

Bruno do Nascimento Carvalho

**Efeitos do treinamento físico e da ausência de hormônios ovarianos em
modelo murino de aterosclerose (ApoE-KO): repercussões
cardiovasculares e neuroimunes**

São Paulo

2024

Bruno do Nascimento Carvalho

**Efeitos do treinamento físico e da ausência de hormônios ovarianos em
modelo murino de aterosclerose (ApoE-KO): repercussões
cardiovasculares e neuroimunes**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Cardiologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Claudia
Costa Irigoyen

São Paulo

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Nascimento Carvalho, Bruno do

Efeitos do treinamento físico e da ausência de hormônios ovarianos em modelo murino de aterosclerose (ApoE-KO) : repercussões cardiovasculares e neuroimunes / Bruno do Nascimento Carvalho; Maria Claudia Costa Irigoyen, orientador. -- São Paulo, 2024.

Tese (Doutorado) -- Programa de Cardiologia. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2024.

1.Sistema cardiovascular 2.Exercício aeróbico
3.Menopausa 4.Disautonomia 5.Inflamação 6.Estresse oxidativo I.Irigoyen, Maria Claudia Costa, orient. II.Título

USP/FM/DBD-320/24

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

Dedico esta tese a minha mãe **Regina Valéria do Nascimento** e a minha irmã **Bruna do Nascimento Carvalho**, por todo carinho, amor e dedicação durante todos os momentos da minha vida. Vocês possibilitaram o meu desenvolvimento pessoal e profissional, foram fundamentais durante todo o processo formativo e são fundamentais na minha vida!

Dedico esta tese à minha avó **Maria Nilda Silva**, por todo carinho e amor nos momentos que estivemos juntos; sempre guardarei recordações afetuosas sobre o contato que tive com a senhora.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. **Maria Claudia Irigoyen**, pelas riquíssimas orientações, pela disponibilidade, por acreditar no meu potencial e possibilitar a realização da tese em seu laboratório de pesquisa, pelo carinho e todo acolhimento realizado de forma genuína. Sou grato por ter minha orientadora do doutorado como inspiração!

À Profa. Dra. **Iris Callado Sanches**, à Profa. Dra. **Katia Bilhar Scapini**: vocês foram fundamentais para a construção do “Bruno pesquisador”, desde a iniciação científica foi extremamente importante ter a oportunidade de aprender, dialogar e me desenvolver com vocês!

Ao Prof. Dr. **Sergio Catanozi**, por todo auxílio em relação ao modelo utilizado nesta tese; foi de suma importância a sua disponibilidade em discutir ideias sobre um assunto tão específico e importante.

Aos colegas do **Laboratório de hipertensão experimental – USP**, pela amizade, convívio harmonioso e troca de conhecimentos durante o desenvolvimento da tese. Em especial, é necessário citar membros do laboratório que foram vitais durante o desenvolvimento deste trabalho: ao **Maikon Barbosa** e ao **Leandro Ezequiel** pela precisão ao realizar cirurgias, pelo apoio na rotina de laboratório e pela amizade durante os anos de doutoramento; Ao Dr. **Bruno Durante da Silva**, pelo suporte na parte ecocardiográfica; à **Paula Lazara Cruz**, à **Amanda de Almeida Silva**, à **Camila Molina Soares** pela amizade, troca de conhecimentos e conselhos sempre pertinentes.

Aos colegas do **Laboratório do movimento Humano – USJT**, local onde fiz iniciação científica e mestrado, no qual mantenho grandes amizades desde então. Gostaria de citar os amigos: **Adriano dos-Santos**, **Thayna Fabiana Ribeiro**, **Sabrina Leonardo de Carvalho** e **Ney Roberto de Jesus**; aos quais dedico grande carinho, e que auxiliaram durante a realização dos experimentos do doutorado.

À Profa. Dra. **Elia Garcia Caldini**, por possibilitar a realização das análises de colágeno no **Laboratório de Biologia Celular – LIM59 - USP**. Adicionalmente, gostaria de citar os membros deste importante laboratório, que contribuíram ativamente para esta análise: **Sueli Fatima de Bastos, Nilsa Regina Damaceno Rodrigues, Maria Íres Amorim Mendes**: muito obrigado pelo empenho, dedicação e por me receber de forma tão acolhedora.

À Profa. Dra. **Katia de Angelis**, por possibilitar a realização das análises de inflamação e estresse oxidativo no **Laboratório de Fisiologia do Exercício – UNIFESP** e por todas as contribuições na minha formação acadêmica. Aos membros deste importante laboratório, pela troca de conhecimento e por viabilizarem a realização das análises, um agradecimento especial para: **Danielle da Silva Dias e Marina Rascio Henriques Dutra** que deram o direcionamento e participaram ativamente na realização das análises. Ao **Antônio Nascimento, Victor Hugo e Gabriel do Carmo** pelo apoio durante os experimentos; à **Thais de Carvalho Freire**, por ter dado apoio durante os experimentos, pelo carinho e incentivo nos momentos subsequentes da tese.

À **Universidade de São Paulo** e todos os professores, coordenadores e colaboradores que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste projeto!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (**CAPES**), pelo apoio financeiro.

“Às vezes, a vida bate com um tijolo na sua cabeça. Não perca a fé. Estou convencido de que a única coisa que me permitiu seguir adiante foi o meu amor pelo que fazia. Você tem que descobrir o que você ama. Isso é verdadeiro tanto para o seu trabalho quanto para com as pessoas que você ama. Seu trabalho vai preencher uma parte grande da sua vida, e a única maneira de ficar realmente satisfeito é fazer o que você acredita ser um ótimo trabalho. E a única maneira de fazer um excelente trabalho é amar o que você faz. Se você ainda não encontrou o que é, continue procurando.”

Steve Jobs

RESUMO

Nascimento Carvalho B. Efeitos do treinamento físico e da ausência de hormônios ovarianos em modelo murino de aterosclerose (ApoE-KO): repercussões cardiovasculares e neuroimunes [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2024.

As doenças cardiovasculares persistem sendo a principal causa de morte no Brasil, sendo a aterosclerose a principal precursora para a mortalidade cardiovascular. É bem estabelecido que a menopausa provoca repercussões deletérias ao sistema cardiovascular, enquanto o treinamento físico promove benefícios sistêmicos em populações expostas. Desta forma, foi avaliado neste estudo os efeitos do treinamento físico e a influência da privação dos hormônios ovarianos, em parâmetros cardiovasculares, autonômicos, inflamatórios e de estresse oxidativo em um modelo genético de aterosclerose. Para isso, 66 camundongos fêmeas *knockout* para Apolipoproteína-E (ApoE-KO) foram subdivididos em 6 grupos experimentais: Adultos jovens (J); Adultos na meia-idade (MA); Adultos na meia-idade treinados (MAT); Ooforectomizados no 3º mês de vida (OP); Ooforectomizados no 6º mês de vida (O); Ooforectomizados no 6º mês de vida treinados (OT). O grupo jovem foi acompanhado até o 6º mês de vida e os demais grupos até o 15º mês de vida. O treinamento físico foi realizado em intensidade moderada por 6 semanas. Os grupos ooforectomizados foram submetidos a cirurgia de retirada bilateral dos ovários. Após o término do protocolo, foi realizada ecocardiografia para avaliar morfometria e função cardíaca. Foi realizado registro direto da pressão arterial após a realização do procedimento de canulação. Na sequência, a sensibilidade barorreflexa foi avaliada através de drogas vasoativas. A variabilidade da frequência cardíaca, a variabilidade de pressão arterial sistólica e a sensibilidade barorreflexa espontânea foram avaliadas com base no registro de pressão arterial. Foram avaliados mediadores inflamatórios no baço, o percentual de colágeno e o estresse oxidativo foram avaliados no coração. Os grupos foram comparados através de três capítulos: no capítulo 1 foi avaliado os efeitos do treinamento físico em fêmeas ApoE-KO expostas ao processo de envelhecimento. Foi demonstrado que o envelhecimento promoveu disfunção diastólica cardíaca, maior espessura da parede da aorta (aumento de 29%), sobrecarga hemodinâmica (PAM: aumento de 21%; FC: aumento de 24%) e disautonomia, maior perfil inflamatório e

menor defesa antioxidante cardíaca (grupos J vs. MA). Por outro lado, o treinamento físico foi efetivo em mitigar os danos promovidos pelo processo de envelhecimento (grupo MAT). No capítulo 2 foi comparado a influência da privação ovariana (9 vs. 12 meses). Os dois períodos de privação ovariana prejudicaram a morfometria cardíaca e o perfil inflamatório, no entanto, o grupo submetido a um maior período de ausência de hormônios ovarianos apresentou piores desfechos na modulação autonômica cardiovascular (BF/AF: aumento de 104%) e na defesa antioxidante cardíaca. No capítulo 3 avaliou-se os efeitos do treinamento físico aeróbico em fêmeas ApoE-KO ooforectomizadas. O treinamento físico promoveu uma maior sensibilidade barorreflexa, um menor perfil inflamatório (IL-6/IL-10, $p < 0,01$) e um menor dano oxidativo cardíaco (TBARS, $p = 0,01$). Portanto, é possível concluir que: o treinamento físico é efetivo para promover benefícios sistêmicos em camundongos fêmeas expostas ao processo de envelhecimento; a ausência precoce dos hormônios ovarianos induz prejuízos na modulação autonômica cardiovascular e na defesa antioxidante cardíaca; o treinamento físico é capaz de proporcionar benefícios na sensibilidade barorreflexa, reduzir o perfil inflamatório e atenuar o dano oxidativo cardíaco em fêmeas com aterosclerose ooforectomizadas.

Palavras-chave: Sistema cardiovascular. Exercício aeróbico. Menopausa. Disautonomia. Inflamação. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Nascimento Carvalho B. Effects of exercise training and loss of ovarian hormones in a murine model of atherosclerosis (ApoE-KO): cardiovascular and neuroimmune repercussions [thesis]. "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2024.

Cardiovascular diseases remain the leading cause of death in Brazil, with atherosclerosis being the main precursor to cardiovascular mortality. It is well established that menopause causes deleterious repercussions on the cardiovascular system, and exercise training is an efficient strategy to promote systemic benefits in exposed populations. Thus, this study evaluated the effects of physical training and the influence of ovarian hormone deprivation, on cardiovascular, autonomic, inflammatory and oxidative stress parameters in a genetic model of atherosclerosis. For this, 66 Apolipoprotein-E knockout (ApoE-KO) mice were subdivided into 6 experimental groups: Young adults (J); Middle-aged adults (MA); Trained middle-aged adults (MAT); Oophorectomized in the 3rd month of life (OP); Oophorectomized in the 6th month of life (O); Ovariectomized at 6 months of age and trained (OT). The young group was followed up until 6 months of age and the other groups were followed up until 15 months of age. The trained groups underwent moderate-intensity physical training for 6 weeks. The ovariectomized groups underwent bilateral ovarian removal surgery. After the end of the protocol, all groups underwent echocardiography to assess morphometry and cardiac function. Direct blood pressure recording was performed after the cannulation procedure. Next, baroreflex sensitivity was assessed using vasoactive drugs. Heart rate variability, systolic blood pressure variability and spontaneous baroreflex sensitivity were assessed based on blood pressure recording. Inflammatory mediators in the spleen were evaluated. The percentage of cardiac collagen and cardiac oxidative stress were assessed. The experimental groups were compared through three chapters: in chapter 1, the effects of aerobic exercise training in female ApoE-KO mice exposed to the aging process were evaluated. When comparing the J vs. MA groups, it was demonstrated that aging promoted cardiac diastolic dysfunction, greater aortic wall thickness (29% increase), hemodynamic overload (MAP: 21% increase; HR: 24% increase) and dysautonomia, higher inflammatory profile and lower cardiac antioxidant defense. On the other hand, exercise training was effective in mitigating the damage promoted by the aging process (MAT group). In chapter 2, the

influence of ovarian deprivation (9 vs. 12 months) in female ApoE-KO mice was compared. The two periods of ovarian deprivation impaired cardiac morphometry and promoted a greater inflammatory profile; however, the group subjected to a longer period of absence of ovarian hormones presented worse outcomes in cardiovascular autonomic modulation (BF/AF: 104% increase) and cardiac antioxidant defense. In chapter 3, the effects of aerobic exercise training in female ApoE-KO mice subjected to ovarian hormone deprivation were evaluated. In this chapter, it was demonstrated that exercise training may promote greater baroreflex sensitivity, a lower inflammatory profile (IL-6/IL-10, $p < 0.01$) and lower cardiac oxidative damage (TBARS, $p = 0.01$). Therefore, it is possible to conclude that: exercise training is effective in promoting systemic benefits in female mice exposed to the aging process; the absence of ovarian hormones, when it occurs early, induces losses in cardiovascular autonomic modulation and cardiac antioxidant defense; exercise training may provide benefits in baroreflex sensitivity, reducing the inflammatory profile and attenuating cardiac oxidative damage in oophorectomized females with atherosclerosis.

Keywords: Cardiovascular system. Exercise. Menopause. Autonomic nervous system diseases. Inflammation. Oxidative stress.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Aterosclerose e risco cardiovascular.....	14
1.2	Camundongos <i>knockout</i> para Apolipoproteína-E.....	15
1.3	A influência da ausência de hormônios ovarianos e o risco adicional na aterosclerose 17	
1.4	Efeitos do treinamento físico na aterosclerose e na menopausa	20
2	OBJETIVOS.....	23
2.1	Objetivo principal.....	23
2.2	Objetivos específicos	23
3	MÉTODOS	24
3.1	Amostra.....	24
3.2	Desfechos	25
3.3	Procedimentos Experimentais.....	27
3.3.1	Ooforectomia.....	27
3.3.2	Treinamento físico aeróbico	27
3.3.3	Avaliações ecocardiográficas	28
3.3.4	Canulação	29
3.3.5	Registro de pressão arterial.....	30
3.3.6	Avaliação da sensibilidade barorreflexa através de variações hemodinâmicas induzidas por drogas vasoativas.	30
3.3.7	Avaliação da sensibilidade barorreflexa espontânea.....	31
3.3.8	Avaliação da modulação autonômica cardiovascular.....	31
3.3.9	Preparação de Tecidos.....	33
3.3.10	Histologia do Coração	34
3.3.11	Inflamação no baço	35
3.3.12	Estresse oxidativo cardíaco e nitrito plasmático	35
3.3.13	Análise Estatística	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1	Delineamento experimental do capítulo 1.....	38
4.2	Resultados do capítulo 1.....	39
4.3	Discussão do capítulo 1	54
4.4	Considerações finais do capítulo 1.....	63
4.1	Delineamento experimental do capítulo 2.....	64
4.6	Resultados do capítulo 2.....	65
4.7	Discussão do capítulo 2	75
4.8	Considerações finais do capítulo 2.....	80

4.9 Delineamento experimental do capítulo 3.....	81
4.10 Resultados do capítulo 3.....	83
4.11 Discussão do capítulo 3	93
4.12 Considerações finais do capítulo 3.....	97
5 CONCLUSÕES.....	98
REFERÊNCIAS.....	99
ANEXOS.....	112
Aprovação do comitê de ética no uso de animais.....	112

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aterosclerose e risco cardiovascular

As doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade a nível mundial ^{1,2}. Segundo levantamento da *American Heart Association*, 43.2% das mortes por doenças cardiovasculares são atribuídas a doença arterial coronariana e 3 % a doenças em outras artérias ³. No Brasil, a aterosclerose é a principal responsável pelo desenvolvimento de eventos cardíacos ². Pacientes que desenvolvem esta doença são classificados como de alto risco, pois a possibilidade de ocorrência do primeiro ou de um novo evento cardíaco dentro de 10 anos após o diagnóstico, é superior a 20% ⁴.

