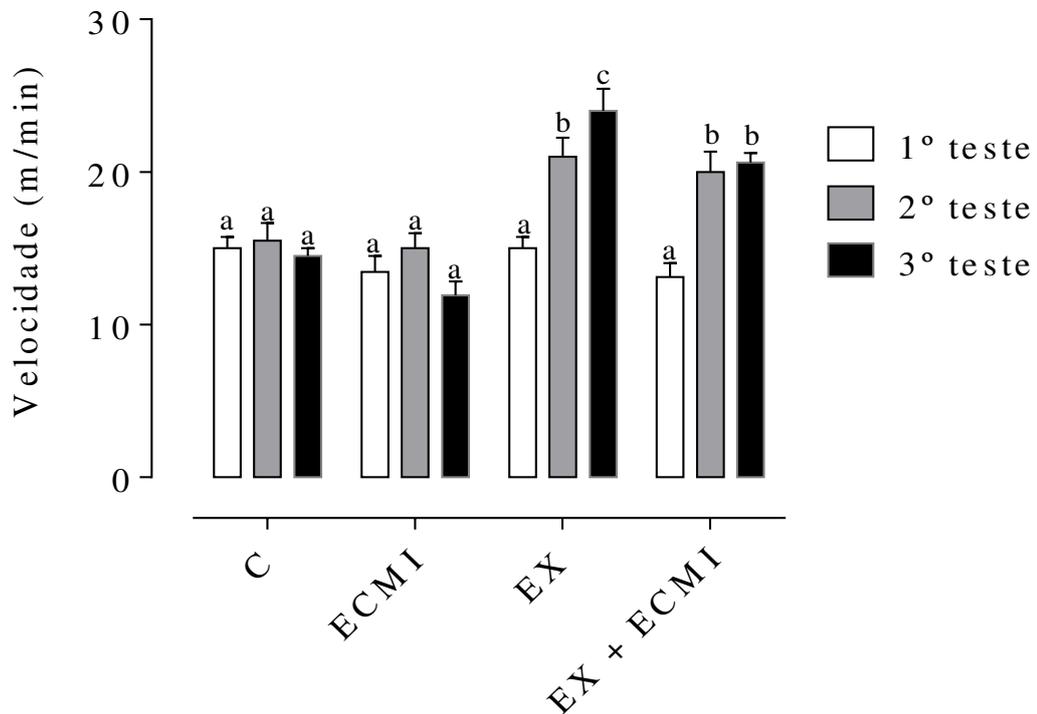


Concentração de noradrenalina em tecido cardíaco (pg/g) de ratos controle ou submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI) e/ou ao treinamento físico aeróbico (EX). Os resultados estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão. N = 6-8/grupo. . Letras diferentes indicam significância estatística entre os grupos (ANOVA bifatorial seguido de Tukey;  $p < 0,05$ ). C = Controle; ECMI = Estresse Crônico Moderado e Imprevisível; EX = Exercício; EX + ECMI = Exercício + ECMI.

## 5.2 Desempenho físico

Na Figura 9, estão apresentados os resultados relacionados ao desempenho dos animais nos três testes de esforço máximo. Não houve diferença entre os 4 grupos experimentais no 1º teste de esforço máximo ( $p > 0,05$ ). Além disto, observa-se que o desempenho físico dos animais dos grupos sedentários (C e ECMI) não foi alterado ao longo do período experimental (comparação intra-grupo). Por outro lado, os animais treinados (EX e EX + ECMI) apresentaram melhora do desempenho físico no 2º teste de esforço, em comparação ao 1º, e apenas o grupo EX apresentou melhora progressiva, observada após a realização do 3º teste ( $p < 0,05$ ). É importante mencionar que os animais treinados (EX e EX + ECMI) apresentaram aumento do desempenho aeróbico no 2º e 3º testes de esforço, em comparação aos respectivos sedentários ( $p < 0,05$ ).

Figura 9. Desempenho físico em resposta aos três Testes de Esforço Máximo

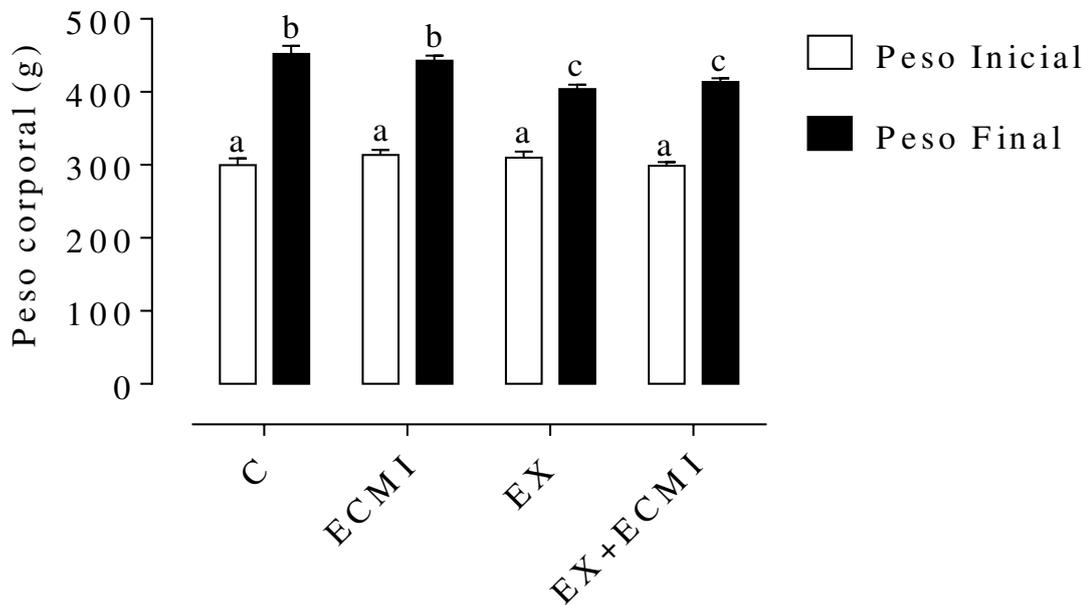


Desempenho físico (m/min) em resposta aos três Testes de Esforço Máximo de ratos controle ou submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI) e/ou ao treinamento físico aeróbico (EX). Os resultados estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão. N = 6-8/grupo. Letras diferentes indicam significância estatística entre os grupos (ANOVA bifatorial seguido de Tukey para comparação inter-grupo e ANOVA seguido de Tukey para medidas repetidas para comparação intra-grupo;  $p < 0,05$ ). C = Controle; ECMI = Estresse Crônico Moderado e Imprevisível; EX = Exercício; EX + ECMI = Exercício + ECMI.

### 5.3 Peso corporal e perfil glicêmico

Não foram observadas diferenças estatísticas no peso corporal inicial entre os quatro grupos experimentais (Figura 10,  $p > 0,05$ ). Ao final do período experimental, os animais dos grupos treinados (EX e EX + ECMI) apresentaram menor peso corporal em comparação aos respectivos sedentários (C e ECMI) ( $p < 0,05$ , Figura 10).

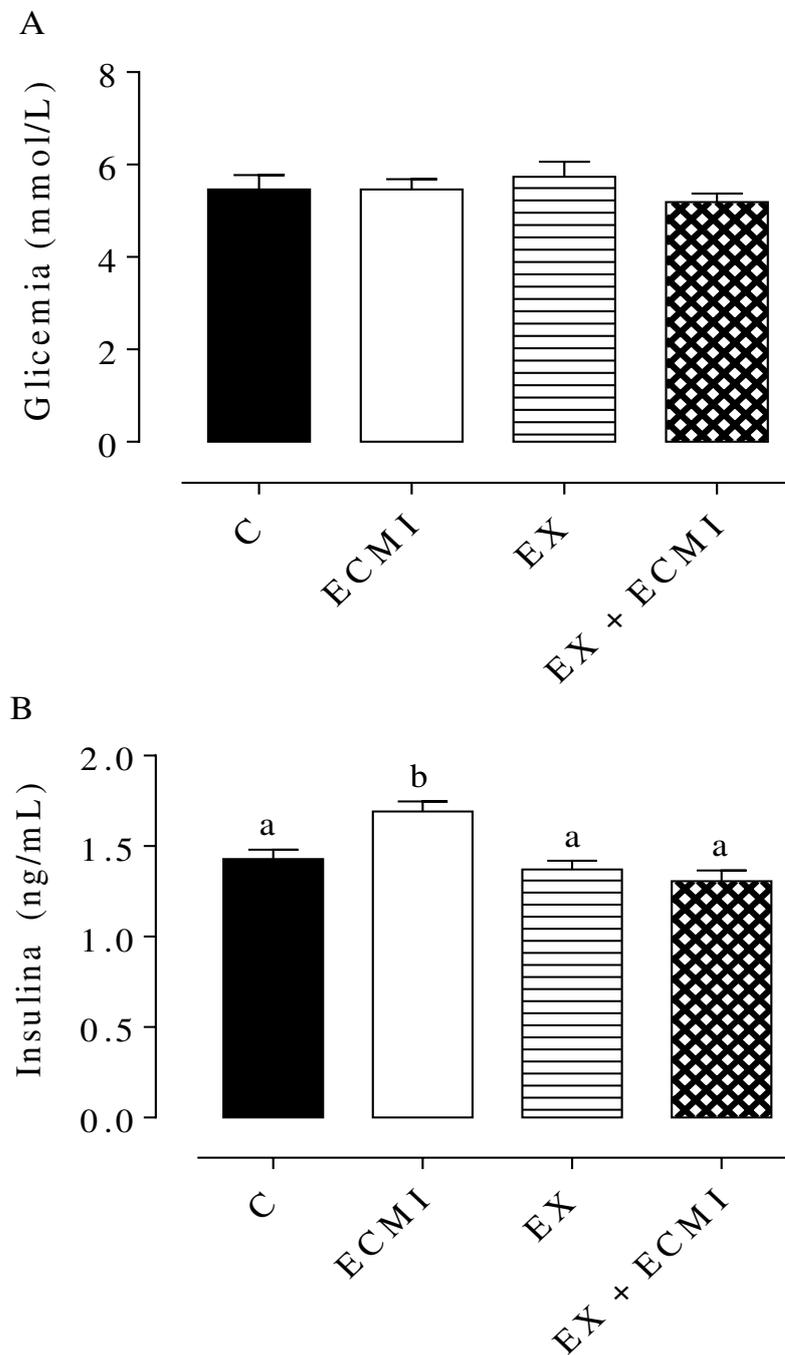
Figura 10. Peso corporal inicial e final



Peso corporal inicial e final (g) de ratos controle ou submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI) e/ou ao treinamento físico aeróbio (EX). Os resultados estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão. N = 6-8/grupo. Letras diferentes indicam significância estatística entre os grupos (ANOVA bifatorial seguido de Tukey;  $p < 0,05$ ). C = Controle; ECMI = Estresse Crônico Moderado e Imprevisível; EX = Exercício; EX + ECMI = Exercício + ECMI.

Os dados relacionados ao controle glicêmico estão apresentados nas figuras 11 e 12. Não houve diferença na glicemia de jejum entre os grupos (Figura 11 A,  $p > 0,05$ ). O ECMI aumentou significativamente a concentração plasmática de insulina do grupo ECMI ( $1,7 \pm 0,1$ ) em relação aos demais (C:  $1,4 \pm 0,0$ ; EX:  $1,4 \pm 0,1$  e EX + ECMI:  $1,3 \pm 0,1$  ng/mL Figura 11B,  $p < 0,05$ ). Por outro lado, o exercício físico cancelou o efeito hiperinsulinêmico induzido pelo estresse ( $p < 0,05$ ), não havendo diferença entre os grupos C, EX e EX + ECMI (Figura 11B,  $p > 0,05$ ).

Figura 11. Concentração plasmática de glicose e insulina em jejum

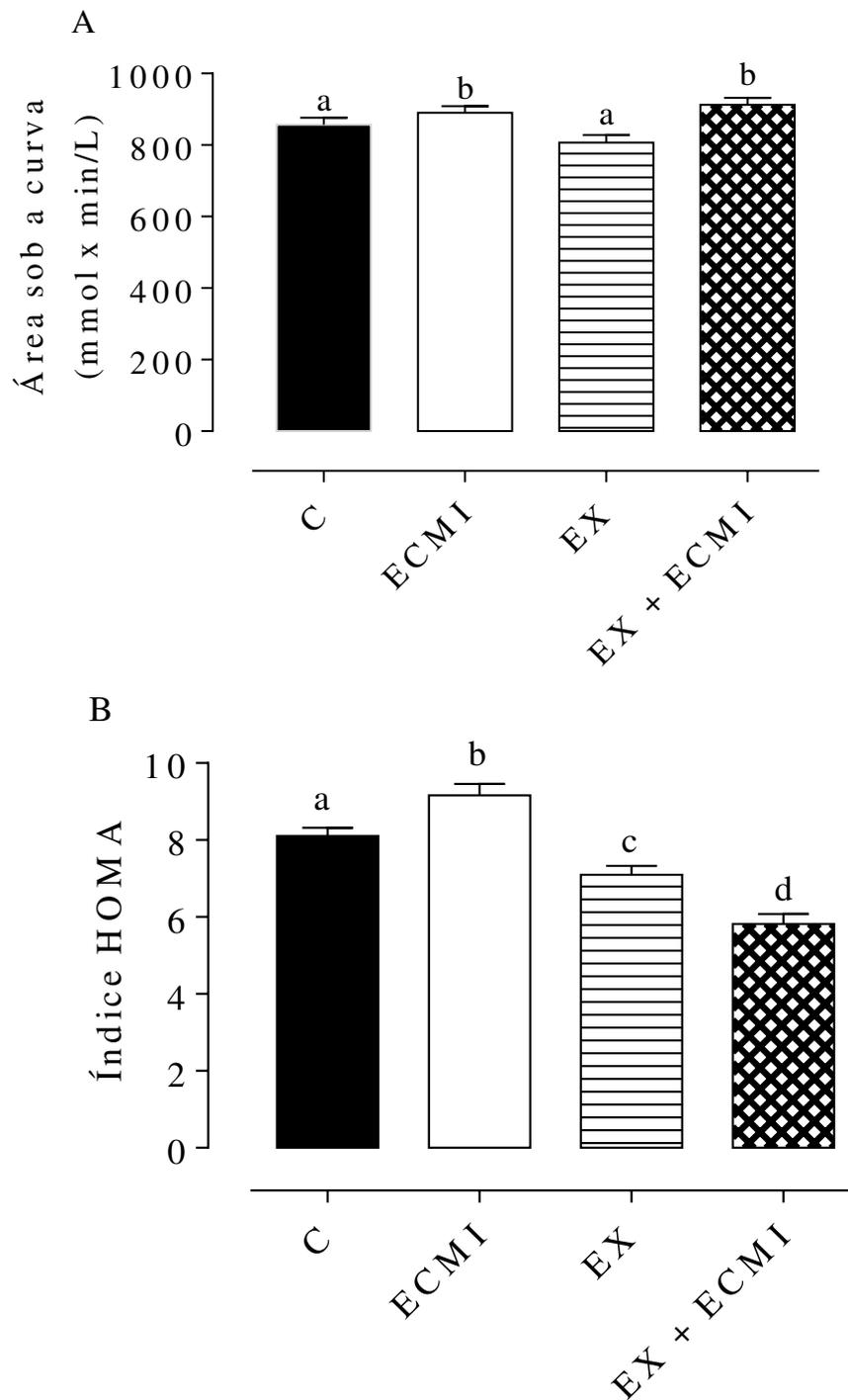


Concentração plasmática de glicose (A; mmol/L) e insulina (B; ng/mL) em jejum de ratos controle ou submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI) e/ou ao treinamento físico aeróbio (EX). Os resultados estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão. N = 6-8/grupo. Letras diferentes indicam significância estatística entre os grupos (ANOVA bifatorial seguido de Tukey;  $p < 0,05$ ). C = Controle; ECMI = Estresse Crônico Moderado e Imprevisível; EX = Exercício; EX + ECMI = Exercício + ECMI.

O resultado do teste de tolerância à glicose mostra que os grupos submetidos ao ECMI apresentaram a maior área sob a curva (ECMI:  $889,9 \pm 19,2$  e EX + ECMI:  $912,8 \pm 18,9$ ) em relação aos grupos C ( $857,0 \pm 19,2$ ) e EX ( $806,8 \pm 21,7$  mmol x min /L Figura 12A,  $p < 0,05$ ), respectivamente.

O ECMI induziu aumento índice de HOMA (ECMI:  $9,2 \pm 0,3$ ) e o exercício físico foi capaz de reduzir o mesmo, inclusive no grupo de animais submetidos ao estresse (EX + ECMI:  $5,8 \pm 0,2 < EX: 7,15 \pm 0,2 < C: 8,1 \pm 0,2$ ; Figura 12B,  $p < 0,05$ ).

Figura 12. Área sob a curva obtida pelo Teste de Tolerância à Glicose e Índice HOMA

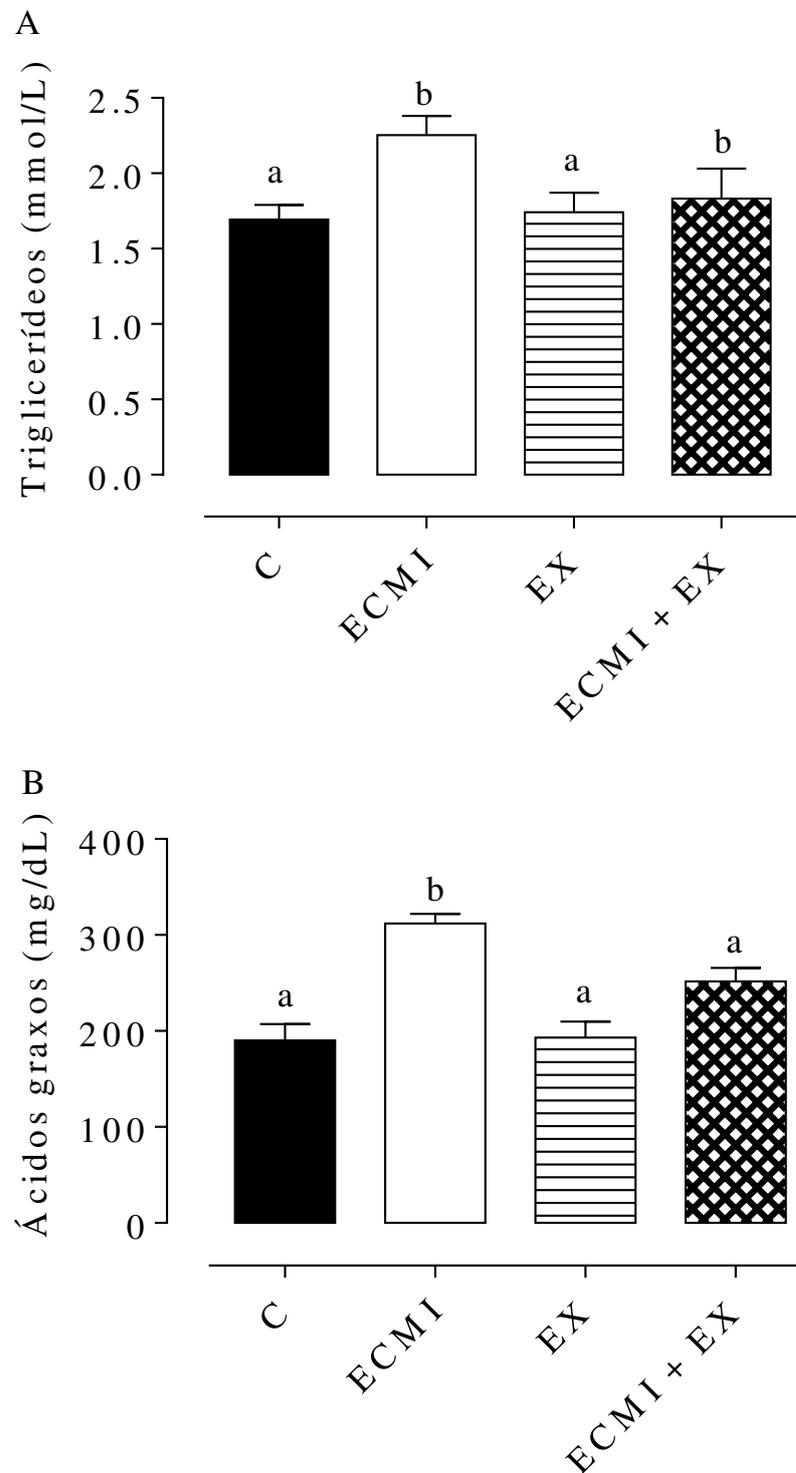


Área sob a curva no Teste de Tolerância à Glicose (A; mmol x min/L) e Índice HOMA (B) de ratos controle ou submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI) e/ou ao treinamento físico aeróbio (EX). Os resultados estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão. N = 6-8/grupo. Letras diferentes indicam significância estatística entre os grupos (ANOVA bifatorial seguido de Tukey;  $p < 0,05$ ). C = Controle; ECMI = Estresse Crônico Moderado e Imprevisível; EX = Exercício; EX + ECMI = Exercício + ECMI.

#### 5.4 Perfil lipídico

O ECMI aumentou a concentração sérica de triglicerídeos nos grupos ECMI ( $2,2 \pm 0,1$ ) e EX + ECMI ( $1,8 \pm 0,2$ ) em relação aos grupos C ( $1,7 \pm 0,1$ ) e EX ( $1,7 \pm 0,1$  mmol/L Figura 13A,  $p < 0,05$ ), respectivamente. O ECMI desencadeou aumento na concentração sérica de ácidos graxos livres no grupo ECMI ( $311,9 \pm 10,0$ ) comparado aos demais (C  $190,1 \pm 17,3$ ; EX  $193,0 \pm 16,74$ ; e EX + ECMI  $251,6 \pm 14,16$  mg/dL). Esta resposta não foi observada no grupo EX + ECMI, indicando que o exercício preveniu o aumento da concentração de ácidos graxos desencadeado pelo ECMI (Figura 13B,  $p < 0,05$ ).

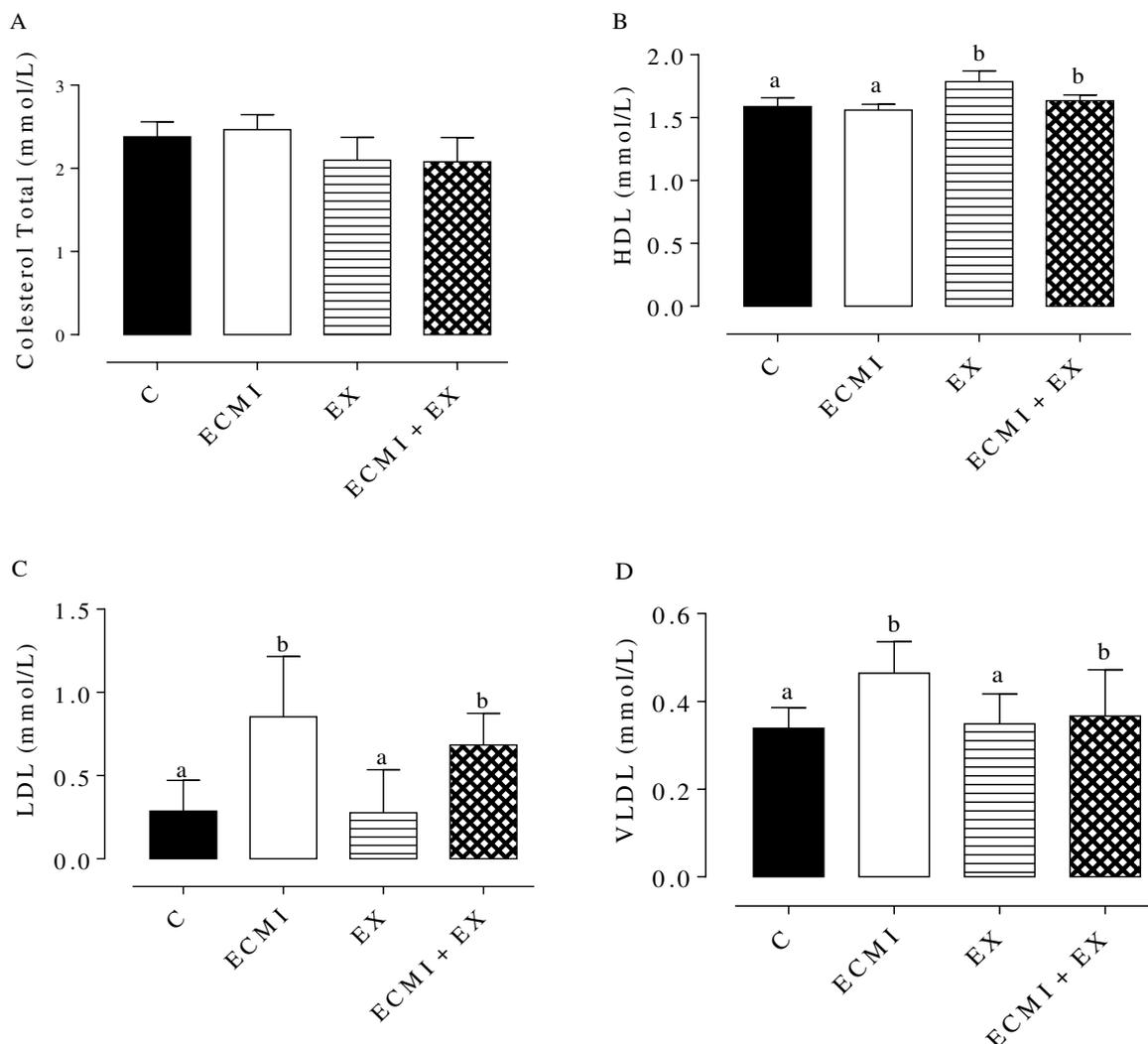
Figura 13. Concentração sérica de triglicerídeos e de ácidos graxos livres



Concentração sérica de triglicerídeos (A; mmol/L) e de ácidos graxos livres (B; mg/dL) de ratos controle ou submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI) e/ou ao treinamento físico aeróbico (EX). Os resultados estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão. N = 6-8/grupo. Letras diferentes indicam significância estatística entre os grupos (ANOVA bifatorial seguido de Tukey;  $p < 0,05$ ). C = Controle; ECMI = Estresse Crônico Moderado e Imprevisível; EX = Exercício; EX + ECMI = Exercício + ECMI.

O ECMI e o exercício físico não exerceram influência significativa sobre a concentração sérica de colesterol total (Figuras 14A,  $p > 0,05$ ). Por outro lado, o exercício aumentou a concentração sérica de HDL nos grupos EX ( $1,79 \pm 0,08$ ) e EX + ECMI ( $1,64 \pm 0,05$ ) em comparação aos respectivos grupos C ( $1,59 \pm 0,07$ ) e ECMI ( $1,56 \pm 0,05$  mmol/L Figura 14B,  $p < 0,05$ ). Além disso, comparados aos grupos controles, o exercício não foi capaz de alterar as concentrações de LDL (C:  $0,29 \pm 0,11$  vs. EX:  $0,28 \pm 0,13$ ) e VLDL (C:  $0,34 \pm 0,02$  vs. EX:  $0,35 \pm 0,03$  mmol/L Figura 14C e D,  $p > 0,05$ ). Adicionalmente, independente do exercício físico, o ECMI foi responsável por causar aumento destes parâmetros (LDL = ECMI:  $0,85 \pm 0,21$ ; EX + ECMI:  $0,68 \pm 0,11$ ) e (VLDL = ECMI:  $0,46 \pm 0,02$ ; EX + ECMI:  $0,37 \pm 0,04$  mmol/L Figura 14C e D,  $p < 0,05$ ).