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão ao endotélio vascular, impactando as ações de artérias de médio e grande calibre ⁵. As lesões ateroscleróticas podem ser originadas por fatores genéticos no início na vida intrauterina ⁵. O processo de desenvolvimento associado a fatores modificáveis (como o tabagismo, padrão alimentar ou sedentarismo) favorece a progressão da doença ^{2,5,6}. Além disso, disfunções como a dislipidemia, diabetes e hipertensão arterial apresentam potencial de influenciar a progressão da doença aterosclerótica através de impactos causados no endotélio vascular ^{2,5,6}.

A doença aterosclerótica é induzida pelo excesso de moléculas de colesterol na corrente sanguínea (hipercolesterolemia) ⁷. A origem do processo de aterogênese ocorre através do transporte de moléculas de colesterol por meio de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c) nas barreiras endoteliais de vasos de médio e grande calibre ⁷. Entre a camada íntima e a camada média arterial as moléculas de LDL-c são oxidadas, ocorrendo uma resposta de quimiotaxia a monócitos, que, em um segundo momento, resulta na formação de células espumosas preenchidas por lipídeos ⁸. A

progressão da doença e a formação de placas de ateroma ocorrem através da formação sustentada de células espumosas associadas a uma ação ineficiente de eferecitose na camada íntima arterial ⁸.

As placas de ateroma são ricas em lipídios e possuem uma capa fibrosa fina que apresenta capacidade de rompimento, causando trombose de vasos previamente estreitados pelo processo aterosclerótico ⁹. Essa disfunção apresenta potencial de induzir hipertensão arterial renovascular (estenose na artéria renal e ou de uma de suas ramificações), promovendo isquemia do tecido renal ⁴. A obstrução de transporte sanguíneo induzido pelas placas de ateroma nas artérias pode provocar diretamente eventos cardiovasculares, como o infarto agudo do miocárdio ou o acidente vascular cerebral isquêmico ⁶.

1.2 Camundongos *knockout* para Apolipoproteína-E

Atualmente há uma grande utilização de camundongos em pesquisas de experimentação animal (59% dos estudos) ¹⁰, uma vez que esses animais possuem grande potencial transgênico de interesse para o preenchimento de lacunas da literatura, possibilitando a investigação de aspectos que não seriam possíveis em seres humanos ¹⁰. Experimentalmente, os modelos murinos adotados para compreensão das adaptações relacionadas à aterosclerose são os camundongos *knockout* para Apolipoproteína E (ApoE-KO) e camundongos *knockout* para o receptor LDL (LDLr-Ko), pois ambos desenvolvem hipercolesterolemia ao longo do tempo ⁹.

A Apolipoproteína E é um constituinte das lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL), é sintetizada no fígado, possui alta afinidade com os receptores de LDL, sendo importante na captura das lipoproteínas na corrente sanguínea ¹¹. O modelo ApoE-KO foi desenvolvido na década de 90 como o primeiro modelo murino de aterosclerose, através de recombinação homóloga com inativação do gene ApoE ¹². Com aproximadamente 10

semanas de vida, pequenas lesões ateroscleróticas são identificadas nestes animais ⁶. Os animais ApoE-KO possuem baixa capacidade de degradação das lipoproteínas, e por consequência, possuem partículas não-HDL mais densas no fluxo sanguíneo que favorecem o desenvolvimento de aterosclerose, sendo um modelo estabelecido para a compreensão de modificações orgânicas provocadas pela doença aterosclerótica ^{9,13}.

Vale mencionar, que os camundongos ApoE-KO são utilizados na literatura para a compreensão de outras disfunções. Enquanto modelo de dislipidemia, caracteriza-se pelas grandes adaptações induzidas no perfil lipídico pela depleção do gene da Apolipoproteína E ^{7,14}. Enquanto modelo experimental da Doença de Alzheimer, pela produção modificada do peptídeo beta-amiloide (indicador da Doença de Alzheimer) em animais ApoE-KO ¹⁵. No entanto, este projeto utiliza somente camundongos na vida adulta (todos os grupos experimentais apresentam de 6 a 15 meses de vida) com placas ateroscleróticas estabelecidas, sendo um modelo robusto para investigação de aterosclerose.

Tendo em vista a ausência de evidências sobre os aspectos hemodinâmicos e autonômicos em camundongos ApoE-KO e o grande risco cardiovascular em indivíduos com aterosclerose, o enfoque do projeto é investigar o equilíbrio hemodinâmico e a contribuição do sistema nervoso autonômico nestes animais, frente a influência da privação dos hormônios ovarianos (que é reconhecidamente um fator de risco). Adicionalmente, pretende-se observar os efeitos do treinamento físico aeróbico nessas condições, tendo em vista que essa é reconhecidamente uma conduta não-farmacológica que promove benefícios sistêmicos a populações expostas a diferentes fatores de risco.

1.3 A influência da ausência de hormônios ovarianos e o risco adicional na aterosclerose

A menopausa é um evento natural que ocorre com o processo de envelhecimento, sendo caracterizada pela última menstruação da mulher, com cessação permanente da produção dos hormônios ovarianos ^{16,17}. Cabe ainda ressaltar algumas adaptações que ocorrem no organismo da mulher nesta fase na vida, como: prejuízos nas funções endoteliais, aumento dos agentes oxidantes e maior ativação do sistema renina-angiotensina ¹⁸. Essas alterações evidenciam a maior suscetibilidade desta população feminina a uma série de disfunções orgânicas ¹⁹.

Quando comparadas aos homens, as mulheres apresentam menor prevalência de hipertensão arterial ⁷. Contudo, após o climatério, esta prevalência de hipertensão se torna semelhante entre os sexos ^{20,21}. De fato, a privação ovariana é capaz de ampliar a vulnerabilidade das mulheres à uma série de prejuízos cardiovasculares, como maior rigidez arterial, aumento pressão arterial, prejuízos na função miocárdica, prejuízos autonômicos e menor sensibilidade barorreflexa ²²⁻²⁵. Dessa forma, sugere-se que os hormônios ovarianos dispõem de efeitos cardioprotetores sobre essas adaptações.

O curso temporal do desenvolvimento da aterosclerose em indivíduos jovens, em artérias de diferentes calibres (aorta abdominal, aorta torácica e artéria coronariana direita) é semelhante independentemente da raça e do sexo ²⁶. Entretanto, os prejuízos decorrentes da doença arterial coronariana são potencializados pela privação ovariana, com aumento de 3 a 7 vezes no desenvolvimento de aterosclerose na pós-menopausa, sendo a maior causa de morte nessa população ⁵. De fato, nessa fase da vida as mulheres possuem um perfil pró-aterogênico em decorrência de aumento de colesterol total, LDL-c, homocisteína, PCR-us e IL-6 e à redução do HDL-c ^{5,27-29}, além de modificações na

composição corporal, como: ganho ponderal, aumento do índice de massa corporal (IMC), aumento da adiposidade total e abdominal, e redução da massa muscular³⁰.

Experimentalmente a utilização da ooforectomia para mimetizar os efeitos causados pela menopausa é comum^{31,32}. A partir deste procedimento é possível verificar aumento nos valores de pressão arterial, desenvolvimento de rigidez arterial e redução na sensibilidade barorreflexa^{24,33}. Adicionalmente, a privação ovariana também contribui para o aumento da modulação simpática vascular e desbalanço simpátovagal, resultando em aumento dos valores pressóricos e maiores riscos cardiovasculares³⁴. Vale mencionar sobre a relação entre a estimulação colinérgica e a produção de citocinas anti-inflamatórias, que sugere que alterações autonômicas poderiam ocasionar desequilíbrio no perfil inflamatório³⁵.

Outra questão a considerar, é a associação da menopausa com um estado inflamatório sistêmico de baixo grau, manifestado por aumento dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1, IL-6 ou TNF- α ^{36,37}. Os processos inflamatórios contribuem para o desenvolvimento da aterosclerose e estimulam os mecanismos de rompimento das placas ateroscleróticas^{38,39}. De fato, existem indicadores de que o aumento dos valores circulantes de mediadores inflamatórios está associado ao prognóstico de complicações relacionadas à doença aterosclerótica³⁹.

O estresse oxidativo se caracteriza pelo desbalanço entre o excesso de espécies reativas de oxigênio e os mecanismos de defesa antioxidante⁴⁰. A ausência de hormônios ovarianos promove o estresse oxidativo cardíaco em ratas controle⁴¹, gerando redução de defesa antioxidante (catalase) e aumento de dano cardíaco (lipoperoxidação da membrana lipídica - TBARS). Os processos inflamatórios e o estresse oxidativo são mecanismos que agem de forma interrelacionada, gerando um ciclo de retroalimentação que promove

o avanço das placas ateroscleróticas e a degradação da matriz extracelular⁴⁰. Desta forma, é importante investigar a contribuição destes importantes mecanismos em desfechos cardiovasculares na aterosclerose.

Apesar da ooforectomia ser uma estratégia bem aceita na literatura científica para mimetizar as adaptações induzidas pela menopausa^{31,32,42}, este procedimento ainda foi pouco explorado em animais ApoE-KO considerando desfechos cardiovasculares e autonômicos. Desta forma, este estudo investigará as modificações promovidas pelo processo de envelhecimento em murinos, baseando-se na relação demonstrada em estudos anteriores na idade de humanos com a idade dos camundongos^{10,43}.

Nesse sentido, é importante ressaltar que, os animais atingem a maturidade (vida adulta) entre o 3º e o 6º mês de vida⁴³. Entre 10 e 15 meses de vida, não são detectáveis biomarcadores de envelhecimento em camundongos, no entanto, até os 15 meses de vida se encerram-se as funções reprodutivas em murinos (menopausa espontânea)^{10,43}. O período de senescência em camundongos compreende entre 18 e 24 meses, sendo que o risco de mortalidade nestes animais é associado do processo de envelhecimento, portanto, esta ameaça pode ser aumentada com associação de outros fatores de risco⁴³.

Desta forma, é importante compreender os efeitos do envelhecimento, bem como os impactos da privação ovariana induzida cirurgicamente no risco cardiovascular atribuído pela aterosclerose, bem como os mecanismos que induzem estas adaptações em camundongos fêmeas ApoE-KO. Ademais, cabe salientar a escassez de evidências acerca do controle autonômico cardiovascular neste modelo em fêmeas, independentemente do processo da privação ovariana.

1.4 Efeitos do treinamento físico na aterosclerose e na menopausa

O exercício físico promove benefícios cardiovasculares, metabólicos e autonômicos que têm influenciado pesquisadores a considerá-lo como uma conduta não-farmacológica importante no tratamento de diferentes disfunções cardiometabólicas^{7,17}. Em contrapartida, o sedentarismo corrobora para o excesso de peso, aumento da adiposidade central e para o desenvolvimento de doenças metabólicas, duplicando o risco do desenvolvimento de doença arterial coronariana^{17,44}.

O treinamento físico possui a capacidade de promover melhorias relacionadas à modulação autonômica cardiovascular e à indução de efeitos vasodilatadores sobre a musculatura lisa da parede arterial. Estas adaptações, contribuem para manter os valores da pressão arterial em pacientes normotensos e reduzir os valores de sujeitos hipertensos⁵. Há indícios de que o treinamento físico promove benefícios na função endotelial, que estão associados à redução do estresse oxidativo provocando melhorias na sensibilidade barorreflexa em ratos Wistars⁴⁵. Além disso, o treinamento físico aeróbio em modelo experimental de menopausa (ratas após 8 semanas de privação ovariana) promoveu redução ponderal, bradicardia de repouso, melhora na sensibilidade barorreflexa e normalização dos valores de pressão arterial (estavam elevados vs. controle, decorrentes da privação ovariana)⁴⁶.

A aterosclerose se desenvolve com o desequilíbrio no perfil lipídico associado a desbalanço no perfil inflamatório e, nesse contexto, é importante a implementação de estratégias para promoção de um reequilíbrio orgânico, que poderá proporcionar estabilização das placas ateroscleróticas e do conteúdo lipídico, já existente entre as diferentes camadas dos vasos sanguíneos⁸. O treinamento físico aeróbico em intensidade moderada (60-80% do VO₂ máximo), com um protocolo de grande duração (15/16

semanas) é eficaz em promover redução da progressão de aterosclerose associado a benefícios na função endotelial, estresse oxidativo e perfil inflamatório ⁴⁷.

Além disso, há evidências que o treinamento físico executado regularmente (5 vezes por semana) ou ocasionalmente (1 ou 2 vezes por semanas) em intensidade moderada por 8 semanas, é capaz de evitar a progressão da aterosclerose e estabilizar as placas ateroscleróticas em modelo experimental ApoE-KO ⁴⁸. Outro estudo que realizou treinamento físico por 6 semanas com frequência de 5 dias em intensidade moderada, demonstrou que a eficácia em relação a estabilização da doença é independente de modificações no perfil lipídico ¹³.

Apesar das evidências científicas robustas acerca dos benefícios sistêmicos induzidos pelo treinamento físico aeróbico no controle da progressão da aterosclerose em animais ApoE-KO e dos benefícios do treinamento físico aeróbico no sistema cardiovascular em diferentes modelos experimentais de menopausa, ainda não há evidências conclusivas em relação aos efeitos cardioprotetores do treinamento físico no controle hemodinâmico, na modulação autonômica cardiovascular e na sensibilidade barorreflexa em animais fêmeas ApoE-KO .

Desta forma, este projeto também visa investigar o papel do treinamento físico no risco cardiovascular e no controle autonômico cardiovascular em animais com aterosclerose expostas ao processo de envelhecimento. E em segundo momento, investigar os efeitos protetores do treinamento físico na associação da aterosclerose com a privação ovariana induzida cirurgicamente. Diante do conteúdo exposto acima, o presente projeto dispõe de três hipóteses de pesquisa:

1. O treinamento físico por meio de seus benefícios sistêmicos é capaz de promover benefícios cardiovasculares, melhorar o controle autonômico cardiovascular, atenuar a inflamação e o estresse oxidativo em camundongos fêmeas com aterosclerose expostas ao envelhecimento; 2. A ausência dos hormônios ovarianos realizada cirurgicamente (privação ovariana), potencializa os prejuízos sistêmicos induzidos pela aterosclerose; 3. O treinamento físico é capaz de reduzir os prejuízos cardiovasculares fomentados pela privação ovariana em camundongos fêmeas com aterosclerose.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Avaliar os efeitos do treinamento físico aeróbico, bem como a influência da privação dos hormônios ovarianos, em parâmetros cardiovasculares, autonômicos, inflamatórios e de estresse oxidativo em um modelo genético de aterosclerose (ApoE-KO).

2.2 Objetivos específicos

➤ Avaliar os efeitos do treinamento físico aeróbico em desfechos cardiovasculares, autonômicos, inflamatórios e de estresse oxidativo em camundongos fêmeas ApoE-KO expostas ao processo de envelhecimento.

➤ Comparar a influência da privação ovariana (9 vs. 12 meses) em desfechos cardiovasculares, autonômicos, inflamatórios e de estresse oxidativo em camundongos fêmeas ApoE-KO.

➤ Avaliar os efeitos do treinamento físico aeróbico em desfechos cardiovasculares, autonômicos, inflamatórios e de estresse oxidativo em camundongos fêmeas ApoE-KO submetidas a privação ovariana dos hormônios ovarianos.

3 MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão Científica do InCor e do Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pelo parecer 1297/2019 (Anexo 1).

3.1 Amostra

Foram utilizados 66 camundongos fêmeas Knockout para a Apolipoproteína-E (ApoE-KO) (n=11 por grupo). Os animais foram provenientes do Laboratório de Lípidos (LIM-10) do Hospital das Clínicas HCFMUSP, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos no Biotério da Divisão Experimental do InCor, em caixas plásticas com no máximo 5 animais por gaiola, em ambiente com temperatura controlada (22° - 24°C) e com luz controlada, em ciclo de 12 horas (claro/escuro) e alimentados com água e ração padrão “ad libitum”.