Figura 14. Concentração sérica de colesterol total, HDL, LDL e VLDL



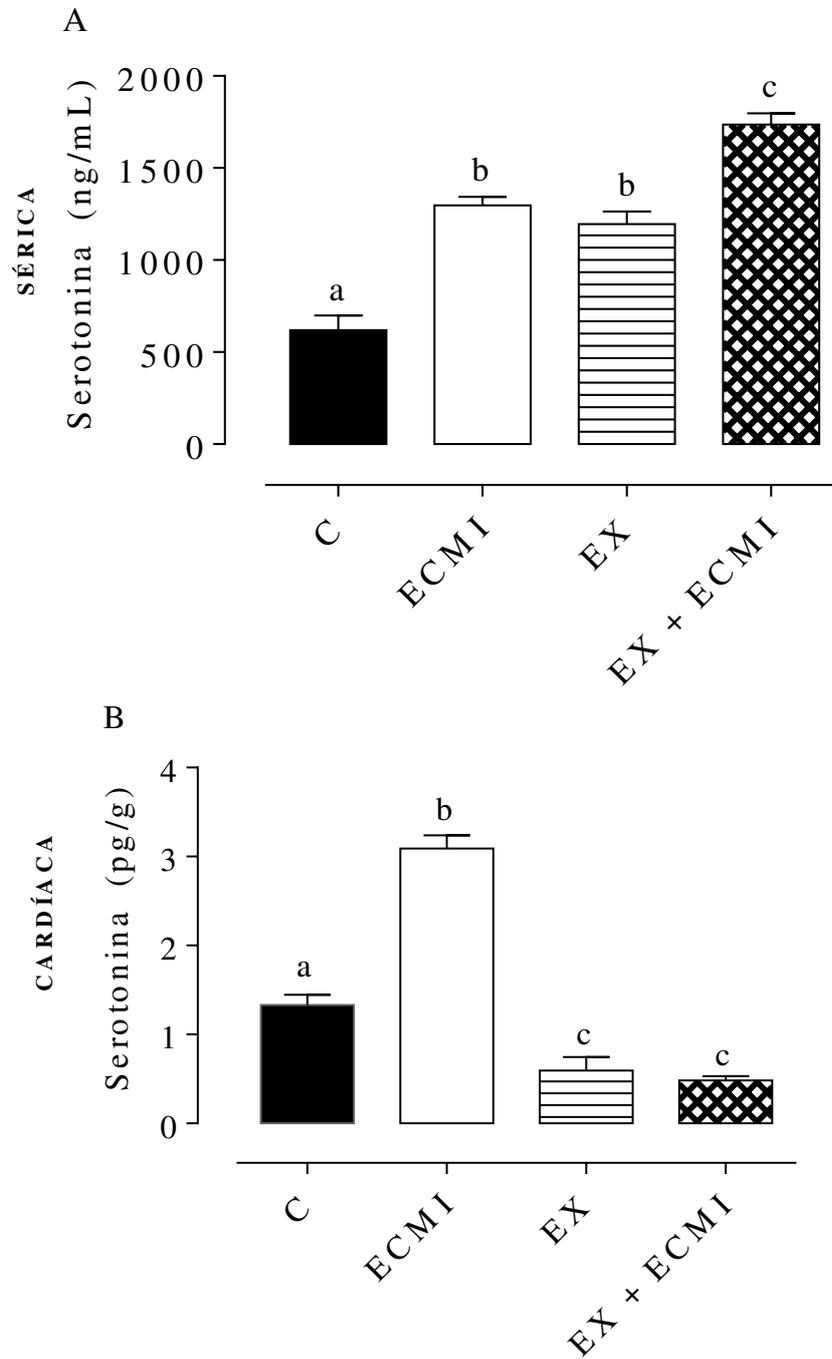
Concentração sérica (mmol/L) de colesterol total (A), HDL (B), LDL (C) e VLDL (D) de ratos controle ou submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI) e/ou ao treinamento físico aeróbico (EX). Os resultados estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão. N = 6-8/grupo. Letras diferentes indicam significância estatística entre os grupos (ANOVA bifatorial seguido de Tukey;  $p < 0,05$ ). C = Controle; ECMI = Estresse Crônico Moderado e Imprevisível; EX = Exercício; EX + ECMI = Exercício + ECMI.

### 5.5 Serotonina

A concentração circulante de serotonina foi maior nos grupos submetidos ao ECMI, e a associação entre estresse e exercício potencializou este aumento ( $p < 0,05$ , Figura 15A). Além disto, observa-se que o estresse aumentou significativamente a concentração cardíaca de serotonina em relação aos demais grupos experimentais (ECMI:  $3,09 \pm 0,15$  pg/g; Figura 15B,  $p < 0,05$ ). Por outro lado, o exercício preveniu o aumento da concentração de serotonina no coração de animais submetidos ao ECMI, não havendo diferença entre os grupos EX + ECMI

( $0,48 \pm 0,05$  pg/g) e EX ( $0,59 \pm 0,15$  pg/g, Figura 15B,  $p > 0,05$ ). Estes grupos tiveram as menores concentrações cardíacas de serotonina, comparados aos grupos ECMI e C ( $1,33 \pm 0,12$  pg/g, Figura 15B,  $p < 0,05$ ).

Figura 15: Concentração sérica e cardíaca de serotonina



Concentração sérica (A; ng/mL) e cardíaca (B; pg/g) de serotonina de ratos controle ou submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI) e/ou ao treinamento físico aeróbio (EX). Os resultados estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão. N = 6-8/grupo. Letras diferentes indicam significância estatística. Letras diferentes indicam significância estatística entre os grupos (ANOVA bifatorial seguido de Tukey;  $p < 0,05$ ). C = Controle; ECMI = Estresse Crônico Moderado e Imprevisível; EX = Exercício; EX + ECMI = Exercício + ECMI.

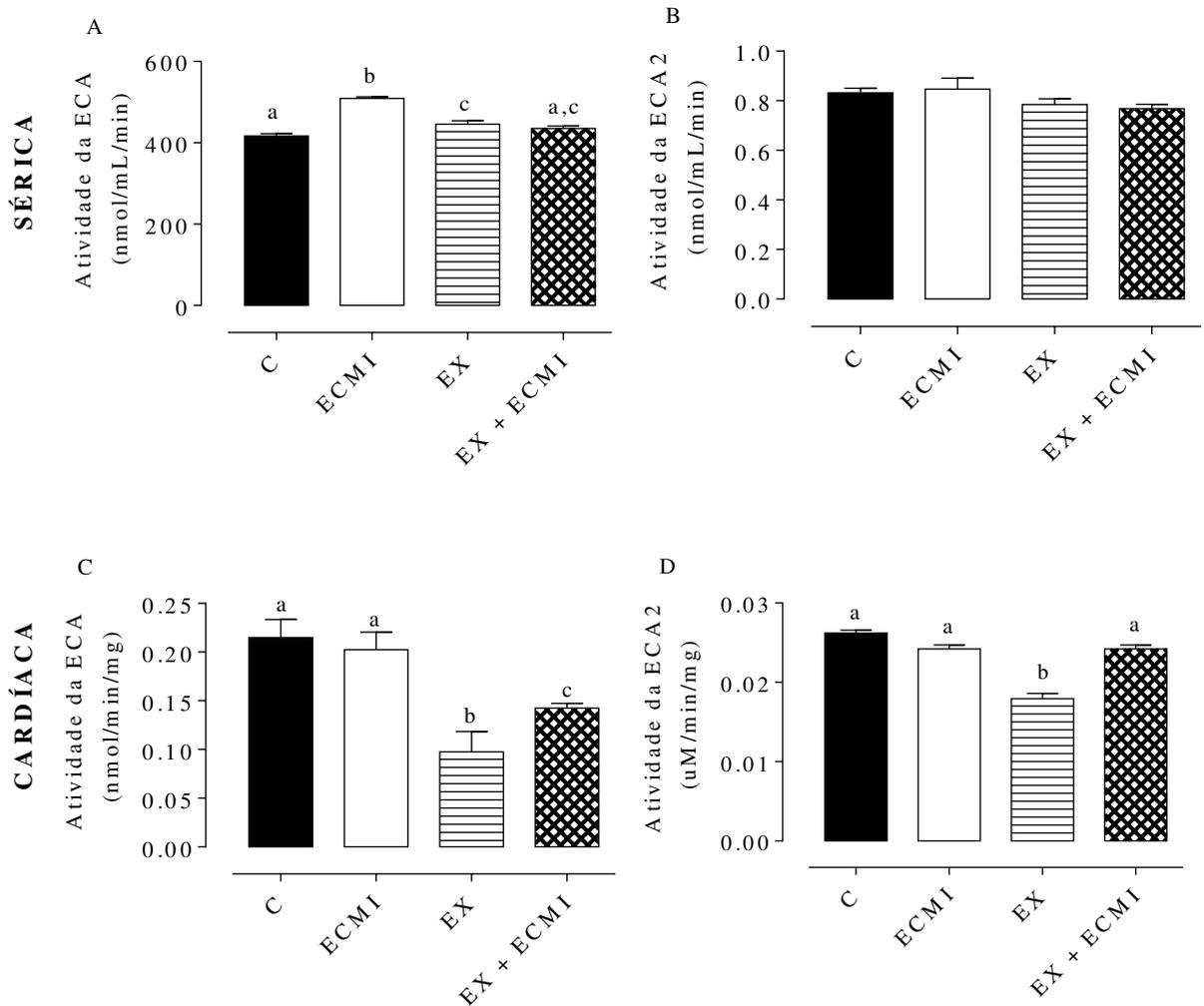
## 5.6 Atividade da ECA e da ECA2

Na figura 16 estão apresentados os dados referentes à atividade da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) e à atividade da Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2) dos grupos controle ou submetidos ao ECMI e/ou ao exercício físico aeróbio em esteira. O ECMI aumentou significativamente a atividade sérica da ECA ( $508,9 \pm 4,0$ ), em relação aos demais grupos (C:  $417,2 \pm 5,2$ ; EX:  $445,9 \pm 8,5$  e EX + ECMI:  $435,4 \pm 5,8$  mmol/mL Figura 16A,  $p < 0,05$ ). No grupo EX, houve aumento da concentração sérica da ECA, em relação ao grupo C. Porém, no grupo EX + ECMI houve redução da atividade de ECA em comparação ao grupo ECMI ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença entre os grupos C e EX + ECMI (Figura 16A,  $p > 0,05$ ).

O treinamento físico reduziu significativamente a atividade da ECA cardíaca (EX:  $0,0975 \pm 0,020$ ) em comparação aos demais grupos (C:  $0,2150 \pm 0,018$ ; ECMI:  $0,2025 \pm 0,017$  e EX + ECMI:  $0,1425 \pm 0,004$  nmol/min/mg Figura 16C,  $p < 0,05$ ). Embora o exercício tenha diminuído a atividade da ECA no coração, houve diferença estatística entre o grupo EX e EX + ECMI (Figura 16C,  $p < 0,05$ ). Este último também diferiu dos grupos C e ECMI (Figura 16C,  $p < 0,05$ ), que por sua vez, não apresentaram diferença entre suas médias (Figura 16C,  $p > 0,05$ ).

Não foi observada diferença na atividade da ECA2 no soro entre os 4 grupos experimentais (Figura 16B,  $p > 0,05$ ). Já a atividade da ECA2 cardíaca foi menor no grupo EX ( $0,018 \pm 0,0007$ ), comparado aos demais grupos (C:  $0,026 \pm 0,0004$ ; ECMI:  $0,0242 \pm 0,0005$ ; EX + ECMI:  $0,0242 \pm 0,0005$   $\mu$ M/min/mg Figura 16D,  $p < 0,05$ ). Não houve diferença entre os grupos C, ECMI e EX + ECMI (Figura 16D  $p > 0,05$ ).

Figura 16. Atividade sérica e cardíaca da ECA e ECA2



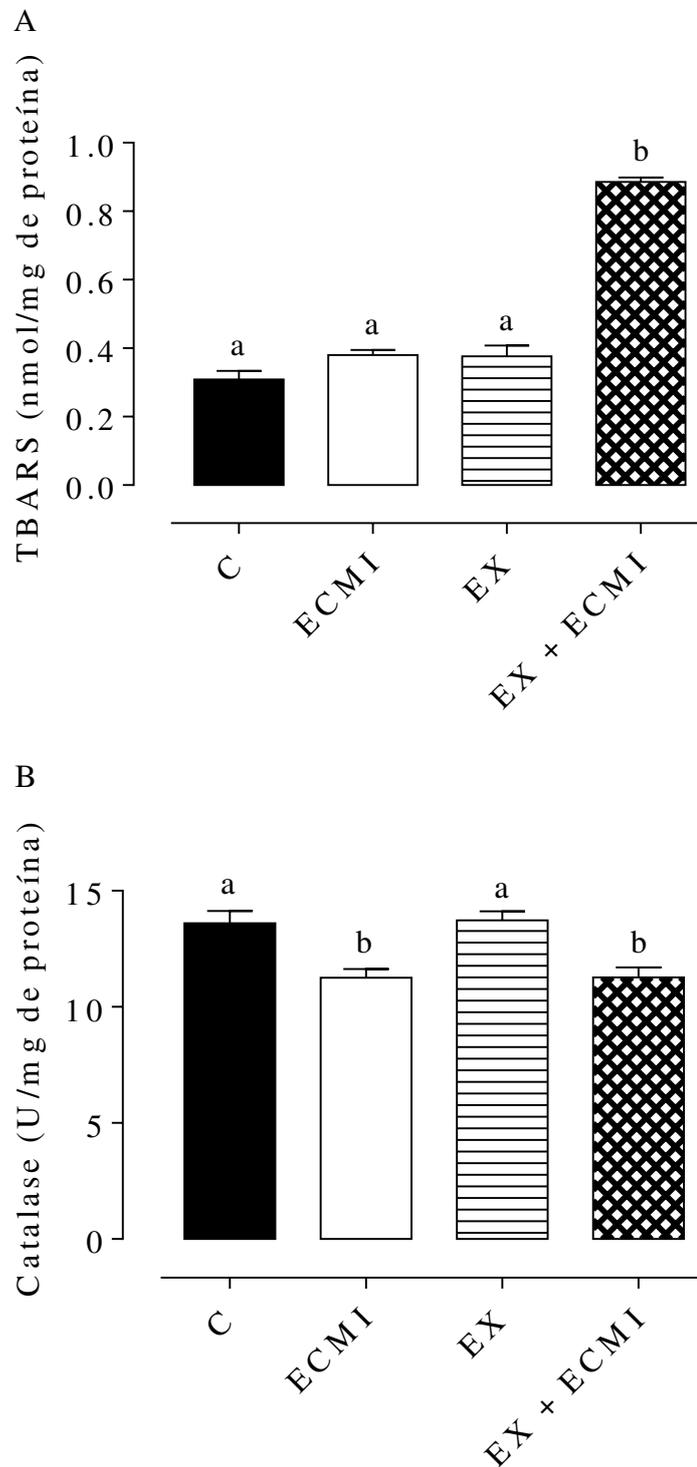
Atividade sérica da enzima conversora de angiotensina (ECA) (A) e da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA 2) (B); Atividade cardíaca da enzima conversora de angiotensina (ECA) (C) e da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) (D) de ratos controle ou submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI) e/ou ao treinamento físico aeróbico (EX). Os resultados estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão. N = 6-8/grupo. Letras diferentes indicam significância estatística entre os grupos (ANOVA bifatorial seguido de Tukey;  $p < 0,05$ ). C = Controle; ECMI = Estresse Crônico Moderado e Imprevisível; EX = Exercício; EX + ECMI = Exercício + ECMI.