Os animais foram subdivididos igualmente em 6 grupos experimentais:

- Grupo adultas Jovens (J), camundongos fêmeas ApoE-KO com 6 meses de vida;
- Grupo adultas na meia-idade (MA), camundongos fêmeas ApoE-KO com 15 meses de vida;
- Grupo adultas na meia-idade treinadas (MAT), camundongos fêmeas ApoE-KO com 15 meses de vida, submetidas ao treinamento físico aeróbico nas últimas 6 semanas de protocolo;
- Grupo ooforectomizadas (O), camundongos fêmeas ApoE-KO com 15 meses de vida ooforectomizadas no 6º mês de vida;

- Grupo ooforectomizadas treinadas (OT), camundongos fêmeas ApoE-KO com 15 meses de vida ooforectomizadas no 6º mês de vida, submetidas ao treinamento físico aeróbico nas últimas 6 semanas de protocolo;
- Grupo ooforectomizadas (OP), camundongos fêmeas ApoE-KO com 15 meses de vida ooforectomizadas no 3º mês de vida;

Para atender os três objetivos específicos os 6 grupos experimentais foram comparados em 3 capítulos conforme está descrito na seção resultados e discussão.

3.2 Desfechos

Foram avaliados os seguintes desfechos:

- Avaliação das modificações na capacidade física (capacidade máxima de corrida);
- Verificação de adaptações na morfometria e função cardíaca (por ecocardiografia): massa do ventrículo esquerdo, septo intraventricular diastólico, diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo, espessura da parede do ventrículo esquerdo, diâmetro do átrio esquerdo, débito cardíaco, tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), volume sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo, relações entre ondas E', A', E, A;
- Verificação das modificações na espessura da aorta (marcador da progressão de aterosclerose);
- Avaliação das modificações em variáveis hemodinâmicas: pressão arterial sistólica (PAS) diastólica (PAD) e média (PAM), e frequência cardíaca (FC);

- Avaliação de modulação autonômica cardiovascular (variabilidade da frequência cardíaca e variabilidade da pressão arterial sistólica, no domínio do tempo e da frequência);
- Avaliação da sensibilidade barorreflexa espontânea (índice alfa e método da sequência)); avaliação da capacidade adaptativa dos barorreceptores após uso de drogas vasoativas (resposta bradicárdica reflexa e resposta taquicárdica reflexa);
- Avaliação de colágeno cardíaco
- Avaliação de mediadores inflamatórios no baço: citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6) e anti-inflamatória (IL-10);
- Avaliação do estresse oxidativo cardíaco: enzimas antioxidantes, pró-oxidantes e dano oxidativo;

3.3 Procedimentos Experimentais

3.3.1 Ooforectomia

Quando os animais atingiram a idade designada no delineamento experimental dos protocolos do 2º e 3º capítulo (3 ou 6 meses de vida), estes foram anestesiados (mistura de 0,5%-2% de isoflurano e 98% de O₂ a um fluxo de 1,5L/min) e colocados em decúbito dorsal, onde foi realizada uma pequena incisão (1 cm) em paralelo com a linha do corpo na pele e na musculatura no terço inferior na região abdominal. Os ovários foram localizados e foi realizada a ligadura dos ovidutos, incluindo os vasos sanguíneos. Os ovidutos foram seccionados e os ovários removidos. A musculatura e a pele foram suturadas e após o término da cirurgia, o analgésico (tramadol, 30 mg/Kg) foi administrado de 12 em 12 horas por 2 dias, e o anti-inflamatório (Meloxicam 0,2% de uso veterinário, dose de 2mg/kg) foi administrado em dose única ⁴⁹.

3.3.2 Treinamento físico aeróbico

Adaptação: Todos os animais foram submetidos a um período de adaptação por 4 dias na esteira, caminhando a 0,3km/h durante 10 minutos por dia ⁵⁰. **Teste máximo:** A prescrição do treinamento físico foi realizada com base no desempenho no teste de capacidade máxima de corrida em esteira. Os testes máximos foram iniciados na intensidade de 0,3 km/h por 3 minutos, com incrementos de sobrecarga em 0,3 km/h a cada 3 minutos até o animal atingir a exaustão ^{50,51}. **Prescrição:** Após a realização do teste máximo, os grupos submetidos ao treinamento físico foram submetidos a um protocolo em esteira ergométrica com velocidade e carga progressivas durante 6 semanas, durante 5 dias por semana, por 1 hora ao dia, com intensidade entre 60% e 70% da velocidade máxima de corrida ⁵². Ao final da 3ª semana, foi realizado um novo teste de esforço máximo (intermediário) para reajuste da intensidade do treinamento físico em virtude do novo nível de condicionamento físico ⁵⁰.

3.3.3 Avaliações ecocardiográficas

O exame ecocardiográfico foi realizado com os animais anestesiados (mistura de 0,5%-2% de isoflurano e 98% de O₂ a um fluxo de 1,5L/min). Foi utilizado o equipamento Vevo 2100 (FujiFilm VisualSonics Inc., Toronto, Ontario, Canadá) e transdutor linear de 13 MHz. A partir da visualização do ventrículo esquerdo (corte transversal) ao nível dos músculos papilares foram realizadas as seguintes medições: diâmetro diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do ventrículo esquerdo e a espessura do septo interventricular (SIV) e da parede posterior do ventrículo esquerdo (PP) em sístole e diástole. Após a realização das medidas foi calculada a massa do ventrículo esquerdo segundo orientação da Sociedade Americana de Ecocardiografia, que estima a massa do ventrículo esquerdo através da utilização da seguinte fórmula matemática:

$$LVM = [(DDVE+SIV+PP)^3-(DDVE)^3] \times 1,047$$

O valor de 1,047 (mg/mm³) corresponde a densidade do miocárdio. Além da massa do ventrículo esquerdo foi calculada a força de encurtamento do ventrículo esquerdo

$$\square D\% = \left[\frac{(DDVE-DSV)}{DDVE} \right] \times 100$$

Os valores absolutos da massa do ventrículo esquerdo foram normalizados pelo peso corporal. As imagens obtidas através do Doppler foram utilizadas para calcular os parâmetros da função diastólica do ventrículo esquerdo. Foram medidos os picos de velocidade da onda E, os picos de velocidade da onda A, o tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) e o tempo de desaceleração. Além disso realizamos a razão entre a onda E/onda A.

Adicionalmente, durante a ecocardiografia foram realizadas medidas em duplicata da espessura da aorta: ((diâmetro externo da aorta – diâmetro interno da aorta) /2).



Figura 1. Medida da espessura da aorta.

3.3.4 Canulação

Ao final do protocolo, os animais foram anestesiados (mistura de 0,5%-2% de isoflurano e 98% de O₂ a um fluxo de 1,5L/min) e colocados em decúbito dorsal. Foi realizada uma pequena incisão no pescoço por onde foram implantados cateteres de polietileno (cânulas; tygon P50) preenchidos com soro fisiológico. Essas cânulas foram posicionadas no interior da artéria carótida e da veia jugular para registro de pressão arterial (PA), frequência cardíaca (FC) e administração de drogas, respectivamente. Após a correta e firme implantação das cânulas na artéria carótida e veia jugular, estas foram exteriorizadas no dorso do animal na região cervical e fixadas com fio de algodão na pele^{46,49,51,53,54}. Cada animal foi mantido em uma caixa individual padrão durante a realização das avaliações hemodinâmicas sistêmicas que iniciaram 24h após a canulação.

3.3.5 Registro de pressão arterial

Com o animal acordado, a cânula arterial foi conectada a uma extensão de 20 cm, permitindo livre movimentação do animal pela caixa, durante todo o período do experimento. Esta extensão foi conectada a um transdutor eletromagnético de pressão (Kent Instruments) que, por sua vez, foi conectado a um pré-amplificador (Stemtech). Sinais de pressão arterial foram gravados durante um período de 30 minutos em um microcomputador equipado com um sistema de aquisição de dados (WINDAQ), permitindo análise dos pulsos de pressão, batimento-a-batimento, com uma frequência de amostragem de 4KHz por canal para estudo dos valores pressóricos e de frequência cardíaca ^{51,55}.

3.3.6 Avaliação da sensibilidade barorreflexa através de variações hemodinâmicas induzidas por drogas vasoativas.

Após o registro pressórico, uma extensão de aproximadamente 20 cm (P10) foi conectada na cânula venosa para injeção de drogas vasoativas. Com os animais em condições de repouso, a sensibilidade barorreflexa foi testada através da infusão (bolus) de doses crescentes de fenilefrina (100ng/mL, 150ng/mL) e nitroprussiato de sódio (100ng/mL, 150ng/mL). As drogas foram injetadas randomicamente entre os animais.

Fenilefrina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) é um potente estimulador α_1 cuja ação predominante se dá nas arteríolas periféricas causando vasoconstrição, este fármaco induz aumento dos valores pressóricos, seguido de uma resposta bradicárdica reflexa comandada pelos pressorreceptores.

Nitroprussiato de sódio (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) é um potente vasodilatador tanto de arteríolas como de veias, cuja ação se dá por meio da ativação da guanilato ciclase e aumento da síntese de 3', 5'- guanosina monofosfato

(GMP cíclico) na musculatura lisa de vasos e outros tecidos, esse fármaco induz redução dos valores pressóricos, seguido por uma resposta taquicárdica reflexa comandada pelos pressorreceptores.

3.3.7 Avaliação da sensibilidade barorreflexa espontânea.

A análise do barorreflexo espontâneo foi realizada pelo método da sequência, utilizando o software *Cardioseries* (V2.7). O método da sequência se baseia na identificação da ocorrência espontânea de sequência de três ou mais batimentos cardíacos consecutivos, na qual existe aumento progressivo dos valores de pressão arterial sistólica (PAS) acompanhando de um prolongamento do intervalo de pulso (IP) (BRR *up*: rampas barorreflexas em subida), ou uma diminuição progressiva da PAS acompanhada de redução do IP (BRR *down*: rampas barorreflexas em descida) ^{56,57}.

Em relação a todas as sequências é aplicada uma regressão linear, e uma média dos valores obtidos em todas as sequências através da razão entre o IP e a PAS (ms/mmHg). Esse valor representa as medidas de ganho de sensibilidade barorreflexa espontânea ^{56,57}. Além disso, também são apresentados os valores do índice de eficiência barorreflexa (IEB) ^{56,57}, calculado através da razão entre o número de rampas barorreflexas em relação ao número de rampas da pressão arterial sistólica.

3.3.8 Avaliação da modulação autonômica cardiovascular.

A partir do registro basal dos animais acordados, foi possível utilizar a ferramenta de análise tempo-frequência da variabilidade da frequência cardíaca (FC) e da pressão arterial sistólica (PAS) através do *software* *Cardioseries* (V2.7).

A variabilidade da frequência cardíaca foi mensurada por meio do registro do sinal pulsátil da pressão arterial, sendo o intervalo de pulso caracterizado pelo intervalo entre os picos sistólicos ⁵⁶. **Intervalo de pulso no domínio do tempo:** Foram obtidos os valores médios do intervalo de pulso sendo a sua variabilidade quantificada pelo cálculo da média dos desvios padrões (DP-IP) e variância do intervalo de pulso (VAR-IP) ($VAR-IP = DP-IP^2$). Além disso, foi obtido o parâmetro RMSSD (raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre os intervalos das ondas R-R normais adjacentes), que é um indicador de modulação parassimpática cardíaca.

Intervalo de pulso no domínio da frequência (análise spectral): A análise no domínio da frequência consistiu na decomposição do sinal em um histograma pela Transformada Rápida de Fourier. Após esse remodelamento matemático, foram obtidas as potências absolutas (abs), da Banda de Muito Baixa Frequência do Intervalo de Pulso (MBF-IP: 0.00 – 0.4 Hz), Banda de Baixa Frequência do Intervalo de Pulso (BF-IP: 0,4-1,50 Hz), e Banda de Alta Frequência do Intervalo de Pulso (AF-IP: 1,5-5,0Hz) ^{58,59}. Foi realizado o cálculo da razão entre: banda de baixa frequência do intervalo de pulso/banda de alta frequência do intervalo de pulso (BF-IP abs/AF-IP abs), que fornece um indicador de balanço simpatovagal ⁵⁸. Também foi calculada a Potência Total (soma dos valores absolutos de todas as bandas (MBF-IP abs + BF-IP abs + AF-IP abs)), indicador absoluto de modulação autonômica cardíaca.

Além dos valores absolutos, as bandas de baixa e alta frequência do intervalo de pulso (BF-IP e AF-IP) também foram geradas em unidade normalizada (u.n). Para este cálculo são desconsiderados os valores da banda de muito baixa frequência em relação aos valores de potência absoluta:

$$BF-IP \text{ u.n} = BF-IP \text{ abs} / (\text{Potência total} - MBF \text{ abs}) \times 100.$$

$$AF-IP \text{ u.n} = AF-IP \text{ abs} / (\text{Potência total} - MBF \text{ abs}) \times 100.$$

Variabilidade da PAS no domínio do tempo: Após a obtenção dos valores médios da pressão arterial sistólica foram calculados os desvios padrões da pressão arterial sistólica (DP-PAS) e variância da pressão arterial sistólica (VAR-PAS) ($VAR-PAS = DP-PAS^2$). **Variabilidade da PAS no domínio da frequência:** Realizada através da Transformada Rápida de Fourier, onde foi obtido a banda de baixa frequência da pressão arterial sistólica (BF-PAS: 0,4-1,50Hz) ^{58,59}. Todos os parâmetros obtidos na variabilidade da pressão arterial sistólica são indicadores de modulação simpática vascular. **Análise da sensibilidade barorreflexa através do índice alfa:** A partir dos dados obtidos na análise de modulação autonômica cardiovascular no domínio da frequência foi realizado o cálculo do índice alfa, um importante indicador de sensibilidade barorreflexa em estado basal. O índice alfa foi calculado a partir da raiz quadrada da razão entre os valores absolutos de BF-IP/BF-PAS ⁴¹.

3.3.9 Preparação de Tecidos

Ao término do protocolo, os animais foram anestesiados (isoflurano), o sangue foi coletado através da cânula arterial para a separação do plasma, acondicionado em tubo ependorf e congelado em freezer -80°C. Em seguida, foi realizada a eutanásia, e os seguintes órgãos foram retirados para análise: coração, baço, tecido adiposo (mesentérico, retroperitoneal, subcutâneo e ovariano); músculos (sóleo e gastrocnêmico). Com exceção dos corações (4 por grupo) que foram direcionados à histologia, os tecidos coletados foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C. As carcaças foram colocadas em sacos específicos para lixo biológico e mantidas em refrigerador para posteriormente serem incineradas pela empresa responsável.

3.3.10 Histologia do Coração

As amostras de tecido cardíaco de todos os grupos estudados foram fixadas em formalina por 24 horas. A seguir, foram seguidos os procedimentos de rotina para desidratação, diafanização e inclusão do tecido cardíaco em parafina. Usando-se o microtômo, foram obtidos cortes histológicos de 4 μ m de espessura apoiados sobre lâminas de vidro.

Para o estudo do colágeno fibrilar, os cortes histológicos foram desparafinados, hidratados e corados durante uma hora em uma solução 0,1% de Sirius Red (Sirius Red F 3 B 200, Mobay Chemical Co. Union, New Jersey, EUA) em solução saturada aquosa de ácido pícrico. Os cortes foram rapidamente lavados em água corrente e contracorados com hematoxilina de Harris por 5 minutos. Com a coloração pelo Picrossírius foi possível a identificação do colágeno fibrilar que adquire uma intensa coloração vermelha quando analisado sob luz convencional.