### 5.7 Estresse oxidativo

O grupo EX + ECMI ( $0,885 \pm 0,01$ ) apresentou maior concentração cardíaca de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS em comparação aos demais (C:  $0,301 \pm 0,02$ ; ECMI:  $0,380 \pm 0,01$ ; EX:  $0,377 \pm 0,03$  nmol/mg de proteína Figura 17A,  $p < 0,05$ ). Não houve diferença entre os grupos C, ECMI e EX ( $p > 0,05$ ). Com relação a atividade da catalase cardíaca, esta foi significativamente menor nos grupos submetidos ao estresse (ECMI:  $11,2 \pm$

0,4; EX + ECMI:  $11,3 \pm 0,4$ ), comparados aos seus respectivos grupos controle (C:  $13,6 \pm 0,5$  e EX:  $13,7 \pm 0,4$  U/mg de proteína Figura 17B,  $p < 0,05$ ).

Figura 17. Concentração de substâncias reativas ao TBARS e atividade da catalase



Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (A) e atividade de catalase (B) em tecido cardíaco de ratos controle ou submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI) e/ou ao treinamento físico aeróbio (EX). Os resultados estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão. N = 6-8/grupo. Letras diferentes indicam significância estatística entre os grupos (ANOVA bifatorial seguido de Tukey;  $p < 0,05$ ). C = Controle; ECMI = Estresse Crônico Moderado e Imprevisível; EX = Exercício; EX + ECMI = Exercício + ECMI.

## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo foi observado que a prática do exercício físico moderado em esteira demonstrou-se um recurso eficaz para cancelar a hiperinsulinemia, o aumento do índice de resistência à insulina, as concentrações de ácidos graxos e adrenalina circulantes, serotonina cardíaca, bem como o aumento da atividade da ECA sérica e cardíaca, observadas em resposta ao estresse crônico. Porém, os animais treinados e estressados também apresentaram aumento da concentração de corticosterona plasmática e do estresse oxidativo cardíaco. Estes resultados indicam que o exercício regular promove resultados benéficos, mas deve ser prescrito e/ou praticado com cautela por indivíduos acometidos por estresse crônico, considerando que o estresse psicológico desencadeado pelo protocolo de ECMI e também pelo exercício podem desencadear respostas controversas e promover adaptações positivas e negativas ao organismo.

Sabe-se que o exercício, por si só, é considerado um estímulo estressor físico, e por este motivo é capaz de desencadear respostas endócrinas semelhantes às aquelas associadas a outros agentes estressores. De forma geral, os efeitos agudos do exercício incluem o aumento da secreção do hormônio do crescimento, glucagon, testosterona, catecolaminas, hormônio adrenocorticotrófico e corticosterona (Afonso et al., 2003; Ball, 2015), sendo a liberação destes três últimos, também presentes em resposta ao estresse mental agudo e crônico (Tanno e Marcondes, 2002; Gavrilovic et al., 2013). Neste sentido, no presente estudo a eficiência do protocolo de ECMI utilizado foi confirmada pelo aumento nas concentrações sanguíneas de hormônios marcadores do estresse, mesmo após 15 dias da finalização do último estímulo, e pelo menor ganho de peso observados em ratos submetidos ao ECMI (Neves et al., 2009, 2012). Além disto, observamos que em resposta ao exercício físico as concentrações séricas de noradrenalina, adrenalina e dopamina não se elevaram, diferentemente da resposta observada no grupo Exercício + Estresse.

O aumento da concentração plasmática de noradrenalina em ratos treinados regularmente em esteira e estressados cronicamente foi também descrita por Gavrilovic et al. (2013). Estes autores mostraram que ratos Wistar submetidos ao exercício físico de intensidade moderada em esteira por 12 semanas e estressados cronicamente, apresentaram concentração plasmática de noradrenalina superior a do grupo controle. Embora Gavrilovic et al. (2013) não tenham apresentado as dosagens de noradrenalina de um grupo unicamente estressado, estes autores descreveram que a expressão gênica de enzimas relacionadas à síntese de catecolaminas na adrenal não foi alterada no grupo treinado (Gavrilovic et al., 2013), sugerindo importante

participação das terminações nervosas simpáticas na liberação de noradrenalina, em resposta ao exercício.

Sabe-se que as concentrações de catecolaminas e corticosterona aumentadas desencadeiam adaptações cardiovasculares e metabólicas em resposta ao exercício e/ou ao estímulo estressor, como por exemplo, a liberação de substratos energéticos na corrente sanguínea e aumento do cronotropismo e ionotropismo cardíaco (Tanno e Marcondes, 2002; Luecken et al., 2005; Ball et al., 2015). Estas respostas adaptativas são benéficas e fundamentais para a homeostasia do organismo (Tanno e Marcondes, 2002; Bajer et al., 2015). Entretanto, quando há falha nos mecanismos adaptativos, como em situações de estresse crônico em que os estímulos podem ser mantidos por tempo ou intensidade indesejáveis, podem surgir efeitos deletérios como intolerância à glicose, resistência à insulina, dislipidemia, aumento da atividade do SRA e alterações estruturais no miocárdio (Bjorhtorp, 1996; McCowen et al., 2001; Marcondes et al., 2011, Sanches et al., 2012). Além disto, as catecolaminas em excesso, incluindo a dopamina, podem sofrer auto-oxidação e estimular a produção de espécies reativas de oxigênio, gerando substâncias com formas instáveis como a o-quinona, relacionadas positivamente à ocorrência de neurotoxicidade e cardiotoxicidade (Behonick et al., 2001; Andrezza et al., 2006; Bertagnolli et al., 2008). Assim, no presente estudo, a contínua liberação de noradrenalina e corticosterona circulantes no grupo Exercício + Estresse, pode ter ocorrido devido à soma da liberação hormonal estressora em resposta a esses dois estímulos (Moraska et al., 2000).

Embora alguns autores não apontem diferença na concentração de noradrenalina (Gava et al., 1995; Barauna et al., 2005) e corticosterona (Radahmadi et al., 2015) plasmáticas em ratos treinados, é importante mencionar que esta concentração pode variar, dependendo do tipo e intensidade de treino aplicados (Ke et al., 2011). Outro fator importante a ser considerado, é a presença do componente estressor emocional, que pode estar atrelado ao exercício. Seguindo este conceito, Moraska et al. (2000), descreveram que o exercício forçado em esteira, pode desencadear respostas adaptativas positivas e negativas em ratos Sprague-Dawley. Estes autores relatam que após 8 semanas de exercício regular, o ganho de peso corporal diminuiu e a atividade da enzima citrato sintase muscular (importante para a manutenção do metabolismo oxidativo muscular e aumento da capacidade ao esforço) aumentou. No entanto, comparados aos ratos controles, os animais treinados também apresentaram resultados que indicam a possível interferência do estresse durante o treinamento físico forçado, como a hipertrofia da adrenal e diminuição da globulina ligadora de corticosteroide sérica (relacionada positivamente a resistência à insulina) (Moraska et al., 2000).

Já foi demonstrado, tanto em humanos como em modelos animais, que em resposta ao estímulo estressor, pode haver redução ou ganho do peso corporal (Retana-Márquez et al., 2003). Acredita-se que isso ocorra devido à estimulação  $\beta$ -adrenérgica, que favorece a lipólise (Kuo et al., 2008; Ferreira, 2009) ou ao aumento do consumo de alimentos ricos em gorduras e açúcares (Dallman et al., 2005), respectivamente. Como já mencionado, em resposta ao estresse, há um redirecionamento da utilização de substratos energéticos, de forma seletiva, entre órgãos e tecidos que são inibidos ou estimulados (Houshyar et al., 2004; Dallman et al., 2005). Nesse contexto, ocorre mobilização de aminoácidos e ácidos graxos para a gliconeogênese hepática (Dallman et al., 2005). Características do estresse, alterações no consumo alimentar, na secreção do hormônio do crescimento e na atividade da glândula da tireóide também poderiam estar envolvidos no efeito observado sobre o peso corporal (Dallman et al., 2005; Kuo et al., 2008).

Além disto, sabe-se também que o exercício físico pode interferir no metabolismo e no ganho de peso (Moraska et al., 2000), e de fato no presente estudo, os ratos submetidos ao exercício físico regular apresentaram menor ganho de peso, comparados aos ratos sedentários. Li et al. (2015) observaram em ratos obesos, que o exercício inibe o acúmulo de gordura e previne ao ganho de peso corporal, e que este processo pode estar relacionado à *down-regulation* de receptores do tipo Toll (Li et al., 2015). Em humanos, sabe-se que o ganho ou a perda de peso tendem a ocorrer concomitantemente à mudanças no estilo de vida, as quais afetam os hábitos alimentares e/ou o gasto energético, por meio de atividade ou exercício físico (Bajer et al., 2015).

Durante o exercício, a estimulação simpática  $\beta$ -adrenérgica é o principal meio pelo qual mecanismos lipolíticos desencadeiam a perda de peso (Arner, 1990). Além disso, tem sido proposto que o tecido adiposo e o tecido muscular podem exercer função de um órgão endócrino integrado (Pedersen, 2013). Neste contexto, imediatamente ou algumas horas após a realização do exercício, o tecido muscular é capaz de estimular a produção e a liberação de miocinas, como as interleucinas, BDNF, fatores de crescimento endotelial vascular, entre outros (Pedersen, 2013; Bajer et al., 2015). Estes, por sua vez, podem desencadear uma série de respostas autócrinas, parácrinas e endócrinas, conversão do tecido adiposo branco em marrom e equilíbrio de citocinas inflamatórias, resultando em alterações relacionadas ao desempenho físico (Pedersen, 2013; Bajer et al., 2015).

Com o objetivo de prescrever o treinamento físico, bem como avaliar o desempenho físico dos animais e a influência do estresse sobre o mesmo, foram realizados três testes de esforço máximo no presente estudo. Sabe-se que o teste de esforço máximo é adequado para

realizar a mensuração da capacidade física de animais, sendo equivalente ao consumo direto de oxigênio (Rodrigues et al., 2007). No presente estudo, como esperado, observamos que animais treinados durante 8 semanas apresentaram melhora progressiva da capacidade física. Entretanto, esta adaptação benéfica não foi observada no grupo de animais treinado e estressado cronicamente. A queda do desempenho físico observada no grupo Exercício + Estresse sugere que o estresse psicológico crônico, causado pelo ECMI, pode prejudicar o desempenho físico durante a realização do exercício. Essa interferência ainda não está bem estabelecida, mas sabe-se que o exercício forçado (definido como aquele em que o pesquisador determina o tipo de atividade, o tempo, a duração e a intensidade do exercício) pode favorecer condições estressantes em ratos (Moraska et al., 2000) e causar danos ao sistema nervoso central. Como exemplo destes danos, podem ser citados baixos níveis de BDNF no cérebro (importantes para a neurogênese) e piora da memória espacial (Arida et al., 2004; Ke et al., 2011; Jafary et al., 2015). Nesse caso, o estresse psicológico causado pelo exercício forçado, pode também ter desencadeado respostas semelhantes às observadas após a aplicação do protocolo de ECMI, já descritas por nosso grupo de pesquisa (Neves et al., 2009, 2012; Costa, 2014). É importante mencionar que dentre os diferentes modelos de treinamento físico para animais, o exercício em esteira rolante de intensidade moderada é o que desencadeia menor ativação de mecanismos estressores, e portanto optamos pela utilização do mesmo no presente estudo (Contarteze et al., 2008).

Dentre os biomarcadores utilizados para avaliação dos benefícios desencadeados pelo exercício, estão a serotonina. Contrariamente aos achados na literatura, que sugerem uma possível relação entre a concentração de serotonina e a sensação de bem-estar (Struder e Weicker, 2001), em nosso estudo observamos que o ECMI induziu aumento da concentração sérica, que foi maior ainda no grupo Exercício + Estresse, comparado ao Exercício ou ao Estresse, isoladamente. Fisiologicamente, a serotonina (5 – HT) é liberada pelas células enterocromafins, por ativação do sistema nervoso parassimpático, e rapidamente depurada pelo fígado ou pulmões. A serotonina não metabolizada é armazenada em plaquetas, e apenas uma pequena fração permanece livre no plasma (Vesifeld et al., 1976; Lechin et al., 1996; Lechin et al., 2005). A concentração total de serotonina inclui a serotonina plaquetária e a serotonina livre no plasma, e ambas as formas tornam-se disponíveis pela hiperativação do sistema nervoso parassimpático. A ação desse sistema pode ocorrer pela realização regular de exercício (Gupt et al., 2015) e reflete no aumento da liberação de acetilcolina na circulação, a qual tem por característica interferir no armazenamento da serotonina nas plaquetas, facilitando ainda mais sua forma livre no plasma. Por sua vez, o aumento de serotonina na forma livre, por *feedback*

positivo, estimula o sistema nervoso parassimpático, resultando em liberação de acetilcolina e aumento da serotonina plasmática livre. Curiosamente, o aumento circulante de catecolaminas em resposta ao estresse, por ativação do sistema nervoso simpático, também colabora para reduzir a concentração de serotonina plaquetária e aumentar concentração de serotonina livre no plasma, reforçando esse ciclo, ou seja, aumentando ainda mais a concentração de serotonina livre no plasma (Vesifeld et al., 1976; Lechin et al., 1996; Lechin et al., 2005). Assim, a complexa relação entre o sistema nervoso simpático e parassimpático, bem como a interferência de mecanismos serotoninérgicos centrais e periféricos sobre este último, poderiam justificar a elevada concentração de serotonina circulante encontrada nos grupos submetidos ao estresse e/ou ao exercício (Vesifeld et al., 1976; Lechin et al., 1996; Lechin et al., 2005).

Elevados níveis de serotonina circulantes podem estar relacionados ao desenvolvimento de alterações cardiovasculares importantes como a doença arterial coronária (Vikenes et al., 1999). No presente estudo, os animais submetidos ao ECMI apresentaram aumento da concentração cardíaca de serotonina, comparados aos ratos controles. Embora não haja na literatura descrição sobre a relação entre o exercício, o estresse e a concentração de serotonina cardíaca, Bequet et al. (2001) demonstraram que níveis de serotonina cerebral aumentados podem estar relacionados diretamente com a hipoglicemia induzida durante e/ou após o exercício de ratos wistar normoglicêmicos em esteira. Segundo esses autores, os altos níveis de serotonina tecidual (cérebro) podem ser preditores da diminuição da performance física de ratos. Adicionalmente, o uso de inibidor de recaptção de serotonina parece diminuir a capacidade de desempenho físico durante o exercício prolongado em humanos (Wilson e Maghan, 1992). Considerando que tal conceito aplica-se à concentração de serotonina tecidual cerebral, este, corrobora em partes os resultados encontrados no presente estudo. Ratos praticantes de exercício físico, apresentaram concentração de serotonina cardíaca menor que a do grupo Controle e melhores desempenhos durante o 2º e o 3º teste de esforço. Por outro lado, ratos estressados, além de terem apresentado aumento da concentração cardíaca de serotonina e menor rendimento durante os testes de esforço, quando submetidos ao exercício, apresentaram menores concentrações de serotonina cardíaca e menor capacidade física aos últimos dois testes de esforço. Esses resultados sugerem um possível efeito regulatório positivo do exercício físico no coração de ratos estressados, considerando que fisiologicamente, a serotonina é capaz de promover mecanismos regulatórios importantes no tecido cardíaco (Ali et al., 2015).

Das catecolaminas presentes no tecido cardíaco, foi possível quantificar apenas a noradrenalina. Sabe-se que o miocárdio cronicamente exposto a altos níveis de catecolaminas, pode sofrer muitos danos (Brilakis et al., 1999). Os resultados do presente estudo mostraram

que o exercício aumentou significativamente a concentração de noradrenalina cardíaca em comparação aos grupos Controle e Estresse, indicando a possibilidade de mediadores do estresse, em resposta ao exercício, terem participado desta resposta. É sabido que o treinamento físico reduz a modulação simpática do sistema cardiovascular (Pliquett et al., 2003; Bertagnolli et al., 2008). Adicionalmente, a cardiomiopatia induzida por excesso de catecolaminas, pode desencadear uma série de alterações circulantes e teciduais nas concentrações de glicose, glicogênio, ácidos graxos e triglicerídeos de ratos (Kako, 1965; Taam et al., 1986; Adameova et al., 2009).

No presente estudo, não houve diferença entre os valores de glicemia em jejum, em resposta ao estresse ou ao exercício. Contudo, foi o fator estresse que desencadeou as demais alterações na piora do controle glicêmico, observadas nos grupos submetidos ao ECMI. Estes, apresentaram hiperinsulinemia, aumento da área sob a curva em resposta ao teste de tolerância à glicose e aumento do Índice HOMA, resultados semelhantes aos descritos por Neves et al. (2012).

Em resposta ao estresse, elevados níveis de glicose e de ácidos graxos desencadeiam piora nas vias de sinalização insulínica que podem ocasionar, além de resistência à insulina, aumento do estresse oxidativo e disfunção endotelial (Raikonen et al., 1996; Black, 2003). Por outro lado, no atual estudo, o treinamento foi capaz de reverter alguns dos efeitos deletérios induzidos pelo estresse, retornando os valores de insulina semelhantes aos de ratos não estressados.

Já foram descritos alguns dos efeitos benéficos do exercício sobre o controle glicêmico (Pauli et al., 2009; Sertie et al., 2015). Sabe-se que sua prática regular é capaz de aumentar a translocação de transportadores de glicose GLUT4 para a superfície da membrana, favorecendo a captação celular glicêmica (Yang, 2014; Mc Pherron, 2016). Em resposta ao exercício, a translocação pode ocorrer por vias de sinalização dependente de insulina [por receptores de insulina (IR) e seus substratos IR/IRS/PI3-q/Akt– (fosfatidilinositol 3-quinase)] ou independente de insulina [via AMPK (proteína quinase ativada por AMP) ou pelo aumento da atividade da óxido nítrico sintase e a consequente síntese de óxido nítrico] (Robert et al., 1999; Pauli et al., 2009)

A melhora do controle hiperinsulinêmico com a prática de exercício vem sendo estudada ao longo dos anos. Há mais de 3 décadas já foi demonstrado que o exercício moderado pode controlar alguns parâmetros metabólicos em ratos Zucker obesos (Becker-Zimmermann et al., 1982). O rato Zucker obeso é um modelo experimental que desenvolve resistência à insulina, hiperinsulinemia, intolerância à glicose e adiposidade espontaneamente. Estes ratos,

ao realizarem o exercício moderado em esteira por 9 semanas, apresentaram níveis de insulina e área sob a curva reduzidos ao serem comparados aos de ratos controles (Becker-Zimmermann et al., 1982). No presente estudo, apesar dos efeitos positivos, o exercício não foi capaz de reduzir a área sob a curva de ratos submetidos ao ECMI, indicando que outras vias modulatórias, como o próprio SRA, podem estar envolvidas neste processo (Scheen, 2004; Sanches, 2012). Por outro lado, o índice HOMA apresentou uma interação positiva do exercício sobre o estresse, diminuindo o índice de resistência à insulina do grupo Exercício + Estresse significativamente, em relação aos demais grupos estudados.

Durante o gasto calórico, o controle do metabolismo energético é suprido principalmente pelas reservas de glicose e de lipídios presentes no organismo. O tecido muscular é incapaz de sintetizar glicose; portanto, para aumentar sua reserva energética durante a contração muscular, ele depende da captação de glicose circulante obtida pela depleção do armazenamento de glicogênio ou da lipólise proveniente do tecido adiposo (Yang, 2014; Mc Pherron, 2016).

O exercício moderado não foi capaz de cancelar o aumento de triglicerídeos, LDL e VLDL no grupo estressado. Porém, aumentou significativamente a concentração de HDL no grupo treinado, não havendo diferença na concentração de colesterol total entre os grupos. O aumento da síntese de HDL no grupo Exercício pode ter ocorrido pela atenuação de formação de radicais livres por meio da ação de enzimas antioxidantes. Estas, são capazes de inibir a produção de lipoproteínas de baixa densidade – LDL - oxidadas, favorecendo assim, a síntese de lipoproteínas de alta densidade - HDL (Olszewer, 1994).

Já a não diferença nos valores de triglicerídeos, LDL e VLDL pode ter relação com a intensidade do exercício realizada durante o treinamento. Sabe-se que a alta intensidade de exercício parece aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (Sharman et al., 2004), porém, Shen et al. (2015) submeteram ratos Sprague-Dawley alimentados com dieta hiperlipídica ao exercício (em esteira) em duas modalidades: moderada e alta intensidade. Ao final de 10 semanas de exercício, todos os grupos treinados apresentaram triglicerídeos e glicemia reduzidos em relação aos respectivos grupos tratados com dieta hiperlipídica. Contudo, somente o exercício de alta intensidade foi capaz de causar diferença estatística, sugerindo que apenas esta modalidade possa ser capaz de promover melhora do perfil lipídico de ratos Sprague-Dawley tratados com dieta rica em gordura (Shen et al., 2015).

Como já mencionado, embora o exercício possa favorecer o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e aumentar o estresse oxidativo temporariamente (Zanella et al., 2007), é sugerido que sua prática regular promove mecanismos adaptativos cardíacos que

aumentam a capacidade antioxidante deste tecido e conseqüentemente, a capacidade aeróbia durante o exercício (Steinbacher et al., 2015; Csonka et al., 2016). Adicionalmente, estudos evidenciam a possível participação do SRA como mediador das respostas metabólicas e vasculares induzidas pelo exercício. Respostas estas, atribuídas principalmente à ativação do eixo ECA2/Angiotensina 1-7/receptor *Mas* (Petritz et al., 2013), que exercem importantes efeitos vasodilatadores (principalmente por favorecer a produção de óxido nítrico) e antagonistas aos efeitos vasoconstritores do SRA (por atividade do eixo ECA/Angiotensina II/receptor AT1) (Ferreira et al., 2012). Sabe-se que os efeitos vasodilatadores obtidos pelo exercício possuem grande relação com o aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico, e neste sentido, já foi demonstrado que quatro semanas de exercício moderado de natação aumentaram a expressão do receptor *Mas* e da enzima óxido nítrico sintase endotelial no coração de ratos Sprague-Dawley com hipertensão induzida (Shah et al., 2012). Porém, deve-se considerar que independente da ação da ECA ou ECA2, outros componentes do SRA podem estar envolvidos com a ativação do receptor *Mas*. Enzimas como a quimase e a catepsina G podem contribuir para a síntese de Angiotensina II, que subsequentemente pode dar origem à Angiotensina 1-7, por ação da carboxipeptidase P. Neste caso, observa-se a ativação de um eixo vasodilatador do SRA, sem a ação da ECA ou ECA2 (De la Serna, 2014).

No presente estudo, a atividade da ECA sérica foi maior no grupo ECMI em relação aos demais grupos, corroborando com estudo anterior de nosso grupo (Sanches, 2012). O exercício foi capaz de atenuar a atividade da ECA sérica de ratos estressados, sugerindo que sua prática pode regular a atividade desta enzima de forma positiva, como observado por Gomes-Santos et al. (2014) após submeterem ratos com insuficiência cardíaca crônica ao exercício moderado em esteira por 8 semanas. Já a atividade da ECA2 sérica não apresentou diferença entre os grupos estudados.

No tecido cardíaco, a atividade da ECA apresentou-se reduzida no grupo Exercício, comparado aos grupos Controle e Estresse. Apesar de ter havido diferença entre os grupos Exercício e Exercício + Estresse, o treinamento físico mostrou-se eficiente para atenuar o aumento da atividade da ECA tecidual de ratos estressados. Adicionalmente e em paralelo aos diversos estudos que associam a alta atividade da ECA circulante ou tecidual ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e metabólicas (Ribeiro-Oliveira et al., 2008; Zucker et al., 2014), altos níveis de ECA2 são reconhecidos por exercerem papel regulatório sobre o bom funcionamento cardíaco. Crackower et al. (2002) mostraram que a ausência e/ou diminuição da ECA2 em camundongos mutantes ou ratos hipertensos, tende a prejudicar a função cardíaca destes animais. Além disso, estes autores observaram que a inativação genética

da ECA2 em camundongos por recombinação homóloga, resultou em aumento da concentração de angiotensina II, que, segundo eles, pode causar vasoconstrição, hipoperfusão e hipóxia no miocárdio, favorecendo assim, o estresse oxidativo endotelial celular e conseqüentemente, a disfunção cardíaca.

No presente estudo, a atividade da ECA2 cardíaca apresentou-se reduzida no grupo Exercício, em comparação aos demais grupos, o que supostamente prejudicaria o efeito vasodilatador e conseqüentemente, a atividade de enzimas antioxidantes endógenas do tecido cardíaco. No entanto, a atividade da catalase cardíaca, uma importante enzima antioxidante, contraria a possível ativação deste eixo no grupo Exercício. Esta enzima apresentou maior atividade no grupo Exercício e Controle, quando comparados aos grupos estressados, sugerindo que provavelmente vias alternativas (como a quimase/Angiotensina II/CarbP/Angiotensina 1-7/receptor *Mas*) promoveram esta resposta, uma vez que especialmente nos cardiomiócitos a quimase tem grande participação na formação de Angiotensina II (De la Serna, 2014).

Também foi observado que a concentração de TBARS cardíaca do grupo Exercício foi semelhante à dos grupos Controle e Estresse. Porém, no grupo Exercício + Estresse, a concentração de TBARS cardíaca foi aumentada, comparada aos demais grupos. Além disso, independentemente da prática de exercício, os grupos submetidos ao ECMI apresentaram a atividade da catalase diminuída. Estes resultados indicam que o estímulo do estresse, associado ao exercício pode ter prejudicado o balanço oxidante/antioxidante e ter contribuído para o estresse oxidativo cardíaco. Além disso, esses resultados corroboram aqueles encontrados por Marton et al. (2015) no que diz respeito à relação entre o estresse oxidativo e a capacidade aeróbia ao exercício. Embora não tenham submetido os animais ao estresse, estes pesquisadores também observaram uma relação inversamente proporcional entre a alta produção das espécies reativas de oxigênio no tecido cardíaco de ratos (em repouso) e a baixa capacidade de treinamento aeróbio destes animais; resposta esta, semelhante a encontrada no grupo estressado e submetido ao exercício do presente estudo.

Diferentes modalidades de exercício podem causar respostas benéficas aos danos no miocárdio como a cardiotoxicidade desencadeada por diversos fatores, como por exemplo, o uso de alguns medicamentos. Foi demonstrado que tanto o exercício forçado em esteira quanto o exercício voluntário em rodas de correr, aplicados previamente ou durante o uso de um antibiótico indutor de cardiotoxicidade, reduziram o dano oxidativo e aumentaram a atividade mitocondrial no coração de ratos Sprague-Dawley treinados por 12 semanas (5x/semana; 60 min/dia) (Marques-Aleixo et al., 2015). Apesar disso, no presente estudo, o

exercício aeróbio realizado previamente e durante o estresse parece ter piorado o balanço oxidante/antioxidante cardíaco, favorecendo o estresse oxidativo neste tecido.

Sabe-se que o organismo exposto a prolongado período de estresse pode atingir o estágio de exaustão precocemente (Peluso et al., 2005). Embora o exercício moderado seja prescrito para aliviar os sintomas negativos causados pelo estresse, como irritabilidade e sensação de cansaço, estes mesmos sintomas também são percebidos por indivíduos que realizam excesso de treinamento físico, sejam atletas ou não (Rohlfes et al., 2005). Além disso, é sugerido que os sintomas de excesso de treinamento sejam parecidos com os estágios de resistência e exaustão desencadeados pelo estresse crônico (Rohlfes et al., 2005). Como já mencionado ao longo deste trabalho, no presente estudo foi utilizado o exercício de intensidade moderada; entretanto, em razão do possível efeito estressor somatório do exercício e do ECMI, acreditamos que possam ter havido falhas dos mecanismos adaptativos cardíacos, desfavorecendo a ação antioxidante endógena.

Considerando os resultados obtidos, o exercício físico aeróbio, de intensidade moderada, preveniu alguns dos prejuízos cardíacos e metabólicos induzidos pelo ECMI, como a hiperinsulinemia e a dislipidemia, além da alta concentração de serotonina e da ECA em tecido cardíaco. No entanto, o exercício não foi capaz de reduzir as concentrações circulantes de noradrenalina, dopamina e serotonina, além de favorecer o aumento do estresse oxidativo cardíaco induzido pelo ECMI. Assim, algumas respostas parecem ter sido influenciadas pelo estresse mental e/ou físico do exercício e merecem atenção para o melhor entendimento de tais mecanismos fisiológicos e prescrição do exercício para indivíduos submetidos ao estresse crônico.

## 7 CONCLUSÃO

- O exercício físico aeróbio de moderada intensidade proporcionou melhora dos prejuízos sobre o controle glicêmico, lipídico e cardíaco desencadeados pelo estresse crônico.

- Apesar das adaptações positivas, o exercício físico associado ao estresse crônico pode influenciar os sistemas fisiológicos primários de resposta ao estresse e promover adaptações indesejáveis ao organismo.

- As respostas decorrentes da associação entre o estresse e exercício físico parecem ser moduladas pelo SRA e pelo balanço oxidante/antioxidante cardíaco de ratos.

**REFERÊNCIAS\***

Adam T, Schamarek I, Springer EA, Havel PJ, Epel EE. Adiponectin and negative mood in healthy premenopausal and postmenopausal women. *Horm Behav.* 2010; 58(5): 699-704.