Os cortes histológicos corados com Picrossírius foram "escaneados" pelo sistema Scancope (Aperio Technologies Inc., Vista, CA, USA) e a avaliação morfológica das áreas teciduais ocupadas pelo colágeno foram quantificadas com auxílio do programa de análise de image J⁶⁰.

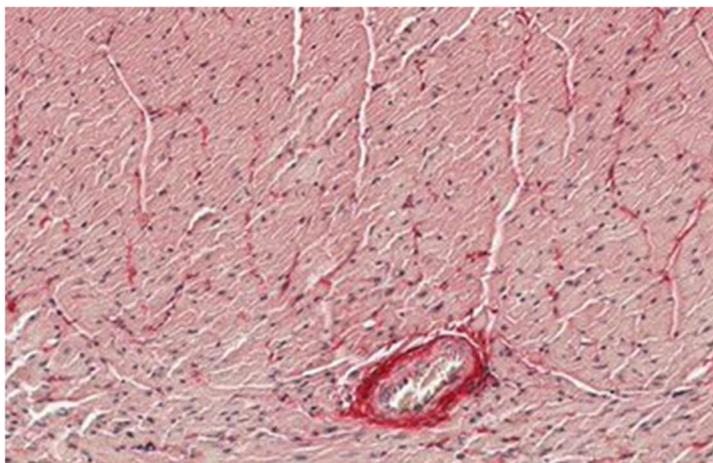


Figura 2. Lâmina histológica de coloração do colágeno cardíaco.

3.3.11 Inflamação no baço

O baço foi colocado em 1,0mL de tampão específico para extratos totais, com a seguinte composição: Trizma base 100mM pH 7.5, EDTA 10mM, SDS 10%, fluoreto de sódio 100mM, pirofosfato de sódio 10mM, ortovanadato de sódio 10mM. As proteínas totais foram dosadas pelo método de Bradford e as citocinas IL-6, IL-10 e TNF- α foram dosadas utilizando kits comerciais Ready-SET-Go!®, através do método enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) de captura ⁵⁵.

As dosagens de interleucinas e o TNF- α foram realizadas em microplacas (96 poços) sensibilizadas com o anticorpo para a proteína de interesse, aderido à parede dos poços da placa por um substrato imuno absorvente. Foi feito o bloqueio prévio de ligações inespecíficas e posterior incubação das amostras experimentais, contendo a proteína (antígeno) a ser dosada. Foi feita a incubação com anticorpo ligado a enzima marcada com peroxidase, e posterior reação com cromógeno. Na mesma placa, foi feita a curva-padrão, que foi usada para o cálculo da quantidade de proteína por poço. A absorbância foi medida em aparelho leitor de ELISA. Foram usados kits específicos para camundongos (RayBiotech). O ensaio para dosagem usou as concentrações na curva padrão específicas para cada substância.

3.3.12 Estresse oxidativo cardíaco e nitrito plasmático

Biodisponibilidade de óxido nítrico: o nitrito plasmático (NO^-_2) foi analisado pelo reagente Griess e a concentração de nitritos plasmáticos refletiu a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) ⁶¹⁶².

Espécies pró-oxidantes: A concentração de peróxido de hidrogênio foi avaliada com base na oxidação do vermelho de fenol mediada pela peroxidase de rábano silvestre

(HRPO) pelo H_2O_2 ⁶¹. A atividade da enzima NADPH oxidase foi determinada pela produção de superóxido em leitor de placas ⁶³.

Defesa antioxidante: A quantificação da atividade da superóxido dismutase (SOD) baseou-se na inibição da reação entre $O_2^{\cdot -}$ e pirogalol e a atividade da catalase (CAT) foi determinada medindo a diminuição da absorbância de H_2O_2 a 240 nm ⁶¹. A capacidade antioxidante não enzimática foi determinada através da análise sobre a atuação da *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP) ⁶².

Dano oxidativo: A peroxidação da membrana lipídica foi avaliada por substâncias reativas ao tiobarbitúrico (TBARS) e a oxidação proteica foi determinada pela técnica de carbonilas ⁶¹.

3.3.13 Análise Estatística

Os dados foram analisados através do software GraphPad Prisma (versão 8.0). A média aritmética e o erro padrão da média (EPM) foram calculados para todas as variáveis estudadas. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a normalidade dos resultados. A comparação entre os grupos experimentais foi realizada nos respectivos capítulos através de análise de variância de um fator (ANOVA one-way) ou dois fatores (ANOVA two-way), seguido de pós-teste de Tukey. Além disso, foi testada a associação entre as variáveis através do teste de Correlação de Pearson. O nível de significância utilizado em todas as análises foi de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO 1

O primeiro capítulo apresenta os efeitos do processo de envelhecimento em desfechos cardiovasculares, autonômicos, inflamatórios e de estresse oxidativo em camundongos fêmeas ApoE-KO expostas ao processo de envelhecimento, bem como os efeitos do treinamento físico neste contexto. Os dados deste capítulo já foram publicados ⁶⁴.

4.1 Delineamento experimental do capítulo 1

Foram utilizados 3 grupos experimentais: camundongos adultas jovens (J), fêmeas ApoE-KO com 6 meses de vida; camundongos adultas na meia-idade (MA), fêmeas ApoE-KO com 15 meses de vida; camundongos adultas na meia-idade treinadas (MAT), fêmeas ApoE-KO com 15 meses de vida submetidas ao treinamento físico nas últimas 6 semanas de protocolo. Na figura 3 o delineamento experimental é apresentado.

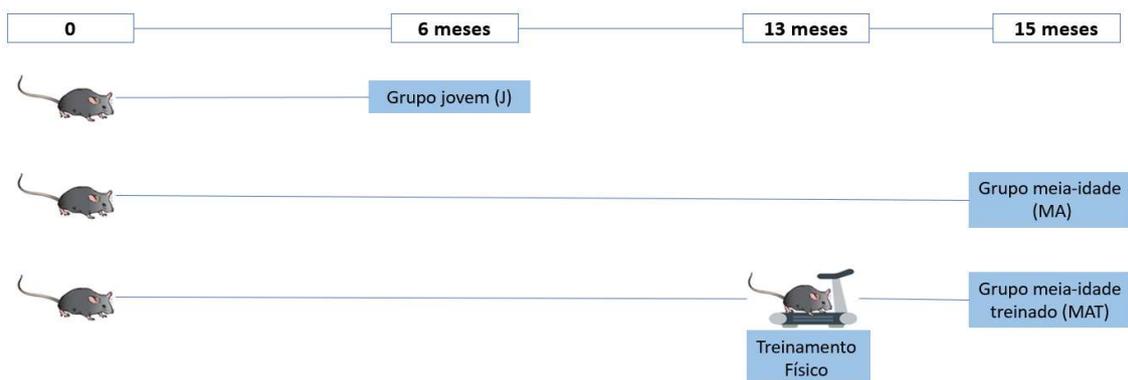


Figura 3. Delineamento experimental do capítulo 1.

O grupo experimental jovem foi acompanhado até o 6º mês de vida por ser um período em que os camundongos estão fisiologicamente estabelecidos no início da vida adulta ⁴³. Portanto foi o grupo controle para o processo de envelhecimento. Os grupos meia-idade, foram acompanhados até o 15º mês de vida, por ser o momento em que a literatura aponta estar estabelecida a senescência reprodutiva em camundongos ^{10,43}. O treinamento aeróbico foi prescrito nas últimas 6 semanas de protocolo por haver evidências prévias de ser um período efetivo para atenuar os efeitos deletérios da aterosclerose nas artérias ⁵².

4.2 Resultados do capítulo 1

A figura 4 apresenta os resultados do teste de capacidade máxima de corrida. No painel A é apresentado o teste inicial, que foi realizado antes do início do treinamento físico (13 meses e 2 semanas) e no painel B é apresentado o teste final, que foi realizado após o período do treinamento físico (15 meses nos grupos meia-idade).

Conforme o esperado, os grupos na meia-idade apresentaram uma menor capacidade de corrida em relação ao grupo jovem no teste inicial (MAT e MA vs. J). No entanto, no teste final o grupo meia-idade treinado apresentou capacidade de corrida equivalente ao grupo jovem e superior ao do grupo meia-idade não treinado (MAT vs. MA).

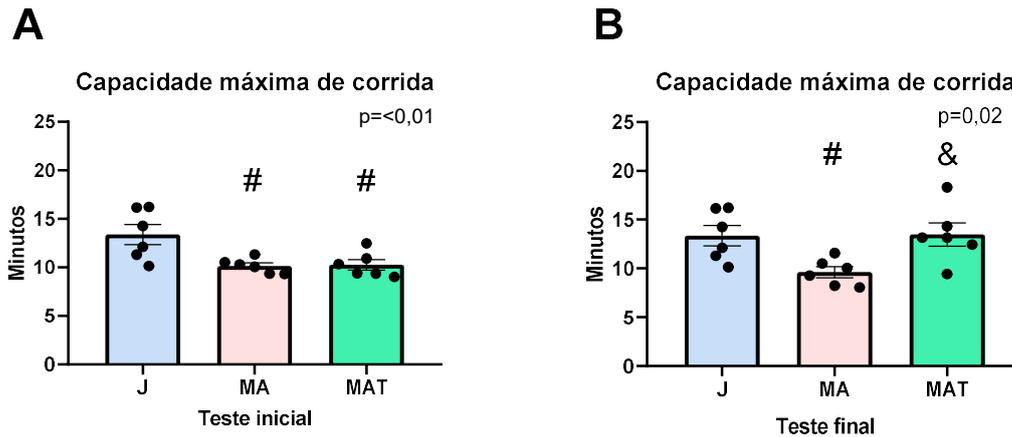


Figura 4: **A)** Teste inicial da capacidade máxima de corrida; **B)** Teste final da capacidade máxima de corrida. **Grupos:** Adultas jovens (J); Adultas na meia-idade (MA); Adultas na meia-idade treinadas (MAT). # $p < 0,05$ vs. J. & $p < 0,05$ vs. MA.

A figura 5 apresenta os dados da massa do ventrículo esquerdo cardíaco (painel A) e a espessura da parede da aorta (painel B). Não foram identificadas modificações na massa do ventrículo esquerdo, no entanto, o grupo meia-idade apresentou maior espessura da parede da aorta em relação ao grupo jovem (MA vs. J) e o grupo meia-idade treinado apresentou dados equivalentes ao do grupo jovem. Adicionalmente, não foram identificadas modificações nas demais análises morfométricas cardíacas.

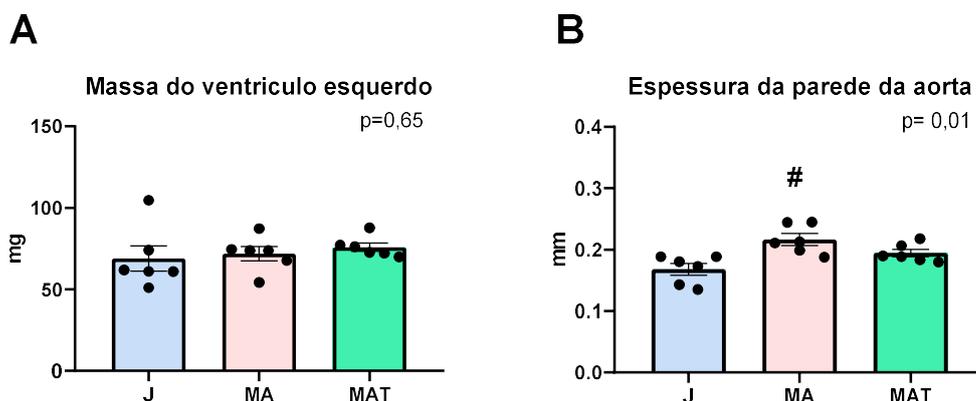


Figura 5: **A)** Massa do ventrículo esquerdo; **B)** Espessura da parede da aorta. **Grupos:** Adultas jovens (J); Adultas na meia-idade (MA); Adultas na meia-idade treinadas (MAT). # $p < 0,05$ vs. J.

A Figura 6 apresenta os indicadores de função sistólica cardíaca. Não foram identificadas modificações na fração de ejeção (painel A), no volume sistólico do ventrículo esquerdo (painel B), bem como no débito cardíaco (painel C).

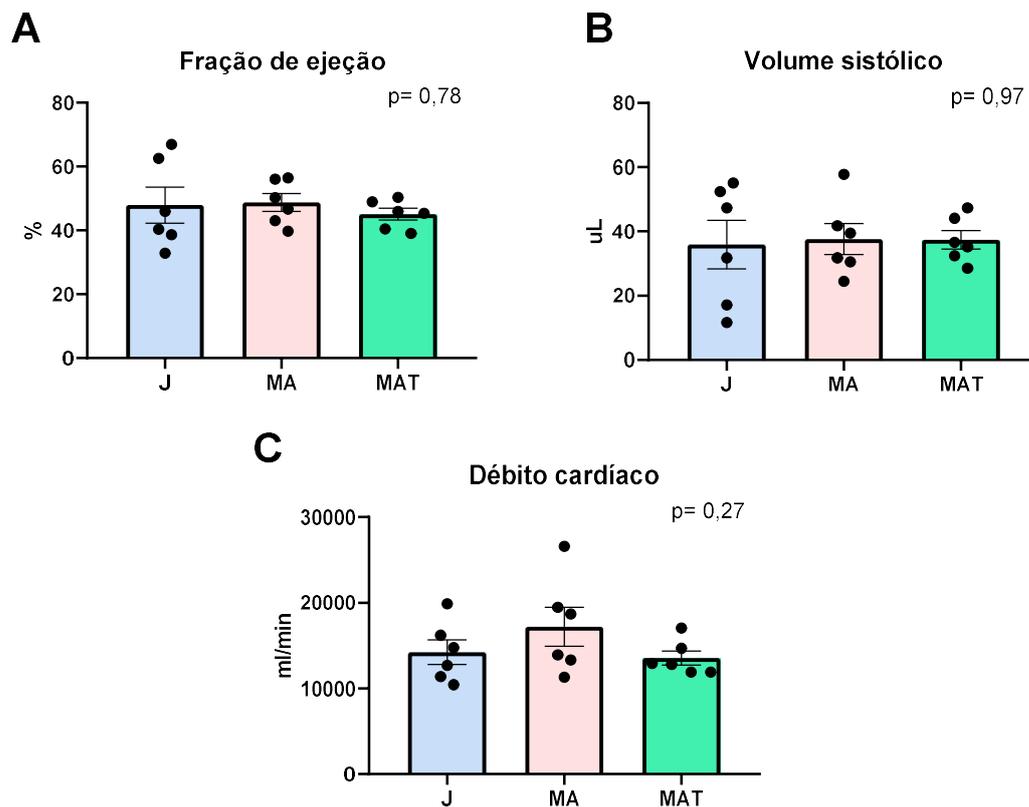


Figura 6: Parâmetros de função sistólica cardíaca. **A)** Fração de ejeção do ventrículo esquerdo; **B)** Volume sistólico do ventrículo esquerdo; **C)** Débito cardíaco. **Grupos:** Adultas jovens (J); Adultas na meia-idade (MA); Adultas na meia-idade treinadas (MAT).

A Figura 7 apresenta os indicadores de função diastólica cardíaca, respectivamente, razão da Onda E'/Onda A' (painel A), razão da Onda E/Onda A (painel B), razão da Onda E/Onda E' (painel C), tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV – painel D) e volume diastólico (painel E). O grupo meia-idade apresentou uma menor

razão Onda E'/Onda A' em relação ao grupo jovem (MA vs. J). Adicionalmente, não foram identificadas modificações nos demais parâmetros.

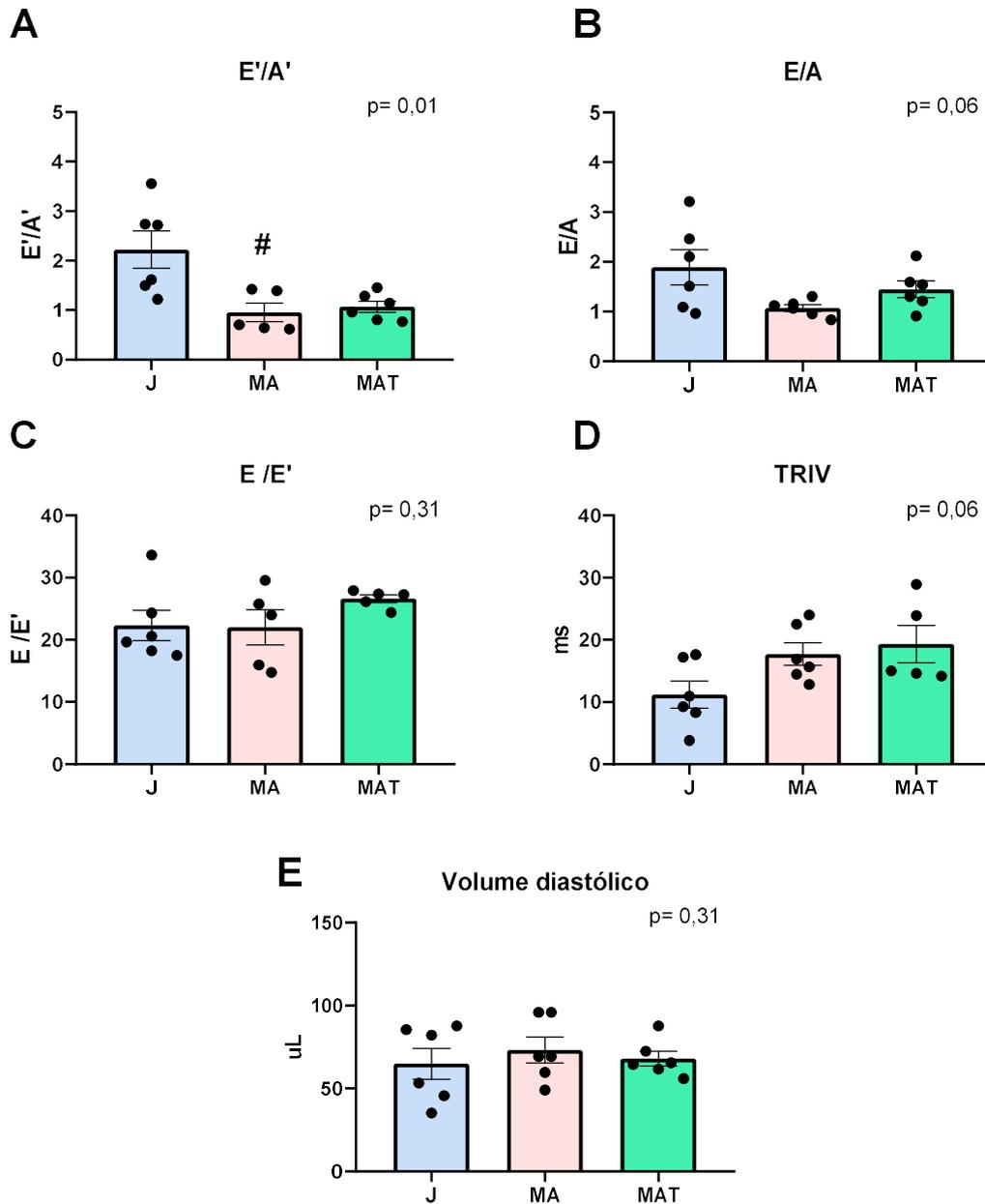


Figura 7: Parâmetros de função diastólica cardíaca. **A)** Razão Onda E'/Onda A'; **B)** Razão Onda E/Onda A; **C)** Razão Onda E/ Onda E'; **D)** Tempo de relaxamento isovolumétrico; **E)** Volume diastólico do ventrículo esquerdo. **Grupos:** Adultas Jovens (J), Adultas na meia-idade (MA), Adultas na meia-idade treinadas (MAT). #p< 0,05 vs. J.

A figura 8 apresenta os parâmetros hemodinâmicos, respectivamente, pressão arterial diastólica (A), pressão arterial sistólica (B), pressão arterial média (C) e frequência cardíaca (D). O grupo meia-idade apresentou maiores valores de pressão arterial e frequência cardíaca em relação ao grupo jovem (MA vs. J). Em contrapartida, o grupo treinado (MAT) apresentou dados equivalente aos do grupo jovem.

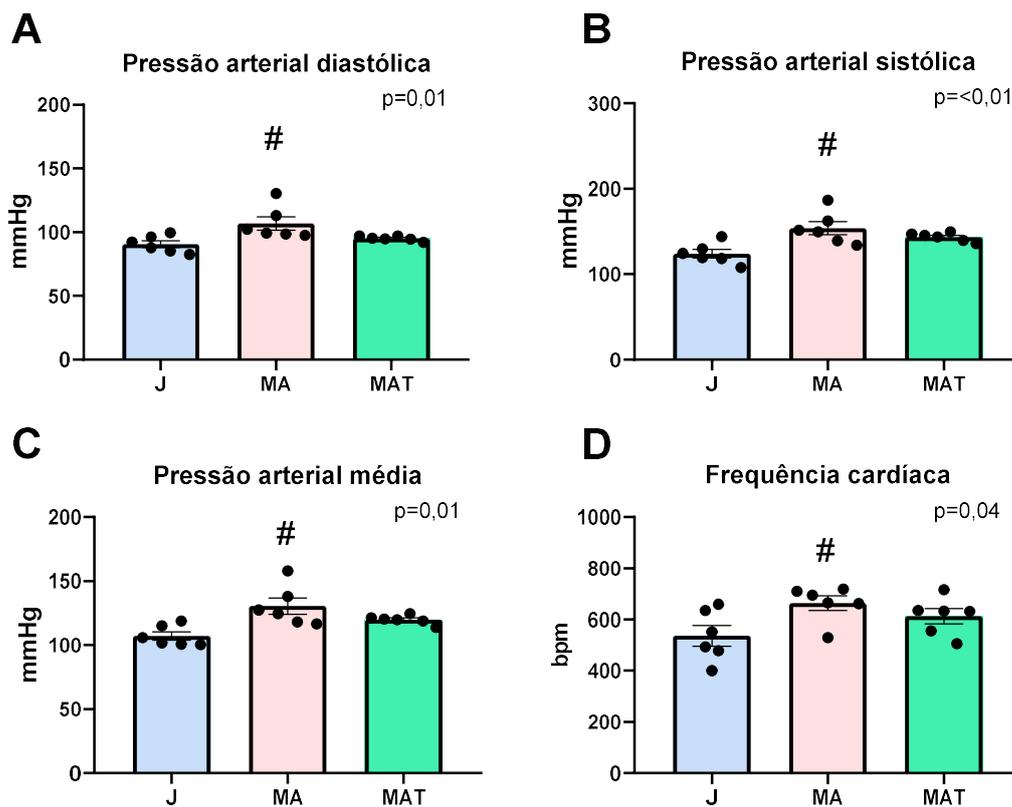


Figura 8. Parâmetros hemodinâmicos. **A)** Pressão arterial diastólica; **B).** Pressão arterial sistólica; **C)** Pressão arterial média; **D)** Frequência cardíaca. **Grupos:** Adultas jovens (J), Adultas na meia-idade (MA), Adultas na meia-idade treinadas (MAT). #p< 0,05 vs. J.

A figura 9 apresenta os resultados de análise da sensibilidade barorreflexa. Os painéis A e B apresentam indicadores de sensibilidade barorreflexa espontânea, respectivamente, o índice- α e o índice de eficiência barorreflexa. Os painéis C e D apresentam a capacidade dos barorreceptores corrigirem os níveis pressóricos após a administração de drogas vasoativas, respectivamente, a resposta bradicárdica reflexa (C) e resposta taquicárdica reflexa (D).

O grupo meia-idade apresentou uma menor sensibilidade barorreflexa em relação ao grupo jovem. Foram observados valores inferiores de índice- α , índice de eficiência barorreflexa e resposta taquicárdica reflexa em relação ao grupo jovem. O treinamento físico atenuou o efeito do processo de envelhecimento, considerando que o grupo meia-idade apresentou sensibilidade barorreflexa equivalente ao do grupo jovem em todos os parâmetros.

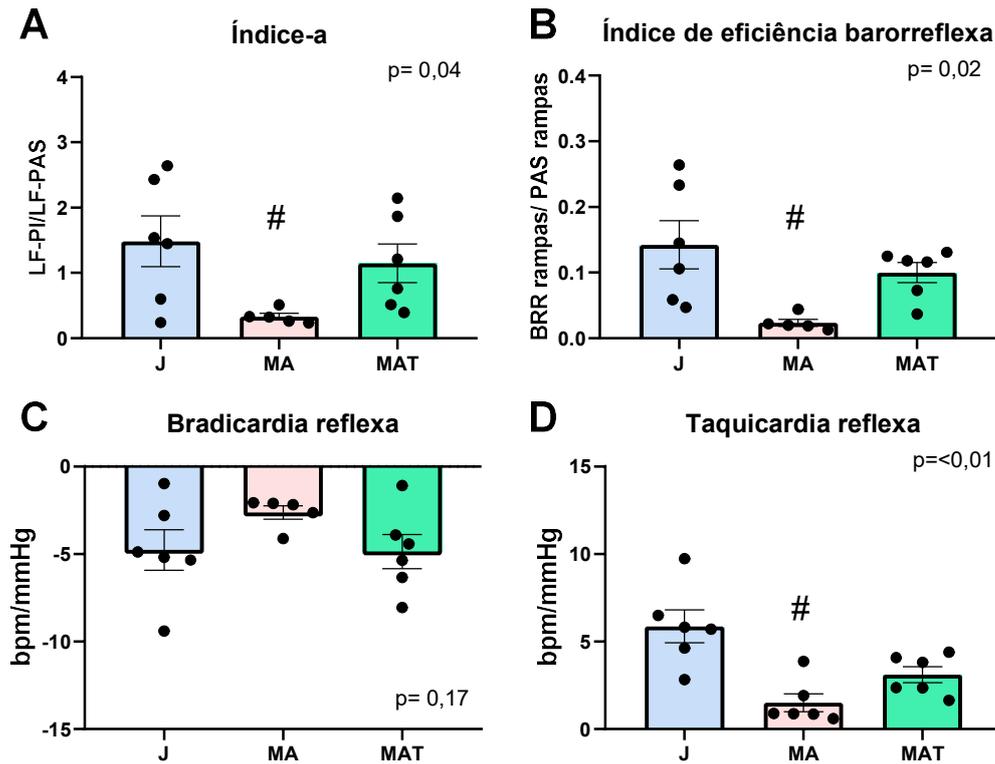


Figura 9. Índices de sensibilidade barorreflexa. **A)** Índice- α ; **B)** Índice de Eficiência barorreflexa para rampas totais; **C)** Resposta Bradicárdica Reflexa. **D)** Resposta Taquicárdica Reflexa. **Grupos:** Adultas jovens (J), Adultas na meia-idade (MA), Adultas na meia-idade treinadas (MAT). # $p<0,05$ vs. J.

Na figura 10 são apresentados os parâmetros da análise da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo e no domínio da frequência, respectivamente, RMSSD (painel A), VAR-IP (painel B), BF-IP (painel C), AF-IP (painel D) e Potência total (painel E).

Os grupos meia-idade apresentaram valores inferiores de RMSSD e AF-IP em relação ao grupo jovem (MA e MAT vs. J). Adicionalmente, o grupo meia-idade apresentou uma menor modulação autonômica cardíaca (VAR-IP e Potência total) e banda BF-IP em relação ao grupo jovem (MA vs. J).

O treinamento físico parece atenuar a o efeito do processo de envelhecimento na modulação autonômica cardíaca, tendo em vista que o grupo treinado não apresentou modificações em relação ao jovem. Adicionalmente, o grupo MAT apresentou maior variância do intervalo de pulso em relação ao grupo MA.

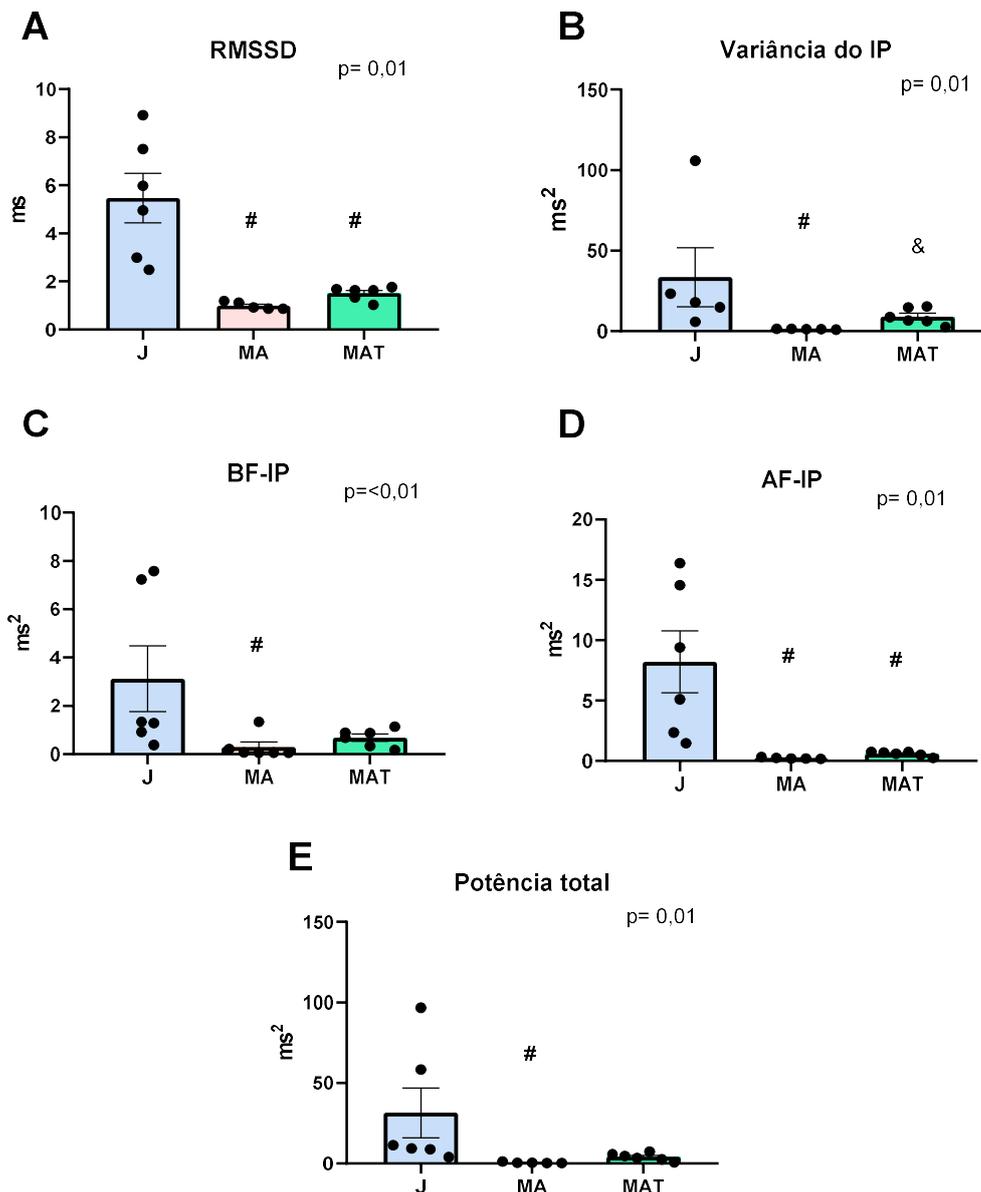


Figura 10: Parâmetros de variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo e domínio da frequência. **A)** RMSSD (raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre os intervalos das ondas R-R normais adjacentes; **B)** Variância do intervalo de pulso; **C)** Banda de baixa frequência do intervalo de pulso; **D)** Banda de alta frequência do intervalo de pulso; **E)** Potência total. **Grupos:** Adultas jovens (J), Adultas na meia-idade (MA), Adultas na meia-idade treinadas (MAT). #p < 0,05 vs. J. &p < 0,05 vs. MA.