Adameova A, Abdellatif Y, Dhalla NS. Role of the excessive amounts of circulating catecholamines and glucocorticoids in stress-induced heart disease. *Can J Physiol Pharmacol.* 2009 Jul;87(7):493-514.

Adams V, Linke A, Kränkel N, Erbs S, Gielen S, Möbius-Winkler S, Gummert JF, Mohr FW, Schuler G, Hambrecht. Impact of regular physical activity on the NAD(P)H oxidase and angiotensin receptor system in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 2005; 111(5):555-62.

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105:121–126.

Afonso M, Souza CN, Zagatto AM, Luciano E. Respostas metabólicas agudas ao exercício físico moderado em ratos wistar. *Motriz.* 2003; 9(2): 87-92.

Ali T, Shaheen F, Mahmud M, Waheed H, Ishtiaq M, Javed Q, Murtaza, I. Serotonin-promoted elevation of ROS levels may lead to cardiac pathologies in diabetic rat. *Archives of Biological Sciences.* 2015; 67(2): 655-661.

Alves MF, Araujo MC, Juliano MA, Oliveira EM, Krieger JE, Casarini DE, et al. A continuous fluorescent assay for the determination of plasma and tissue angiotensin I-converting enzyme activity. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2005; 38: 861-868.

Alves GB, Oliveira EM, Alves CR, Rached HR, Mota GF, Pereira AC, et al. Influence of angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme polymorphisms on cardiac hypertrophy and improvement on maximal aerobic capacity caused by exercise training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2009; 16(4):487-92.

Andreazza AC, Soares DG, Kehl LF, Lima-Borella, ML., Salvador M. Transtornos neuropsiquiátricos e estresse oxidativo. In: Izquierdo, I., Quevedo, J., Kapczinski, F. *Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos.* Artmed: Porto Alegre; 2004. 489-496.

\*De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors – Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Pubmed

Arida RM, Scorza CA, da Silva AV, Scorza FA, Cavalheiro EA. Differential effects of spontaneous versus forced exercise in rats on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation. *Neurosci Lett*. 2004 Jul 8;364(3):135-8.

Arner P. Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19, 471-482, 2005.

Arner P, Kriegholm E, Engfeldt P, Bolinder J. Adrenergic regulation of lipolysis in situ at rest and during exercise. *J Clin Invest*. 1990 Mar;85(3):893-8.

Avanza AC Jr, Mansur AP, Ramires JA. Efficacy of exercise, losartan, enalapril, atenolol and rilmenidine in subjects with blood pressure hyperreactivity at treadmill stress test and left ventricular hypertrophy. *J Hum Hypertens*. 2009; 23(4): 259-66.

Bajer B, Vlcek M, Galusova A, Imrich R, Penesova A. Exercise associated hormonal signals as powerful determinants of an effective fat mass loss. *Endocr Regul*. 2015 Jul;49(3):151-63.

Ball D. Metabolic and endocrine response to exercise: sympathoadrenal integration with skeletal muscle. *J Endocrinol*. 2015 Feb;224(2):R79-95.

Barauna V, Junior M, Costa Rosa L, Casarini D, Krieger J, Oliveira E. Cardiovascular adaptations in rats submitted to a resistance-training model. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005; 32:249–254.

Barauna VG, Magalhaes FC, Krieger JE, Oliveira EM. AT1 receptor participates in the cardiac hypertrophy induced by resistance training in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008; 295(2): 381-7.

Barretti DL, Magalhães Fde C, Fernandes T, do Carmo EC, Rosa KT, Irigoyen MC, Negrão CE, Oliveira EM. Effects of aerobic exercise training on cardiac renin-angiotensin system in an obese Zucker rat strain. *PLoS One*. 2012;7(10):e46114.

Basu R, Krueger PM, Lairson DR, Franzini L. Lifetime medical expenditures among hypertensive men and women in the United States. *Womens Health Issues*. 2011; 21(3):246-53.

Becker-Zimmermann K, Berger M, Berchtold P, Gries FA, Herberg L, Schwenen M. Treadmill training improves intravenous glucose tolerance and insulin sensitivity in fatty Zucker rats. *Diabetologia*. 1982; 22(6):468-74.

Behonick GS, Novak MJ, Nealley EW, Baskin SI. Toxicology update: the cardiotoxicity of the oxidative stress metabolites of catecholamines (aminochromes). *J Appl Toxicol*. 2001 Dec;21 Suppl 1:S15-22.

Bequet F, Gomez-Merino D, Berthelot M, Guezennec CY. Exercise-induced changes in brain glucose and serotonin revealed by microdialysis in rat hippocampus: effect of glucose supplementation. *Acta Physiol Scand*. 2001 Oct;173(2):223-30.

Bertagnolli M, Schenkel PC, Campos C, Mostarda CT, Casarini DE, Belló-Klein A, Irigoyen MC, Rigatto K. Exercise training reduces sympathetic modulation on cardiovascular system and cardiac oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 2008; 21(11):1188-93.

Bjorntorp P. The regulation of adipose tissue distribution in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1996; 20(4): 291-302.

Black PH. The inflammatory response is an integral part of the stress response: Implications for atherosclerosis, insulin resistance, type II diabetes and metabolic syndrome X. *Brain Behav Immun*. 2003; 17(5): 350-64.

Blumenthal JA, Babyak MA, Carney RM, Huber M, Saab PG, Burg MM, et al. Exercise, depression, and mortality after myocardial infarction in the ENRICH trial. *Med Sci Sports Exerc*. 2004;36(5):746-55.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-54.

Braith RW, Welsch MA, Feigenbaum MS, Kluess HA, Pepine CJ. Neuroendocrine activation in heart failure is modified by endurance exercise training. *J Am Coll Cardiol*. 1999; 34(4):1170-5.

Braszko JJ, Wincewicz D, Jakubów P. Candesartan prevents impairment of recall caused by repeated stress in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2012. [Epub ahead of print].

Brilakis ES, Young WF Jr, Wilson JW, Thompson GB, Munger TM. Reversible catecholamine-induced cardiomyopathy in a heart transplant candidate without persistent or paroxysmal hypertension. *J Heart Lung Transplant*. 1999 Apr;18(4):376-80.

Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978; 52: 302–310.

Cambri LT, Vital TM, Teixeira CVL, Jambassi Filho JC, Dalia RA, Luciano E. "Perfil lipídico de ratos com hipertireoidismo induzido: efeitos do exercício físico agudo." *Revista Brasileira de Ciência e Movimento*. 2013; 21 (3):13-20.

Carmack CL, Boudreaux E, Amaral-Melendez M, Brantley PJ, de Moor C. Aerobic fitness and leisure physical activity as moderators of the stress-illness relation. *Ann Behav Med*. 1999;21(3):251-7.

Carvalho MB, Duarte FV, Faria-Silva R, Fauler B, da Mata Machado LT, de Paula RD Evidence for Mas-mediated bradykinin potentiation by the angiotensin-(1-7) nonpeptide mimic AVE 0991 in normotensive rats. *Hypertension*. 2007; 50(4):762-7.

Casarini DE. Sistema Renina-Angiotensina e Calicreína Cinina na hipertensão, obesidade, diabetes, desnutrição e sepse: mecanismos moleculares, celulares e fisiopatológicos. Relatório parcial – Projeto Temático FAPESP, processo 2010/51904-9, maio de 2012.

Caspersen CJ, Powell KE, Christenson GM. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Reports*. 1985; 100(2):126-131.

Castrén E. Is mood chemistry? *Nature reviews Nat Rev Neurosci*. 2005;6(3):241-6.

Cavalheiro EA, Fernandes MJ, Turski L, Naffah-Mazzacoratti MG. Spontaneous recurrent seizures in rats: amino acid and monoamine determination in the hippocampus. *Epilepsia*, 1994. 35(1):1-11.

Chung IM, Kim YM, Yoo MH, Shin MK, Kim CK, Suh SH. Immobilization stress induces endothelial dysfunction by oxidative stress via the activation of the angiotensin II/its type I receptor pathway. *Atherosclerosis*. 2010; 213(1):109-14.

Colucci JA, Yuri Arita D, Sousa Cunha T, Seno Di Marco G, Vio CP, Pacheco-Silva A, Casarini DE. Renin-angiotensin system may trigger kidney damage in NOD mice. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2011;12(1):15-22.

Contarteze RV, Manchado Fde B, Gobatto CA, De Mello MA. Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2008 Nov;151(3):415-22.

Costa R. Efeitos da estimulação tátil em ratos adultos jovens, submetidos ou não ao modelo de estresse crônico [dissertação]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba / Universidade Estadual de Campinas; 2010.

Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 2002; 417:822–8.

Csonka C, Sárközy M, Pipicz M, Dux L, Csont T. Modulation of Hypercholesterolemia-Induced Oxidative/Nitrative Stress in the Heart. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:3863726. doi: 10.1155/2016/3863726. Epub 2015 Dec 14.

Cunha TS. Relação entre diabetes e hipertensão: Um estudo em modelos animais [tese]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba / Universidade Estadual de Campinas; 2007.

Cunha TS, Farah V, Paulini J, Pazzine M, Elased KM, Marcondes FK et al. Relationship between renal and cardiovascular changes in a murine model of glucose intolerance. *Regul Pept.* 2007; 139(1-3):1-4.

Cunha GS, Ribeiro JL, Oliveira AR. [Levels of beta-endorphin in response to exercise and overtraining]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008; 52(4):589-98.

Dallman MF, Pecoraro NC, la Fleur SE. Chronic stress and comfort foods: self-medication and abdominal obesity. *Brain Behav Immun.* 2005;19(4):275-80.

Dantas JA, Ambiel C R, Cuman RKN, Baroni S, Bersani-Amado CA. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. *Acta sci. Health sci,* 2006; 28(2):165-170.

Daubert DL, McCowan M, Erdos B, Scheuer D. Nucleus of the Solitary Tract catecholaminergic neurons modulate the cardiovascular response to psychological stress in rats. *J Physiol*. 2012; 590(19):4881-95.

De la Serna, F. Novedades en el sistema renina-angiotensina. *Insuficiencia cardíaca*. 2014; 9(1), 16-24.

Di Marco GS, Naffah-Mazzacoratti Md Mda G, Vio CP, Dos Santos OF, Schor N, Casarini DE. Mesangial cells are able to produce catecholamines in vitro. *J Cell Biochem*. 2003; 89(1): 144-51.

Diet F, Graf C, Mahnke N, Wassmer G, Predel HG, Palma-Hohmann I et al. ACE and angiotensinogen gene genotypes and left ventricular mass in athletes. *Eur J Clin Invest*. 2001; 31(10): 836-42.

Egami Y, Nishino M, Taniike M, Makino N, Kato H, Shutta R, et al. Renin-angiotensin system blockade is associated with the long-term protection against cardiac remodeling after cardioversion in hypertensive patients with atrial fibrillation. *Tohoku J Exp Med*. 2010; 221(3): 251-5.

Ehninger D, Kempermann G. Regional effects of wheel running and environmental enrichment on cell genesis and microglia proliferation in the adult murine neocortex. *Cereb Cortex*. 2003;13(8):845-51.

Fagard RH, Cornelissen VA. Physical Activity, Exercise, Fitness, and Blood Pressure. In: *Hypertension: Principles and practice*. Battegay EJ, Lip, GYH, Bakris GL Taylor e Francis Group: Boca Raton; 2005. p, 195-206.

Felix JV, Michelini LC. Training-induced pressure fall in spontaneously hypertensive rats is associated with reduced angiotensinogen mRNA expression within the nucleus tractus solitarii. *Hypertension*. 2007; 50(4):780-5.

Feng GG, Yamada M, Wongsawatkul O, Li C, Huang L, An J et al. Role of naofen, a novel WD repeated-containing protein, in reducing nitric-oxide-induced relaxation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008; 35(12): 1447-53.

Fernandes T, Hashimoto NY, Magalhães FC, Fernandes FB, Casarini DE, Carmona AK, et al. Aerobic exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves regulatory MicroRNAs, decreased angiotensin-converting enzyme-

angiotensin II, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7). *Hypertension*. 2011; 58(2):182-9.

Ferreira AJ, Murca TM, Fraga-Silva RA, Castro CH, Raizada MK, Santos RA. New cardiovascular and pulmonary therapeutic strategies based on the Angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/mas receptor axis. *Int J Hypertens*, 2012; 2012: 1-13.

Ferreria R. Efeito do estresse crônico e de dieta hipercalórica sobre o peso corporal e metabolismo de ratos [tese]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba/Universidade Estadual de Campinas; 2009.

Fett CA, Fett WC, Marchini JS. Circuit weight training vs jogging in metabolic risk factors of overweight/obese women. *Arq Bras Cardiol*. 2009;93(5):519-25.

Filho AG, Ferreira AJ, Santos SH, Neves SR, Silva Camargos ER, Becker LK et al. Selective increase of angiotensin(1-7) and its receptor in hearts of spontaneously hypertensive rats subjected to physical training. *Exp Physiol*. 2008;93(5):589-98.

Franco MCP, Casarini DE, Carneiro-Ramos MS, Sawaya AL, Barreto-Chaves MLM, Sesso R. Circulating renin-angiotensin system and catecholamines in childhood: is there a role for birthweight? *Clinical Science*.2008; 114:375-80.

Freitas RR, Lopes KL, Carillo BA, Bergamaschi CT, Carmona AK, Casarini DE, et al. Sympathetic and renins-angiotensin systems contribute to increased blood pressure in sucrose-fed rats. *Am. J. Hypertens*. 2007;20(6):692-8.

Friedland, J. and E. Silverstein, A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme. *Am J Clin Pathol*, 1976; 66(2):416-24.

Garekani ET, Mohebbi H, Kraemer RR, Fathi R. Exercise training intensity/volume affects plasma and tissue adiponectin concentrations in the male rat. *Peptides*. 2011; 32(5):1008-12.

Gava N, Vêras-Silva A, Negrão C, Krieger E. Low-intensity exercise training attenuates cardiac  $\beta$ -adrenergic tone during exercise in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1995; 26(6 Pt 2):1129-1133.

Gavrilovic L, Spasojevic N, Dronjak S. Modulation of catecholamine-synthesizing enzymes in adrenal medulla and stellate ganglia by treadmill exercise of stressed rats. *Eur J Appl Physiol*. 2013; 112(3):1177-1182.

Goldstein DS, Kopin IJ. Evolution of concepts of stress. *Stress*. 2007; 10(2):109-120.

Gomes-Santos IL, Fernandes T, Couto GK, Ferreira-Filho JC, Salemi VM, Fernandes FB, et al. Effects of exercise training on circulating and skeletal muscle renin-angiotensin system in chronic heart failure rats. *PLoS One*. 2014 May 23;9(5):e98012. doi: 10.1371/journal.pone.0098012. eCollection 2014.