Não foram identificadas modificações nos parâmetros de modulação da pressão arterial sistólica, respectivamente a VAR-PAS ($p=0.20$) e o BF-PAS ($p=41$).

A figura 11 apresenta mediadores inflamatórios, respectivamente, a interleucina-10 (painel A), o fator de necrose tumoral (TNF- α) (painel B), a interleucina-6 (IL-6) (painel C), a razão TNF- α /IL-10 (painel D) e a razão IL-6/IL-10 (painel E). O grupo meia-idade apresentou menor quantidade de IL-10 em relação ao grupo jovem (MA vs. J), e o treinamento físico conseguiu atenuar a redução promovida pelo processo de envelhecimento, apresentado valores equivalentes ao do grupo jovem. Adicionalmente, os grupos meia idade (MA e MAT) apresentaram maior razão IL-6/IL-10.

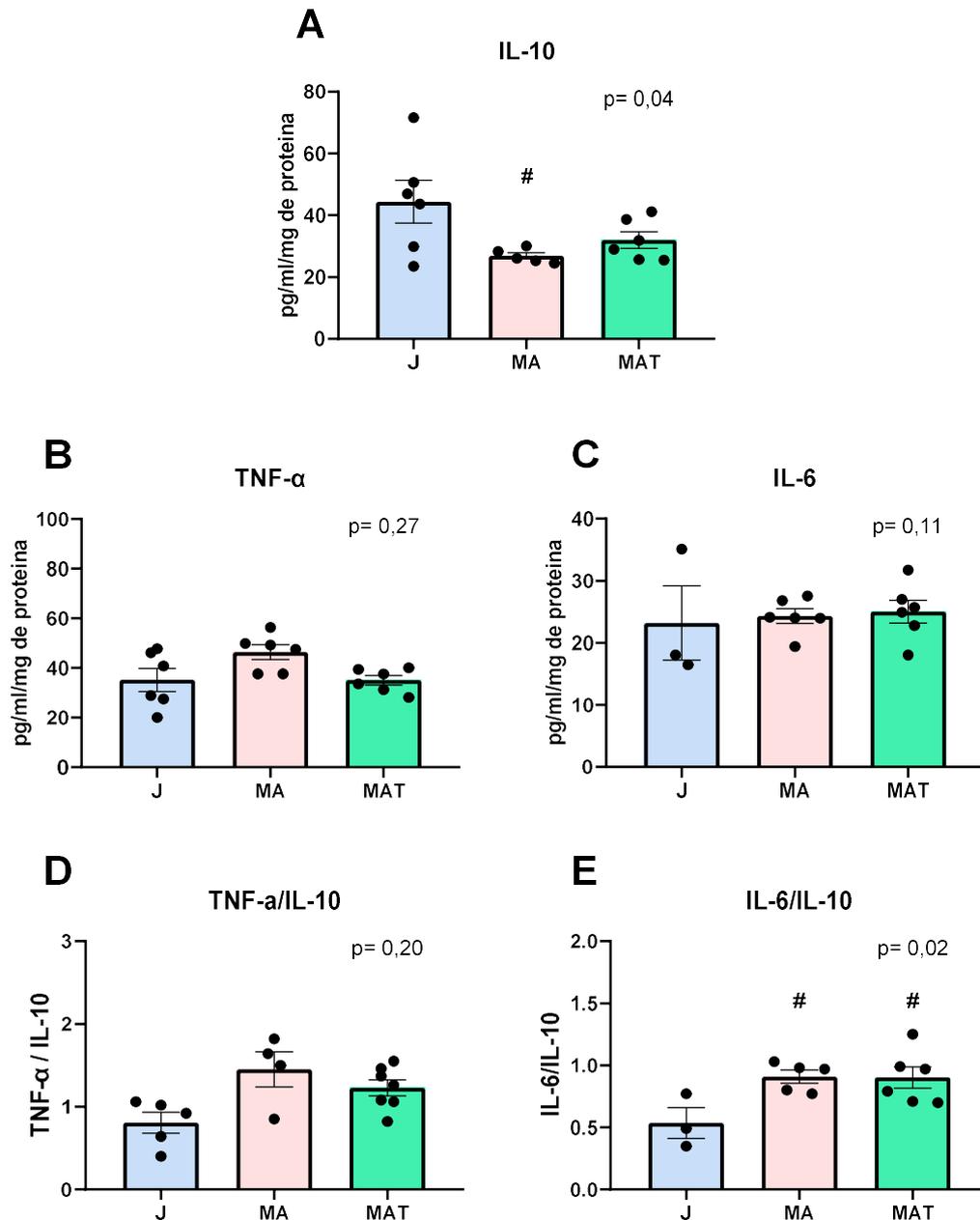


Figura 11: Mediadores inflamatórios. **A)** IL-10 (interleucina-10); **B)** TNF- α ; **C)** IL-6 (interleucina-6); **D)** razão TNF- α /IL-10; **E)** razão IL-6/IL-10. **Grupos:** Adultas jovens (J), Adultas na meia-idade (MA), Adultas na meia-idade treinadas (MAT). #p< 0,05 vs. J.

A figura 12 apresenta os indicadores de estresse oxidativo, os painéis A, B, C apresentam indicadores de defesa antioxidante, respectivamente, superóxido dismutase, FRAP e catalase. Os painéis D e E apresentam indicadores pró-oxidantes, respectivamente a NADPH oxidase e o peróxido de hidrogênio.

O grupo meia-idade apresentou uma menor defesa antioxidante, demonstrada por uma menor ação de superóxido dismutase no grupo meia-idade em relação ao grupo jovem (MA vs. J), e o treinamento físico atenuou esta redução, considerando que o grupo MAT apresentou valores equivalentes ao do grupo jovem. Os grupos experimentais foram equivalentes nos demais parâmetros.

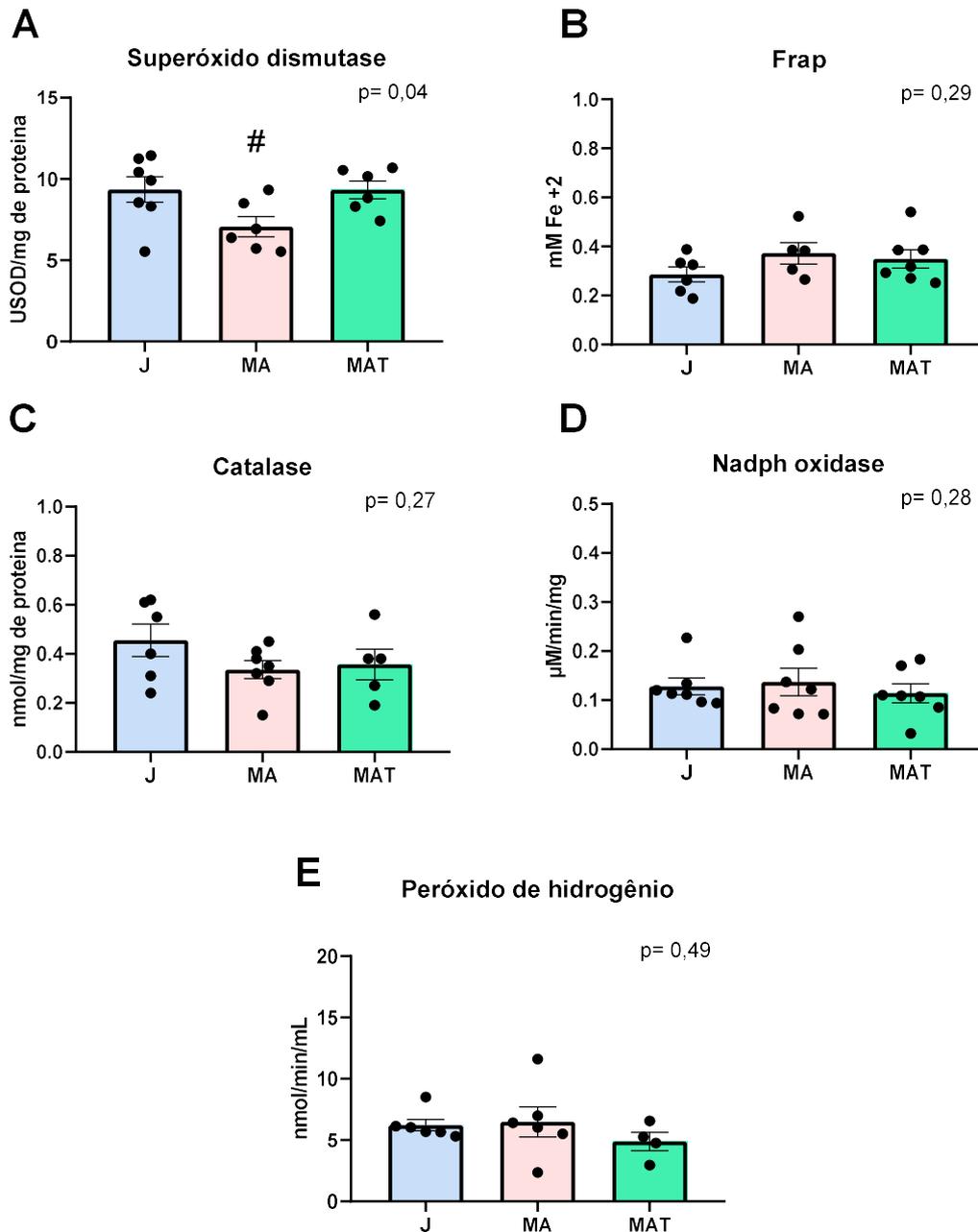


Figura 12: Parâmetros de estresse oxidativo. **A)** Superóxido Dismutase (SOD); **B)** FRAP; **C)** Catalase; **D)** Nadph oxidase; **E)** Peróxido de hidrogênio **Grupos:** Adultas jovens (J), Adultas na meia-idade (MA), Adultas na meia-idade treinadas (MAT). # $p < 0,05$ vs. J.

A figura 13 apresenta os indicadores de dano oxidativo, respectivamente, lipoperoxidação da membrana lipídica (painel A) e a oxidação proteica (painel B). Não foram observadas modificações nestes parâmetros.

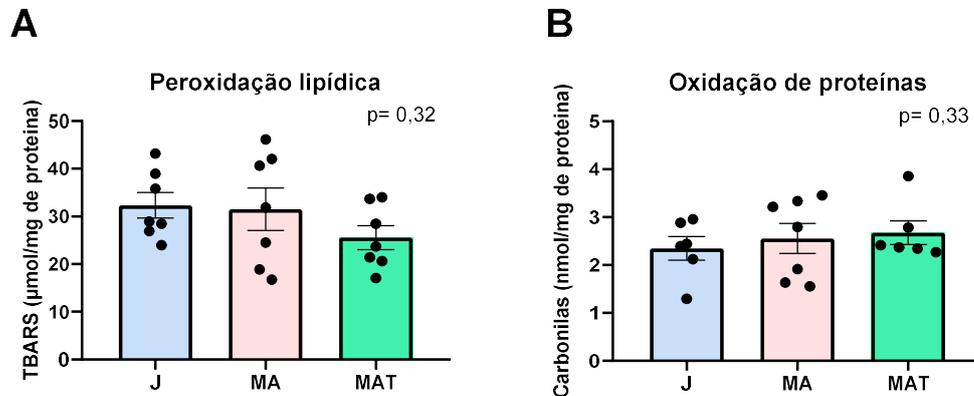


Figura 13: Parâmetros de dano oxidativo. **A)** Peroxidação lipídica; **B)** Oxidação de proteínas. **Grupos:** Adultas jovens (J), Adultas na meia-idade (MA), Adultas na meia-idade treinadas (MAT).

A figura 14 apresenta os dados de colágeno cardíaco, os grupos meia-idade apresentaram uma maior quantidade de colágeno em relação ao grupo jovem (MA, MAT vs. J).

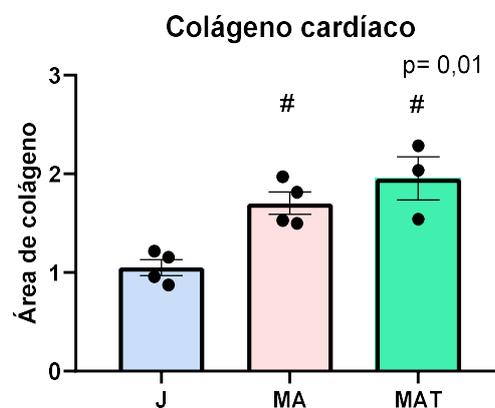


Figura 14: Colágeno cardíaco. **Grupos:** Adultas jovens (J), Adultas na meia-idade (MA), Adultas na meia-idade treinadas (MAT). # $p < 0,05$ vs. J.

A figura 15 apresenta correlações entre a espessura da parede da aorta com indicadores hemodinâmicos e de sensibilidade barorreflexa espontânea. No painel A é apresentada uma correlação negativa entre a espessura da parede da aorta com o índice de eficiência barorreflexa. Além disso, nos painéis B e C são apresentadas correlações positivas entre a espessura da parede da aorta com a pressão arterial média e a frequência cardíaca.

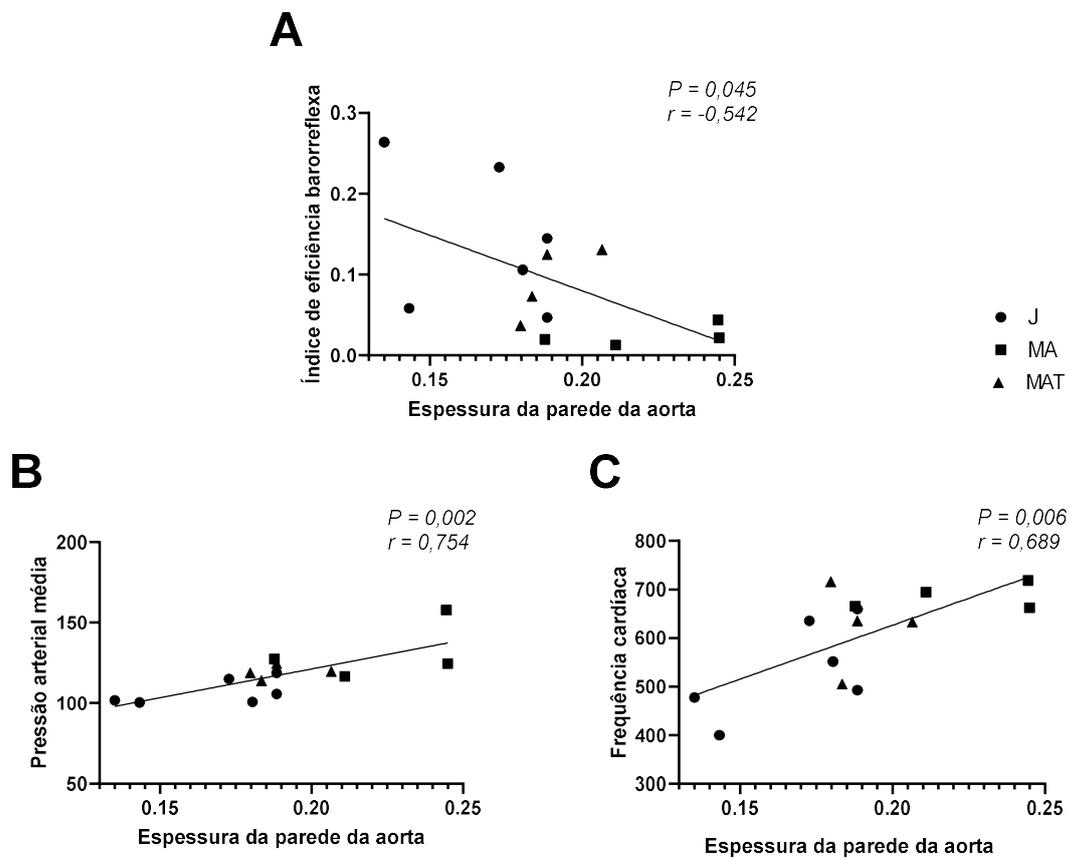


Figura 15: Correlações. **A)** correlação entre a espessura da parede da aorta e o índice de eficiência barorreflexa; **B)** correlação entre a espessura da parede da aorta e a pressão arterial média; **C)** correlação entre a espessura da parede da aorta e a frequência cardíaca.