Gonçalves AR, Fujihara CK, Mattar AL, Malheiros DM, Noronha Ide L, de Nucci G, Zatz R. Renal expression of COX-2, ANG II, and AT1 receptor in remnant kidney: strong renoprotection by therapy with losartan and a nonsteroidal anti-inflammatory. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004 May; 286(5):F945-54.

Gradman AH. Evolving understanding of the renin-angiotensin-aldosterone system: pathophysiology and targets for therapeutic intervention. *Am Heart J*. 2009 Jun;157(6 Suppl):S1-6.

Greenwood BN, Foley TE, Day HE, Campisi J, Hammack, SH, Campeau S, et al. Freewheel running prevents learned helplessness/behavioral depression: role of dorsal raphe serotonergic neurons. *J Neurosci*. 2003;23(7):2889-98.

Grippo AJ, Johnson AK. Stress, depression and cardiovascular dysregulation: a review of neurobiological mechanisms and the integration of research from preclinical disease models. *Stress*. 2009;12:121.

Gupt AM, Kumar M, Sharma RK, Misra R, Gupt A. Effect of Moderate Aerobic Exercise Training on Autonomic Functions and its Correlation with the Antioxidant Status. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2015; 59(2):162-9.

Hamer M, Malan L, Schutte AE, Huisman HW, van Rooyen JM, Schutte R et al. Plasma renin responses to mental stress and carotid intima-media thickness in black Africans: the SABPA study. *J Hum Hypertens*. 2011; 25(7): 437-43.

Hansen AH, Nielsen JJ, Saltin B, Hellsten Y. Exercise training normalizes skeletal muscle vascular endothelial growth factor levels in patients with essential hypertension. *J Hypertens*. 2010; 28(6): 1176-85.

Harrison-Bernard LM. The renal renin-angiotensin system. *Adv Physiol Educ*. 2009; 33(4): 270-4.

He SB, Tang WG, Tang WJ, Kao XL, Zhang CG, Wong XT. Exercise intervention may prevent depression. *Int J Sports Med*. 2012;33(7):525-30.

Head D, Singh T, Bugg JM. The moderating role of exercise on stress-related effects on the hippocampus and memory in later adulthood. *Neuropsychology*. 2012;26(2):133-43.

Heidenreich PA, Trogdon JG, Khavjou OA, Butler J, Dracup K, Ezekowitz MD et al. Forecasting the future of cardiovascular disease in the United States: a policy statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2011; 123(8): 933-44.

Holley J. Physical activity and mental health: reflections from research and implications for practice. *Ment Health Today*. 2011; s/n :30-3.

Houshyar H, Manalo S, Dallman MF. Time-dependent alterations in mRNA expression of brain neuropeptides regulating energy balance and hypothalamo-pituitary-adrenal activity after withdrawal from intermittent morphine treatment. *J Neurosci*. 2004; 24(42): 9414-24.

Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem*. 1996; 271(18):10697-703.

Irigoyen, Maria Claudia; Lacchini, Silvia; De Angelis, Kátia; Michelini, Lisete Compagno. Fisiopatologia da hipertensão: o que avançamos? *Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo*. 2003; 13(1):20-45.

Jafary L, Reisi P, Naghsh N. Effects of fluoxetine on memory under forced treadmill exercise conditions in male rats. *Adv Biomed Res*. 2015;22;4:235.

Kako K. Biochemical changes of the rat myocardium induced by isoproterenol. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 1965; 43: 541-549.

Kamphuis MH, Geerlings MI, Tijhuis MA, Giampaoli S, Nissinen A, Grobbee DE, et al. Physical inactivity, depression, and risk of cardiovascular mortality. *Med Sci Sports Exerc*. 2007;39(10):1693-9.

Ke Z, Yip SP, Li L, Zheng XX, Tong KY. The effects of voluntary, involuntary, and forced exercises on brain-derived neurotrophic factor and motor function recovery: a rat brain ischemia model. *PLoS One*. 2011 Feb 8;6(2):e16643.

Khoury NM, Marvar PJ, Gillespie CF, Wingo A, Schwartz A, Bradley B, et al. The renin-angiotensin pathway in posttraumatic stress disorder: angiotensin-

converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers are associated with fewer traumatic stress symptoms. *J Clin Psychiatry*. 2012 Jun; 73(6):849-55.

Kishi T, Hirooka Y, Konno S, Sunagawa K. Angiotensin II receptor blockers improve endothelial dysfunction associated with sympathetic hyperactivity in metabolic syndrome. *J Hypertens*. 2012; 30(8):1646-55.

Kleiber AC, Zheng H, Sharma NM, Patel KP. Chronic AT1 receptor blockade normalizes NMDA-mediated changes in renal sympathetic nerve activity and NR1 expression within the PVN in rats with heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010; 298(5):H1546-55.

Krantz DS, Manuck SB. Acute psychophysiologic reactivity and risk of cardiovascular disease: a review and methodologic critique. *Psychol Bull*. 1984; 96(3): 435-64.

Krege JH, Hodgin JB, Hagaman JR, Smithies O. A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. *Hypertension*. 1995; 25(5): 1111-5.

Kudielka BM, Wüst S. Human models in acute and chronic stress: assessing determinants of individual hypothalamus-pituitary-adrenal axis activity and reactivity. *Stress*. 2010; 13(1): 1-14.

Kuo LE, Czarnecka M, Kitlinska JB, Tilan JU, Kvetnanský R, Zukowska Z. Chronic stress, combined with a high-fat/high-sugar diet, shifts sympathetic signaling toward neuropeptide Y and leads to obesity and the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci*. 2008; 1148: 232-7.

Lechin F, Van der Dijs B, Lechin ME. Plasma neurotransmitters and functional illness. *Psychother Psychosom*. 1996;65:293-318.

Lechin, Fuad, Bertha Van der Dijs, and Alex E. Lechin. "Circulating serotonin, catecholamines, and central nervous system circuitry related to some cardiorespiratory, vascular, and hematological disorders." *Journal of applied research in clinical and experimental therapeutics*. 2005;5(4):605-621.

Lee S, Park Y, Dellsperger KC, Zhang C. Exercise training improves endothelial function via adiponectin-dependent and independent pathways in type 2 diabetic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 301(2): H306-14.

Lehnen AM, Leguisamo NM, Pinto GH, Markoski M, De Angelis K, Machado UF, Schaan B. Exercise-stimulated GLUT4 expression is similar in normotensive and hypertensive rats. *Horm Metab Res.* 2011; 43(4):231-5.

Li G, Liu JY, Zhang HX, Li Q, Zhang SW. Exercise training attenuates sympathetic activation and oxidative stress in diet-induced obesity. *Physiol Res.* 2015;64(3):355-67.

Li P, Chappell MC, Ferrario CM, Brosnihan KB. Angiotensin-(1-7) augments bradykinin-induced vasodilation by competing with ACE and releasing nitric oxide. *Hypertension.* 1997; 29(1 Pt 2): 394-400.

Liang Y, Osborne MC, Monia BP, Bhanot S, Watts LM, She P et al. Antisense oligonucleotides targeted against glucocorticoid receptor reduce hepatic glucose production and ameliorate hyperglycemia in diabetic mice. *Metabolism.* 2005; 54(7): 848-55.

Liu SH, Cheng DC, Wang JJ, Lin TH, Chang KM. Evid Based Complement Alternat Med. 2015; Effects of moderate exercise on relieving mental load of elementary school teachers. 2015;2015:192680. doi: 10.1155/2015/192680.

Liu YH, Yang XP, Sharov VG, Nass O, Sabbah HN, Peterson E et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists in rats with heart failure. Role of kinins and angiotensin II type 2 receptors. *J Clin Invest.* 1997; 99(8): 1926-35.

Loures DL, Sant Anna I, Baldotto CS, Sousa EB, Nóbrega AC. Mental stress and cardiovascular system. *Arq Bras Cardiol.* 2002; 78(5): 525-30.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Total protein estimation by Lowry's method. *J. biol. Chem.* 1951; 193: 265.

Luecken LJ, Rodriguez AP, Appelhans BM. Cardiovascular stress responses in young adulthood associated with family-of-origin relationship experiences. *Psychosom Med.* 2005; 67(4): 514-21.

Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 221(2): 286-9.

Marcondes FK. Papel do Sistema Renina-Angiotensina nas alterações vasculares e metabólicas induzidas por estresse crônico e dieta hipercalórica, em ratos". Relatório científico referente à bolsa de Pós-doutorado Sênior do CNPq, 2011 (Processo: 150691/2009-2).

Marcondes FK, Almeida BS, Sanches A, Costa R, Franco MCP, Ponzio BF, Fortes ZB, Moura MJCS, Nogueira MD, Casarini DE. Chronic mild and unpredictable stress decreases nitric oxide in the rat thoracic aorta. *Experimental Biology* 2011, Washington, EUA. *The FASEB Journal*, 25: 643.8, 2011.

Marcondes FK, Neves VJ, Costa R, Sanches A, Cunha TS, Moura MJ, et al. Dyslipidemia induced by stress. In: Prof. Roya Kelishadi (eds). *Dyslipidemia - From prevention to treatment*. Rijeka: Intech; 2012.p. 367-90.

Marques-Aleixo, Santos-Alves, Mariani D, Rizo-Roca D, Padrão AI, Rocha-Rodrigues S, et al. Physical exercise prior and during treatment reduces sub-chronic doxorubicin-induced mitochondrial toxicity and oxidative stress. *Mitochondrion*. 2015; 20:22-33.

Martinez de Morentin PB, López M. "Mens sana in corpore sano": exercise and hypothalamic ER stress. *PLoS Biol*. 2010; 8(8): e1000464.

Marton O, Koltai E, Takeda M, Koch LG, Britton SL, Davies KJ, et al. Mitochondrial biogenesis-associated factors underlie the magnitude of response to aerobic endurance training in rats. *Pflugers Arch*. 2015 Apr;467(4):779-88.

Matsuzawa Y. Adiponectin: Identification, physiology and clinical relevance in metabolic and vascular disease. *Atheroscler Suppl*. 2005; 6(2): 7-14.

McCowen KC, Malhotra L, Bistrian BR. Stress-induced hyperglycemia. *Crit Care Clin*. 2001; 17(1): 107-24.

McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. *Dialogues Clin Neurosci*. 2006; 8(4): 367-81.

McGrady A. The effects of biofeedback in diabetes and essential hypertension. *Cleve Clin J Med*. 2010; 77 Suppl 3: 68-71.

McPherron AC. The ups and downs of exercise and insulin sensitivity: a role for the myokine myostatin in glucose metabolism? *Acta Physiol (Oxf)*. 2016; Jan 11. doi: 10.1111/apha.12650. [Epub ahead of print].

Monteiro R, Azevedo I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators Inflamm*. 2010; pii: 289645.

Moraska A, Deak T, Spencer RL, Roth D, Fleshner M. Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000; 279(4):R1321-9.

Moreau JL. Validation of an animal model of anhedonia, a major symptom of depression. *Encephale*. 1997; 23(4): 280-289.

Moreau JL, Jenck F, Martin JR, Perrin S, Haefely WE. Effects of repeated mild stress and two antidepressant treatments on the behavioral response to 5HT<sub>1C</sub> receptor activation in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 1993; 110(1-2): 140-4.

Moura MJ, Marcondes FK. Influence of estradiol and progesterone on the sensitivity of rat thoracic aorta to noradrenaline. *Life Sci*. 2001; 68(8): 881-8.

Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, Das SR et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2016 Jan 26;133(4): e38-e360.

Negrão CE, Middlekauff HR. Adaptations in autonomic function during exercise training in heart failure. *Heart Fail Rev*. 2008; 13(1):51-60.

Neri M, Cerretani D, Fiaschi AI, Laghi PF, Lazzarini PE, Maffione AB, et al. Correlation between cardiac oxidative stress and myocardial pathology due to acute and chronic norepinephrine administration in rats. *J Cell Mol Med*. 2007 Jan-Feb;11(1):156-70.

Neves VJ, Moura MJCS, Tamascia ML, Ferreira R, Silva NS, Costa R, et al. Proatherosclerotic effects of chronic stress in male rats: Altered phenylephrine sensitivity and nitric oxide synthase activity of aorta and circulating lipids. *Stress*. 2009; 12(4): 320-327.

Neves VJ, Moura MJ, Almeida BS, Costa R, Sanches A, Ferreira R, et al. Chronic stress, but not hypercaloric diet, impairs vascular function in rats. *Stress*. 2012; 15(2): 138-48.

Ni R, Cao T, Xiong S, Ma J, Fan GC, Lacefield JC, et al. Therapeutic inhibition of mitochondrial reactive oxygen species with mito-TEMPO reduces diabetic cardiomyopathy. *Free Radic Biol Med*. 2016; 90:12-23.

Nicolaidis, NC, Kyratzi, E., Lamprokostopoulou, A., Chrousos, GP, Charmandari, E. Stress, the stress system and the role of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation*. 2015; 22(1-2): 6-19.

Nyhuis TJ, Masini CV, Sasse SK, Day HE, Campeau S. Physical activity, but not environmental complexity, facilitates HPA axis response habituation to repeated audiogenic stress despite neurotrophin mRNA regulation in both conditions. *Brain Res*. 2010; 1362: 68-77.

Okame R, Nakahara K, Kato Y, Bannai M, Murakami N. Comparison of amino acid profiles between rats subjected to forced running and voluntary running exercises. *J Vet Med Sci*. 2015; 77(6):661-8.

Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Arita Y, Kumada M, Ohashi K, Sakai N, Shimomura I, Kobayashi H, Terasaka N, Inaba T, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2002; 106(22): 2767-70.

Oliveira EM, Sasaki MS, Cerêncio M, Baraúna VG, Krieger JE. Local renin-angiotensin system regulates left ventricular hypertrophy induced by swimming training independent of circulating renin: a pharmacological study. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2009; 10(1): 15-23.

Olszewer EO. *Perigoso radical livre*. São Paulo: Nova Linha Editorial; 1994 *apud*: Zanella, Aline M., Dorotéia RS Souza, and Moacir F. Godoy. "Influência do exercício físico no perfil lipídico e estresse oxidativo." *Arq Ciênc Saúde*. 2007; 14(2): 107-12.

Parati G, Esler M. The human sympathetic nervous system: its relevance in hypertension and heart failure. *Eur Heart J*. 2012; 33(9):1058-66.

Pauli, José Rodrigo; Cintra, Dennys Esper; Souza, Claudio Teodoro de and Ropelle, Eduardo Rochette. Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2009; 53(4) :399-408.

Pechlivanova DM, Stoynev AG, Tchekalarova JD. The effects of chronic losartan pretreatment on restraint stress-induced changes in motor activity, nociception

and pentylenetetrazol generalized seizures in rats. *Folia Med (Plovdiv)*. 2011 Apr-Jun;53(2):69-73.

Pedersen KB. Muscle as a secretory organ. *Compr Physiol* 2013;3:1337-1362.

Pedersen KB, Sriramula S, Chhabra KH, Xia H, Lazartigues E. Species-specific inhibitor sensitivity of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and its implication for ACE2 activity assays. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011. 301(5):R1293-9.

Peluso MA, Guerra de Andrade LH. Physical activity and mental health: the association between exercise and mood. *Clinics (Sao Paulo)*. 2005;60(1):61-70.

Pereira MG, Ferreira JC, Bueno CR Jr, Mattos KC, Rosa KT, Irigoyen MC, et al. Exercise training reduces cardiac angiotensin II levels and prevents cardiac dysfunction in a genetic model of sympathetic hyperactivity-induced heart failure in mice. *Eur J Appl Physiol*. 2009; 105(6):843-50.

Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol*. 2005;98(4):1154-62.

Petriz Bde A, de Almeida JA, Migliolo L, Franco OL. Pharmacological potential of exercise and RAS vasoactive peptides for prevention of diseases. *Curr Protein Pept Sci*. 2013 Sep;14(6):459-71.

Phillips MI. Functions of angiotensin in the central nervous system. *Annu Rev Physiol*. 1987;49: 413-35.

Piquilloud, Y, A. Reinharz, M. Roth, Studies on the angiotensin converting enzyme with different substrates. *Biochim Biophys Acta*, 1970. 206(1): p. 136-42.

Pliquett R, Cornish K, Patel K, Schultz H, Peuler J, Zucker I. Amelioration of depressed cardiopulmonary reflex control of sympathetic nerve activity by short-term exercise training in male rabbits with heart failure. *J Appl Physiol*. 2003; 95:1883–1888.

Poole L, Hamer M, Wawrzyniak AJ, Steptoe A. The effects of exercise withdrawal on mood and inflammatory cytokine responses in humans. *Stress*. 2011;14(4):439-47.

Rabin B. Stress: A System of the Whole. *Psychoneuroimmunology*. 2007;2:709-22.

Radahmadi M, Alaei H, Sharifi MR, Hosseini N. Effect of forced exercise and exercise withdrawal on memory, serum and hippocampal corticosterone levels in rats. *Exp Brain Res*. 2015 Oct;233(10):2789-99.

Raikkönen K, Keltikangas-Järvinen L, Adlercreutz H, Hautanen A. Psychosocial stress and the insulin resistance syndrome. *Metabolism*. 1996; 45(12): 1533-8.

Retana-Márquez S, Bonilla-Jaime H, Vázquez-Palacios G, Domínguez-Salazar E, Martínez-García R, Velázquez-Moctezuma J. Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2003; 28(2): 207-27.

Ribeiro-Oliveira A, Nogueira AI, Pereira RM, Boas WWV, dos Santos RAS, e Silva ACS. The renin-angiotensin system and diabetes: An update. *Vascular Health and Risk Management*. 2008; 4(4):787-803.

Roberts CK, Barnard RJ, Jasman A, Balon TW. Acute exercise increases nitric oxide synthase activity in skeletal muscle. *Am J physiol Endocrinol Metab*. 1999;277(2 Pt 1):E390-4.

Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda CT, Heeren MV, Irigoyen MC, De Angelis K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol*. 2007 Dec 13;6:38.

Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Adams RJ, Berry JD, Brown TM et al. Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2011; 123 (4): e18-e209.

Rohlf's ICPM, De Mara LS, De Lima WC, De Carvalho T. Relação da síndrome do excesso de treinamento com estresse, fadiga e serotonina. *Rev Bras Med Esporte*. 2005; 11(6):367-372.

Ronchi, FA. Associação das isoformas da enzima conversora de angiotensina I(ECA) a disfunções dos sistemas renal e pancreático no diabetes melito em ratos Wistar e espontaneamente hipertensos (SHR) [tese]. São Paulo: UNIFESP; 2006.

Ronchi FA, Andrade MC, Carmona AK, Krieger JE, Casarini DE. N-domain angiotensin-converting enzyme isoform expression in tissues of Wistar and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2005; 23(10): 1869-78.

Salmon P. Effects of physical exercise on anxiety, depression, and sensitivity to stress: a unifying theory. *Clin Psychol Rev.* 2001;21(1):33-61.

Sanches, A. Participação do sistema renina-angiotensina nos efeitos metabólicos e cardiovasculares induzidos por estresse crônico em ratos [Dissertação]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; 2012.

Sanches A, Peressim LB, Rocha SS. Efeito do exercício físico nas alterações cardiovasculares e metabólicas no diabetes mellitus tipo 2. [Trabalho de conclusão de curso-graduação]. Americana: Faculdade de Americana; 2008.

Santos PC, Krieger JE, Pereira AC. Renin-angiotensin system, hypertension, and chronic kidney disease: pharmacogenetic implications. *J Pharmacol Sci.* 2012; 120(2):77-88.

Scheen AJ. Prevention of type 2 diabetes mellitus through inhibition of the Renin-Angiotensin system. *Drugs.* 2004; 64(22): 2537-2565.

Schnyer RN. Commentary on the Cochrane Review of acupuncture for depression. *Explore (NY).* 2011; 7(3):193-197.

Schnohr P, Kristensen TS, Prescott E, Scharling H. Stress and life dissatisfaction are inversely associated with jogging and other types of physical activity in leisure time--The Copenhagen City Heart Study. *Scand J Med Sci Sports.* 2005; 15(2):107-112.

Scott AM, Atwater I, Rojas E. A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia.* 1981 Nov;21(5):470-5.

Sertie RA, Andreotti S, Proença AR, Campaña AB, Lima FB. Fat gain with physical detraining is correlated with increased glucose transport and oxidation in periepididymal white adipose tissue in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2015; 48(7):650-3.

Shah, A, Oh, Y. B, Lee, S. H, Lim, J. M, Kim, S. H. Angiotensin-(1-7) attenuates hypertension in exercise-trained renal hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012. 302(11): p. H2372-80.

Sharman JE, Geraghty DP, Shing CM, Fraser DI, Coombes JS. Endurance exercise, plasma oxidation and cardiovascular risk. *Acta Cardiol* 2004; 59(6):636-42.

Shen Y, Xu X, Yue K, Xu G. Effect of different exercise protocols on metabolic profiles and fatty acid metabolism in skeletal muscle in high-fat diet-fed rats. *Obesity (Silver Spring)*. 2015; 23(5):1000-6.

Sigwalt AR, Budde H, Helmich I, Glaser V, Ghisoni K, Lanza S, et al. Molecular aspects involved in swimming exercise training reducing anhedonia in a rat model of depression. *Neuroscience*. 2011;192:661-74.

Silva GJ, Brum PC, Negrão CE, Krieger EM. Acute and chronic effects of exercise on baroreflexes in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997; 30(3 Pt 2):714-9.

Silva, KAS. Efeitos do exercício físico prévio sobre a função renal, disfunção autonômica e atividade nervosa simpática renal no diabetes mellitus experimental, em ratos [dissertação]. São Paulo: UNIFESP; 2011.

Sondergaard LG, Stoltenberg M, Doering P, Flyvbjerg A, Rungby J. Zinc ions in the endocrine and exocrine pancreas of zinc deficient rats. *Histol Histopathol*. 2006; 21(6): 619-25.

Spasojevic N, Gavrilovic L, Dronjak S. Regulation of catecholamine-synthesising enzymes and beta-adrenoceptors gene expression in ventricles of stressed rats. *Physiol Res*. 2011;60 Suppl 1:S171-6.

Steinbacher, Peter, and Peter Eckl. "Impact of Oxidative Stress on Exercising Skeletal Muscle." *Biomolecules*. 2015;5(2): 356-377.

Stephens A, Kivimäki M. Stress and cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*. 2012; 9(6):360-70.

Struder HK, Weicker H. Physiology and pathophysiology of the serotonergic system and its implications on mental and physical performance. Part II. *Int J Sports Med*. 2001; 22(7):482-97.

Suchanek O, Podrazil M, Fischerová B, Bočínková H, Budínský V, Stejskal D, Spíšek R, Bartůňková J, Kolář P Intensive physical activity increases peripheral blood dendritic cells. *Cell Immunol*. 2010;266(1):40-5.

Sun MW, Zhong MF, Gu J, Qian FL, Gu JZ, Chen H. Effects of different levels of exercise volume on endothelium-dependent vasodilation: roles of nitric oxide synthase and heme oxygenase. *Hypertens Res*. 2008; 31(4): 805-16.

Taam GM, Takeo S, Ziegelhoffer A, Singal PK, Beamish RE, Dhalla NS. Effect of adrenochrome on adenine nucleotides and mitochondrial oxidative phosphorylation in rat heart. *Can. J. Cardiol.* 1986; 2(2): 88–93.

Tanno AP, Marcondes FK. Estresse, ciclo reprodutivo e sensibilidade cardíaca às catecolaminas. *RBCF.* 2002; 38(3): 273-289.

Teixeira de Lemos E, Pinto R, Oliveira J, Garrido P, Sereno J, Mascarenhas-Melo F, et al. Differential effects of acute (extenuating) and chronic (training) exercise on inflammation and oxidative stress status in an animal model of type 2 diabetes mellitus. *Mediators Inflamm.* 2011; 2011:253061.

Traustadóttir T, Bosch PR, Matt KS. The HPA axis response to stress in women: effects of aging and fitness. *Psychoneuroendocrinology.* 2005;30(4):392-402.

Uresin Y, Erbas B, Ozek M, Ozkök E, Gürol AO. Losartan may prevent the elevation of plasma glucose, corticosterone and catecholamine levels induced by chronic stress. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2004; 5(2): 93-6.

Ursin H, Eriksen HR. The cognitive activation theory of stress. *Psychoneuroendocrinology.* 2004; 29(5): 567-92.

Vahl TP, Ulrich-Lai YM, Ostrander MM, Dolgas CM, Elfers EE, Seeley RJ, et al. 2005. Comparative analysis of ACTH and corticosterone sampling methods in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E823–E828.

Van Berendoncks AM, Beckers P, Hoymans VY, Possemiers N, Wuytss FL, Vrints CJ et al. Exercise training reduces circulating adiponectin levels in patients with chronic heart failure. *Clin Sci (Lond).* 2010; 118(4): 281-9.

Vesifeld IL, Vasiljiev VN, Iljicheva RF. Relationship of catecholamines, histamine and serotonin in men under different kinds of stress. In: Usdin E, Kvetnansky R, Kopin IJ, eds. *Catecholamines and Stress.* Oxford, UK: Pergamon Press; 1976:527-528.

Wan W, Powers AS, Li J, Ji L, Erikson JM, Zhang JQ. Effect of post-myocardial infarction exercise training on the renin-angiotensin-aldosterone system and cardiac function. *Am J Med Sci.* 2007; 334(4):265-73.

Watanabe RL, Andrade IS, Telles MM, Albuquerque KT, Nascimento CM, Oyama LM, et al. Long-term consumption of fish oil-enriched diet impairs serotonin hypophagia in rats. *Cell Mol Neurobiol*. 2010; 30(7):1025-33.

Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*. 2005;52(2): 90-110.

Wilson, WM, Maughan. Evidence for a possible role of 5-hydroxytryptamine in the genesis of fatigue in man: administration of paroxetine, a 5-HT re-uptake inhibitor, reduces the capacity to perform prolonged exercise. *Experimental Physiology*. 1992; 77:921-924.

Yamashita AS, Lira FS, Rosa JC, Paulino EC, Brum PC, Negrão CE, dos Santos RV, Batista ML Jr, do Nascimento CO, Oyama LM, Seelaender M. Depot-specific modulation of adipokine levels in rat adipose tissue by diet-induced obesity: the effect of aerobic training and energy restriction. *Cytokine*. 2010; 52(3):168-74.

Yang J. Enhanced skeletal muscle for effective glucose homeostasis. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2014;121:133-63. doi: 10.1016/B978-0-12-800101-1.00005-3.

Yarrow JF, White LJ, McCoy SC, Borst SE. Training augments resistance exercise induced elevation of circulating brain derived neurotrophic factor (BDNF). *Neurosci Lett*. 2010;479(2):161-5.

Yilmaz MI, Sonmez A, Caglar K, Celik T, Yenicesu M, Eyiletten T, et al. Effect of antihypertensive agents on plasma adiponectin levels in hypertensive patients with metabolic syndrome. *Nephrology (Carlton)*. 2007; 12(2): 147-53.

Yoshida H, Ishikawa T, Suto M, Kurosawa H, Hirowatari Y, Ito K, Yanai H, Tada N, Suzuki M. Effects of supervised aerobic exercise training on serum adiponectin and parameters of lipid and glucose metabolism in subjects with moderate dyslipidemia. *J Atheroscler Thromb*. 2010; 17(11): 1160-6.

Zanella, Aline M, Dorotéia RS Souza, Moacir F. Godoy. "Influência do exercício físico no perfil lipídico e estresse oxidativo." *Arq Ciênc Saúde*. 2007; 14(2): 107-12.

Zucker IH, Schultz HD, Patel KP, Wang W, Gao L. Regulation of central angiotensin type 1 receptors and sympathetic outflow in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 297(5): H1557-66.

## ANEXO 1

 UNICAMP	 CEUA/Unicamp
--	---

---

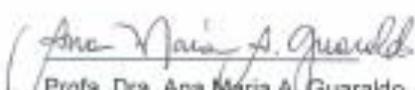
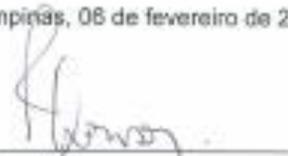
**Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto **"EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO SOBRE AS RESPOSTAS METABÓLICAS E CARDIOVASCULARES INDUZIDAS PELO ESTRESSE CRÔNICO EM RATOS: PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA"** (protocolo nº **2931-1**), sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Tatiana Sousa Cunha / Andrea Sanchez**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **06 de fevereiro de 2013**.

Campinas, 06 de fevereiro de 2013.

 Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo Presidente	 Fátima-Alonso Secretária Executiva
--	---

<p>CEUA/UNICAMP Caixa Postal 6109 13083-970 Campinas, SP - Brasil</p>	<p>Telefone: (19) 3521-6369 E-mail: <a href="mailto:comiso@unicamp.br">comiso@unicamp.br</a> <a href="http://www.unicamp.br/ceua/">http://www.unicamp.br/ceua/</a></p>
---	--