A tabela 1 apresenta o sumário dos resultados do capítulo 1.

Tabela 1. Sumário dos resultados do capítulo 1

Parâmetros	Grupo meia-idade	Grupo meia-idade treinadas
Capacidade de Corrida	↓ #	↑ &
Espessura da aorta	↑ #	
Função diastólica cardíaca (Razão Onda E'/Onda A')	↓ #	
Frequência Cardíaca	↑ #	
Pressão Arterial	↑ #	
Sensibilidade Barorreflexa (resposta taquicardica reflexa)	↓ #	
Sensibilidade Barorreflexa Espontânea (índice- α , índice de eficiência barorreflexa)	↓ #	
Modulação Autonômica Cardíaca (VAR-IP , Potência Total)	↓↓ #	↑ &
Mediador anti-inflamatório (IL-10)	↓ #	
Mediador pró-inflamatório (IL-6/IL-10)	↑ #	↑ #
Parâmetros antioxidantes (superóxido dismutase)	↓ #	
Colágeno cardíaco	↓ #	↓ #

↓ = redução do parâmetro; ↑ = aumento do parâmetro; #p< 0.05 vs. grupo adultas jovens; &p< 0.05 vs. grupo adultas na meia-idade; letras ou símbolos na cor vermelha somente um dos parâmetros;

4.3 Discussão do capítulo 1

O primeiro capítulo apresenta os efeitos do processo de envelhecimento em desfechos cardiovasculares, autonômicos, inflamatórios e de estresse oxidativo em camundongos fêmeas ApoE-KO expostas ao processo de envelhecimento, bem como os efeitos do treinamento físico neste contexto. Os principais achados deste capítulo foram que o envelhecimento promoveu uma menor variabilidade da frequência cardíaca e sensibilidade barorreflexa, disfunção diastólica cardíaca, uma maior espessura da parede da aorta e valores hemodinâmicos elevados em camundongos fêmeas com aterosclerose no início da senescência reprodutiva em relação aos animais jovens. Adicionalmente, foi demonstrado que apenas 6 semanas de treinamento físico foram suficientes para mitigar as alterações sistêmicas associadas ao processo de envelhecimento em fêmeas com aterosclerose no início da senescência reprodutiva.

A redução de capacidade funcional é uma característica comum decorrente do processo de envelhecimento em humanos ⁶⁵ e em modelos experimentais ^{66,67}. Desta forma, a menor capacidade funcional encontrada no grupo MA vai de acordo com a literatura. No entanto, o treinamento físico aeróbico parece atenuar a redução funcional, e adicionalmente, torna estes valores similares ao do grupo jovem. Este achado é muito relevante, considerando que indivíduos com doenças cardiovasculares que apresentam menor capacidade funcional tendem a apresentar um menor período de sobrevivência ⁶⁸. É importante mencionar que não ocorreram modificações no peso corporal, tecido adiposo branco e massa muscular entre os grupos experimentais.

Em estudo anterior foi evidenciado em análise realizada por *strain*, que 100% dos camundongas ApoE-KO apresentavam placas ateroscleróticas aos 8 meses de vidas. Adicionalmente, mais de 50% da área vascular destes animais era constituída por uma

capa fibrosa, com cristais de colesterol, regiões acelulares e lipídeos⁶⁹. Considerando que o colágeno cardíaco (marcador de senescência) e a espessura da parede da aorta foram maiores nos grupos meia-idade (MA e MAT vs. J), e neste protocolo os animais foram acompanhados até o 15º mês de vida, período equivalente ao que ocorre a queda de produção de hormônios ovarianos em camundongos^{10,43}, é razoável postular que os animais desenvolveram as características do envelhecimento na presença de aterosclerose.

O processo de envelhecimento naturalmente promove prejuízos na função diastólica cardíaca e alterações na estrutura do ventrículo esquerdo⁶⁵. No presente estudo, não foram identificadas modificações na estrutura do músculo cardíaco na análise ecocardiográfica. No entanto, os grupos meia-idade apresentaram maior quantidade de colágeno cardíaco (MA e MAT), e foi observada uma menor razão E'/A' no grupo MA comparado ao grupo J, demonstrando a redução de função diastólica cardíaca.

Há evidências consistentes que associam o aumento do colágeno cardíaco com o envelhecimento. De fato, o aumento de colágeno cardíaco pode alterar a contratilidade induzida pelos miócitos, promover hipertrofia cardíaca, bem como promover enrijecimento ventricular durante a diástole⁷⁰. Entretanto, vale mencionar que o grupo treinado apresentou maior quantidade de colágeno cardíaco e não apresentou modificações na função diastólica cardíaca.

Desta forma, consideramos neste estudo que o prejuízo na função diastólica cardíaca em camundongos ApoE-KO pode estar relacionado a uma menor função valvar aórtica⁷¹. De fato, o grupo que apresentou disfunção diastólica apresentou igualmente aumento da espessura da parede da aorta. É importante mencionar que existe uma alta incidência de regurgitação aórtica em camundongos ApoE-KO expostos ao processo de

envelhecimento⁷². Adicionalmente, há evidências de maior rigidez aórtica, com maior velocidade de onda de pulso e pico de fluxo aórtico neste modelo⁷³.

Considerando que o estresse oxidativo e a inflamação são mecanismos que agem de forma interrelacionada, gerando um ciclo de retroalimentação para a progressão de placas de ateroma e degradação da matriz extracelular⁴⁰, estes mecanismos podem favorecer o aumento de infiltrados lipídicos na aorta de camundongos⁷⁴. O aumento da quantidade de infiltrados lipídicos vasculares, os prejuízos na complacência aórtica, e os prejuízos na função diastólica cardíaca no grupo MA podem estar associados com a redução de defesa antioxidante (SOD), aumento de quadro pró-inflamatório (maior razão IL-6/IL-10 e redução de IL-10) e aumento de espessura da parede da aorta.

Em camundongas ApoE-KO machos, o treinamento aeróbico realizado por 15/16 semanas em intensidade moderada promoveu redução do conteúdo aterosclerótico associado a benefícios endoteliais, redução de estresse oxidativo e melhorias no perfil inflamatório⁴⁷. Em outro protocolo com treinamento físico realizado por 6 semanas em intensidade moderada, foi observado uma estabilização das placas ateroscleróticas com manutenção de perfil lipídico¹³. Estas evidências sugerem que a influência do treinamento físico aeróbico no controle e progressão de placas ateroscleróticas é dependente do número de placas estabelecidas, assim como do volume total de treinamento físico.

O grupo MA apresentou valores hemodinâmicos elevados uma vez que tanto a frequência cardíaca, como os valores pressóricos foram superiores em relação ao do grupo jovem. De fato, o aumento sistêmico da pressão arterial em ratas fêmeas idosas já havia sido reportado na literatura⁶⁶. Neste estudo, demonstramos a influência da aterosclerose neste contexto. A menor responsividade vascular previamente identificada neste modelo

⁷², a constrição vascular comumente demonstrada com a progressão da aterosclerose, e a menor eficiência dos barorreceptores identificada neste estudo podem justificar o aumento dos valores pressóricos.

É importante mencionar que o déficit da ApoE gera uma série de alterações orgânicas, como o desbalanço no metabolismo do colesterol, inflamação sistêmica, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, redução da produção de defesa antioxidante, aumento de demanda do sistema renina angiotensina e degradação da matriz extracelular ⁷⁵ que podem ter contribuído para o processo de disautonomia e prejuízos vasculares.

Estudos prévios demonstraram que a angiotensina II pode acelerar o desenvolvimento da aterosclerose em ApoE-KO ^{76,77}, aumentando a área de lesões ateroscleróticas, a vulnerabilidade das placas, ativando fenótipos MMP8 and MMP13 ⁷⁸, formando aneurismas na região da aorta e modificando a hemodinâmica ⁷⁶. Portanto, seria importante a investigação dos impactos do envelhecimento e do treinamento físico no nível de Angiotensina II nas repercussões cardiovasculares em fêmeas ApoE-KO em estudos futuros.

Diversas sociedades de cardiologia recomendam o treinamento físico aeróbico como uma estratégia não-farmacológica eficiente para manutenção/controle da hipertensão ⁷⁹. De fato, estudos prévios têm demonstrado que o treinamento físico aeróbico reduz os valores de pressão arterial em fêmeas com fatores de risco, como a ausência de hormônios ovarianos e hipertensão ³⁴⁴⁶.

Apesar deste estudo não apresentar dados de histologia vascular, os valores similares na espessura da parede da aorta nos grupos MAT e J, e a correlação positiva entre a PAM e a espessura da parede da aorta sugerem que o treinamento físico aeróbico

é capaz de promover adaptações vasculares que contribuem para um melhor controle dos valores pressóricos.

O arco aórtico é um dos locais anatômicos no qual se situam os barorreceptores arteriais. Portanto é razoável postular que a rigidez da parede aórtica pode modular a sensibilidade barorreflexa em animais vivos ⁸⁰. A associação da espessura da parede da aorta com a sensibilidade barorreflexa, a FC e a PAM reforçam o conceito de que as alterações nesta estrutura podem comprometer a sensibilidade dos barorreceptores, e subsequentemente, o equilíbrio hemodinâmico.

De fato, o treinamento físico pode estabilizar as lesões vasculares resultantes da aterosclerose independente de modificações no perfil lipídico ¹³, desde que promova ajustes na estrutura vascular, como atenuação da disfunção endotelial, inflamação e estresse oxidativo ⁴⁷, além disso, já foi demonstrado que o treinamento físico aeróbico em intensidade moderada reduz a rigidez arterial em mulheres na meia-idade ⁸¹.

O treinamento físico aeróbico parece atenuar a sobrecarga hemodinâmica, o aumento da espessura da parede da aorta e a redução da sensibilidade barorreflexa, considerando que não foram identificadas diferenças entre os grupos MAT e J. Uma hipótese para estes achados é que o treinamento físico pode ter atenuado o declínio de defesa antioxidante (SOD) e de citocinas anti-inflamatórias (IL-10), reduzindo a adesão lipídica vascular e conseqüentemente atenuando o aumento de espessura da parede aórtica, fatores que melhoraram a complacência e a capacidade de estiramento, otimizando o desempenho dos barorreceptores.

A melhora deste importante mecanismo de curto prazo de regulação da pressão arterial (barorreceptores), possivelmente está associada a redução de 10 mmHg na PAM e PAS quando comparados os grupo MAT e MA, que apesar de não ser estatisticamente

significante é relevante de ponto de vista clínico, considerando que a cada redução de 5 mmHg de pressão arterial sistólica, o risco de desenvolvimento de eventos cardiovasculares reduz em 10%⁸².

A bradicardia em repouso é um achado clássico em indivíduos treinados. De fato, o treinamento físico aeróbico promove um aumento constante do retorno venoso e do volume sistólico, mecanismos que acionam constantemente o mecanismo de Frank-Starling e modificam a contratilidade cardíaca, aumentando a eficácia do músculo cardíaco⁸³. Adicionalmente, o treinamento físico aumenta a variabilidade da frequência cardíaca em ratas fêmeas^{66,67}. No presente estudo, os camundongos fêmeas treinados não apresentaram bradicardia de repouso em relação ao grupo MA. Entretanto, o grupo meia-idade treinado apresentou valores similares ao do grupo jovem na FC, na razão E'/A', e em índices da variabilidade (VLF-PI; LF-PI). Além disso, o grupo MAT apresentou uma maior VAR-IP em comparação ao grupo MA, indicando que o treinamento físico pode promover uma melhor modulação autonômica cardíaca em fêmeas com aterosclerose no início da senescência reprodutiva.

O desequilíbrio do controle autonômico cardiovascular em conjunto com a redução da sensibilidade barorreflexa é um achado que já foi demonstrado anteriormente em ratas fêmeas idosas^{66,67}. Portanto, considerando o risco adicional promovido pela doença aterosclerótica, um menor controle autonômico era esperado no grupo MA. De fato, os dados de variabilidade da frequência cardíaca, nos domínios do tempo e frequência, demonstram uma redução da modulação autonômica cardíaca no grupo MA comparado com o grupo jovem, e refletem um quadro de disautonomia em fêmeas senescentes com aterosclerose.

Apesar do grupo MA ter uma menor banda LF-IP (parâmetro com predomínio de participação da modulação simpática cardíaca), os resultados de variabilidade da frequência cardíaca devem ser interpretados em conjunto, pois foi observado redução de todos os parâmetros, indicando que o sistema nervoso autonômico deste grupo apresenta uma menor habilidade de modular os batimentos cardíacos, independente da predominância de participação simpática ou parassimpática.

A redução de taquicardia reflexa no grupo MA demonstra a inabilidade de adaptação a grandes variações pressóricas, que podem ter sido geradas por uma redução de sensibilidade dos barorreceptores produzida pela progressão da doença aterosclerótica. Este processo pode ter prejudicado o correto funcionamento de fibras aferentes, bem como reduzido a habilidade de atuação do sistema nervoso autonômico a adaptar-se rapidamente aos estímulos devido a um longo período de hiperatividade simpática.

A correlação negativa entre a espessura da parede da aorta e a sensibilidade barorreflexa espontânea não indica concretamente que as alterações da parede da aorta modificaram a sensibilidade dos barorreceptores. Entretanto, o dado sugere que há uma associação entre a progressão ou estabilização da doença com o controle autonômico cardiovascular em fêmeas com aterosclerose.

Alguns mecanismos já descritos na literatura podem facilitar a compreensão acerca do processo de disautonomia observado em animais ApoE-KO. De fato, existe uma redução de eficiência dos barorreceptores arteriais, resultante de danos sistêmicos em suas aferências, por produção de citocinas pro-inflamatórias, ativação da Angiotensina II, degradação da matriz extracelular, favorecendo o depósito de lipídeos e estabelecendo a aterosclerose ⁷⁵. Além da menor eficiência barorreflexa, ocorre redução de defesa antioxidante com aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e

redução da biodisponibilidade de óxido nítrico, fatores que favorecem o desenvolvimento da hiperativação nervosa simpática ⁷⁵ .

A inflamação sistêmica é um achado clássico que ocorre com a progressão da aterosclerose ⁸. Estudos anteriores demonstraram que as alterações inflamatórias que ocorrem no baço são similares as que ocorrem no sistema cardiovascular de ratos ⁸⁴. Desta forma, era esperado que o envelhecimento promovesse maior razão IL-6/IL-10, reduzisse a citocina anti-inflamatória IL-10 e a defesa antioxidante (SOD). De fato, com o avanço da aterosclerose no processo de envelhecimento, ocorre o aumento de estresse oxidativo (aumento de espécies reativas de oxigênio em relação a defesa antioxidante) e inflamação sistêmica em animais ApoE-KO ⁴⁰.

Entretanto, é essencial mencionar que o treinamento físico aeróbico reestabeleceu a IL-10 e atenuou a redução de modulação autonômica cardíaca. Uma hipótese para este achado é a ativação do reflexo colinérgico anti-inflamatório pelo sistema nervoso autonômico ³⁵. No entanto a maior razão IL-6/IL-10 no grupo treinado sugere que houve manutenção da inflamação sistêmica, indicando que os benefícios cardiovasculares promovidos pelo treinamento físico foram determinados predominantemente por outros sistemas, como a modulação autonômica cardiovascular.

A redução da sensibilidade barorreflexa no grupo MA reforça a instauração da disautonomia e demonstra uma menor habilidade de adaptação a variações pressóricas. Estes dados são extremamente preocupantes considerando que indivíduos com menor sensibilidade barorreflexa e modulação autonômica cardíaca apresentam menor taxa de sobrevivência ⁸⁵. Em contrapartida, o treinamento físico aeróbico é capaz de promover melhorias na sensibilidade barorreflexa e um melhor prognóstico em pacientes, mesmo em condições extremas, como pós infarto agudo do miocárdio ⁸⁶. Adicionalmente, há evidências que o treinamento físico aeróbico é capaz de promover um melhor controle autonômico cardiovascular em camundongos ⁵⁵.

No presente estudo, o treinamento físico aeróbico teve efeitos positivos, se considerarmos que não se observou aumento de espessura da aorta, enquanto tanto a modulação autonômica cardíaca quanto a sensibilidade dos barorreceptores permaneceram dentro de valores de normalidade, em fêmeas com aterosclerose. Estes dados sugerem que o treinamento físico é uma estratégia eficaz para controlar a progressão de placas ateroscleróticas, atenuar a disautonomia e mitigar as modificações cardiovasculares decorrentes do processo de envelhecimento.

4.4 Considerações finais do capítulo 1

O processo de envelhecimento promoveu disfunção diastólica cardíaca, maior espessura da parede da aorta, prejuízos hemodinâmicos, disautonomia, maior perfil inflamatório e menor defesa antioxidante cardíaca em fêmeas com aterosclerose no início da senescência reprodutiva. No grupo treinado não se observou os danos promovidos pelo processo de envelhecimento. Portanto, o treinamento físico é uma estratégia eficiente para promoção de benefícios sistêmicos em camundongos fêmeas senescentes com aterosclerose.

CAPÍTULO 2

No segundo capítulo avaliou-se a influência de diferentes períodos (9 ou 12 meses) de ausência de hormônios ovarianos em desfechos cardiovasculares, autonômicos, inflamatórios e de estresse oxidativo cardíaco em camundongos fêmeas ApoE-KO.

4.1 Delineamento experimental do capítulo 2

Foram utilizados 3 grupos experimentais: camundongos fêmeas adultas na meia-idade (MA), fêmeas ApoE-KO com 15 meses de vida; camundongos fêmeas adultas na meia-idade submetidas a ooforectomia (O), fêmeas ApoE-KO acompanhadas até o 15^o mês de vida submetidas ao procedimento cirúrgico no 6^o mês de protocolo; camundongos fêmeas adultas na meia-idade submetidas a ooforectomia precocemente (OP), fêmeas ApoE-KO acompanhadas até o 15^o mês de vida submetidas ao procedimento cirúrgico no 3^o mês de protocolo. Na figura 16 o delineamento experimental deste capítulo é apresentado.

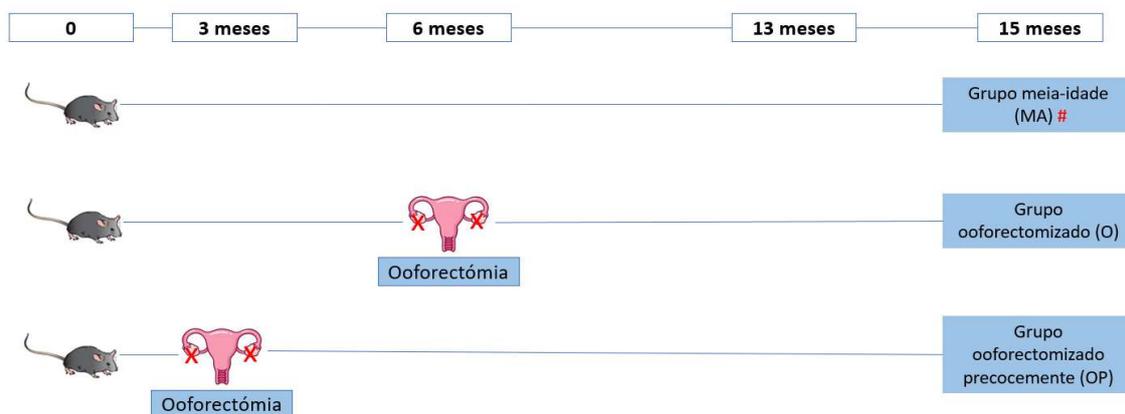


Figura 16. Delineamento experimental do capítulo 2. # = grupo experimental utilizado no capítulo 1.

Os dados do grupo meia-idade são os mesmos apresentados do capítulo 1. Foi escolhido o acompanhamento até o 15º mês de vida por ser o momento em que a literatura aponta estar estabelecida a senescência reprodutiva em camundongos^{10,43}. Para avaliar a influência da ausência dos hormônios ovarianos, a ooforectomia foi realizada no período em que os animais atingiram a maturidade (vida adulta): no início da idade adulta (3º mês de vida) ou quando a idade adulta já estava estabelecida (6º mês de vida)⁴³.

4.6 Resultados do capítulo 2

Não foram identificadas modificações na composição corporal (peso corporal, $p=0,15$; peso de tecido adiposo branco, $p=0,46$; peso de gastrocnêmio, $p=0,35$; peso de sóleo, $p=0,58$). Não foram identificadas, também, modificações na capacidade de corrida ($p=0,23$).

No entanto, foram observadas diversas modificações na morfometria cardíaca (Figura 17). O grupo OP apresentou maior septo interventricular diastólico e diâmetro do átrio esquerdo em comparação com o grupo de meia-idade (painéis A e B, respectivamente), enquanto o grupo O apresentou maior espessura da parede posterior e espessura relativa da parede posterior do ventrículo esquerdo (painéis C e D, respectivamente) em relação ao grupo de meia-idade.

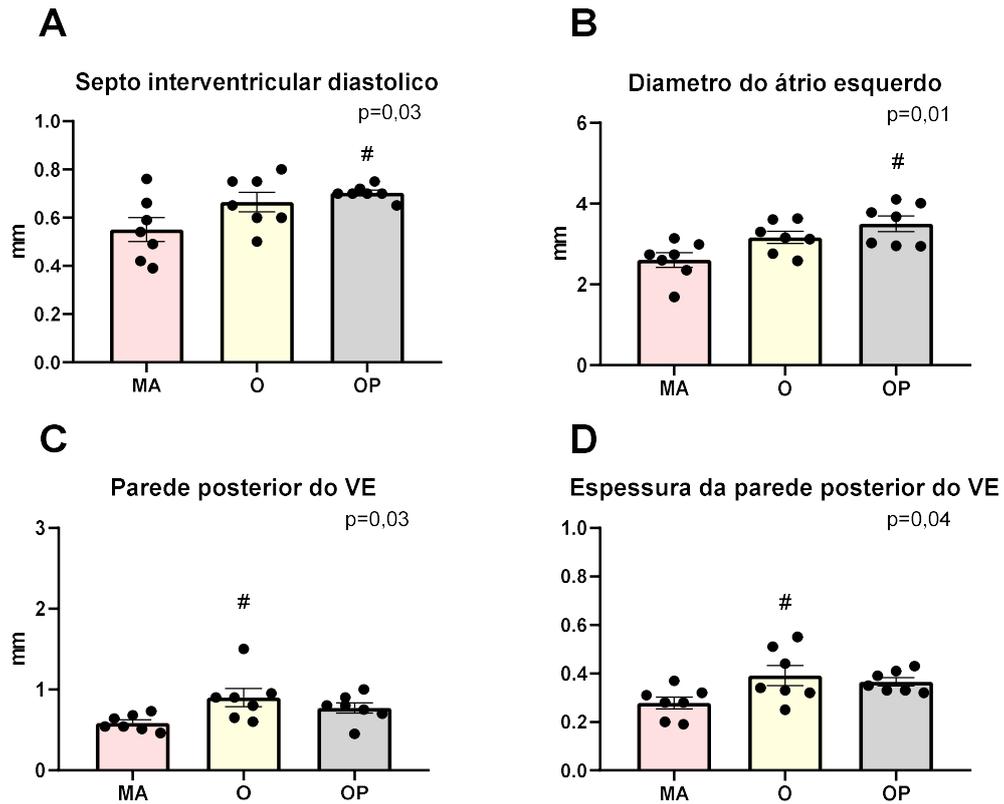


Figura 17: Parâmetros de morfometria cardíaca. **A)** Septo interventricular diastólico; **B)** Diâmetro do átrio esquerdo; **C)** Parede posterior do ventrículo esquerdo; **D)** Espessura relativa da parede posterior do ventrículo esquerdo; **Grupos:** Adultas na meia-idade (MA), Ooforectomizadas (O); Ooforectomizadas precocemente (OP). # $p < 0,05$ vs. MA.

Os grupos experimentais foram equivalentes nos demais parâmetros analisados através da ecocardiografia (tabela 2).

Tabela 2 Parâmetros ecocardiográficos

Parâmetros	Grupos			Valor de <i>P</i> para Anova <i>one-way</i>
	MA	O	OP	
Morfometria cardíaca e vascular				
Espessura da parede da aorta (mm)	0,21±0,01	0,22±0,01	0,20±0,02	0,19
Massa VE (mm)	63,5±6,6	89,8±9,4	87,9±8,7	0,06
Função diastólica cardíaca				
TRIV (ms)	14,94±0,6	15,54±1,1	16,9±1,4	0,42
Volume diastólico (μl)	75,77±7,1	74,65±8,3	73,5±6,8	0,97
Razão E/E'	27,63±4,8	38,47±5,7	34,85±3,7	0,29
Razão E/A	1,10±0,1	1,32±0,2	1,24±0,1	0,32
Razão E'/A'	1,13±0,2	0,61±0,1	0,85±0,1	0,22
Função sistólica cardíaca				
FE (%)	45,31±4,1	51,18±3,1	47,23±2,8	0,47
FS (%)	22,5±2,3	25,89±1,9	23,51±1,8	0,49
Volume sistólico (μl)	42,02±6,0	36,96±5,3	42,7±4,4	0,70
Débito cardíaco (ml/min)	16315±2125	18567±2432	17752±2190	0,77

Grupos: Adultas na meia-idade (MA); Ooforectomizadas (O); Ooforectomizadas precocemente (OP). VE = ventrículo esquerdo; TRIV= tempo de relaxamento isovolumétrico; FE = fração de ejeção; FS= fração de encurtamento.

A figura 18 apresenta os parâmetros hemodinâmicos, respectivamente, pressão arterial sistólica (painel A), pressão arterial diastólica (painel B), pressão arterial média (painel C) e frequência cardíaca (painel D). Os grupos experimentais foram equivalentes nestes parâmetros.

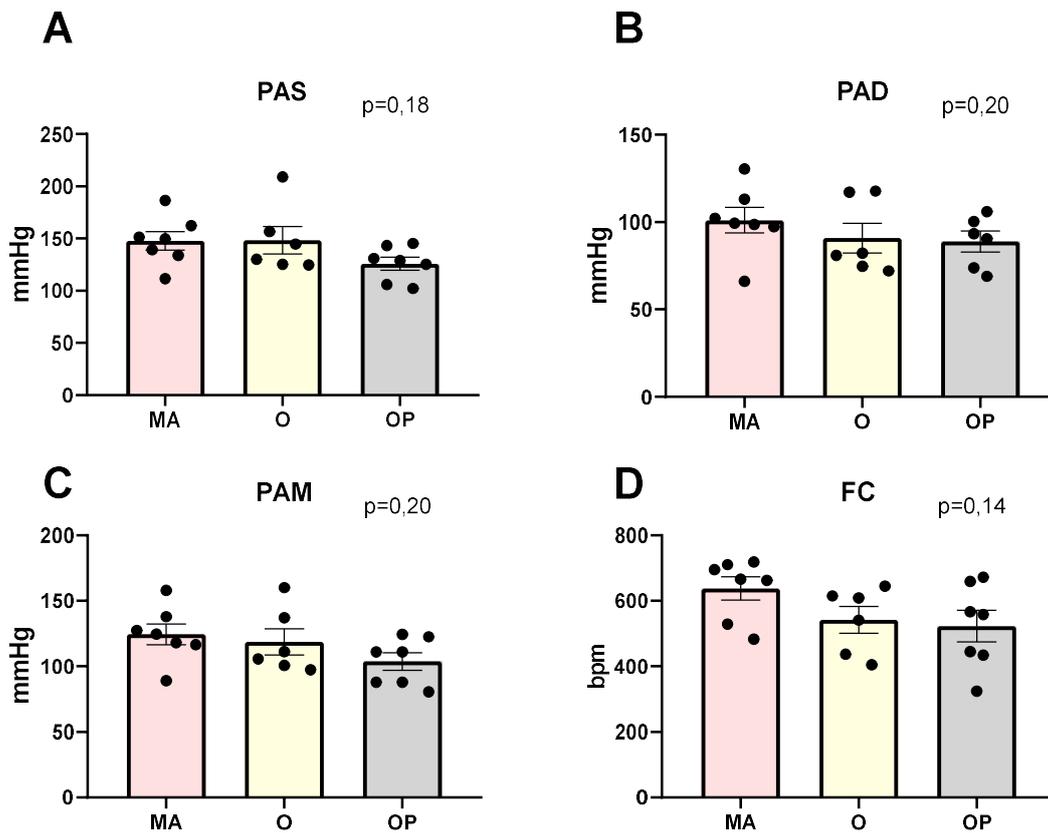


Figura 18: Parâmetros Hemodinâmicos. **A)** Pressão Arterial Sistólica. **B)** Pressão Arterial Diastólica. **C)** Pressão Arterial Média. **D)** Frequência Cardíaca. **Grupos:** Adultas (A); ooforectomizadas (O); ooforectomizadas precocemente (OP).

Os grupos experimentais foram equivalentes nas análises de sensibilidade barorreflexa realizadas após a administração de drogas vasoativas (resposta bradicárdica reflexa $p=0,52$; reposta taquicárdica reflexa $p=0,41$). A ausência dos hormônios ovarianos gerou uma grande instabilidade nos sinais de pressão arterial nos animais dos grupos ooforectomizados. Como consequência, foi inviável a obtenção de sinais estacionários adequados para análise da modulação autonômica cardíaca no domínio do tempo, bem como executar a avaliação da sensibilidade barorreflexa espontânea.

Na figura 19 apresentamos os dados de modulação autonômica cardíaca no domínio da frequência. No painel A é apresentado o gráfico com os dados de banda de baixa frequência do intervalo de pulso (indicador predominantemente de modulação simpática cardíaca); no painel B é apresentado o gráfico com os dados de banda de alta frequência do intervalo de pulso (indicador de modulação parassimpática cardíaca); no painel C é apresentado a razão entre a banda de baixa frequência com a banda de alta frequência (balanço simpatovagal).

O grupo ooforectomizado precocemente apresentou maior banda de baixa frequência do intervalo de pulso e menor da banda de alta frequência do intervalo de pulso em relação ao grupo ooforectomizado. Adicionalmente, foi observado maior balanço simpatovagal no grupo ooforectomizado precocemente em relação aos demais grupos.

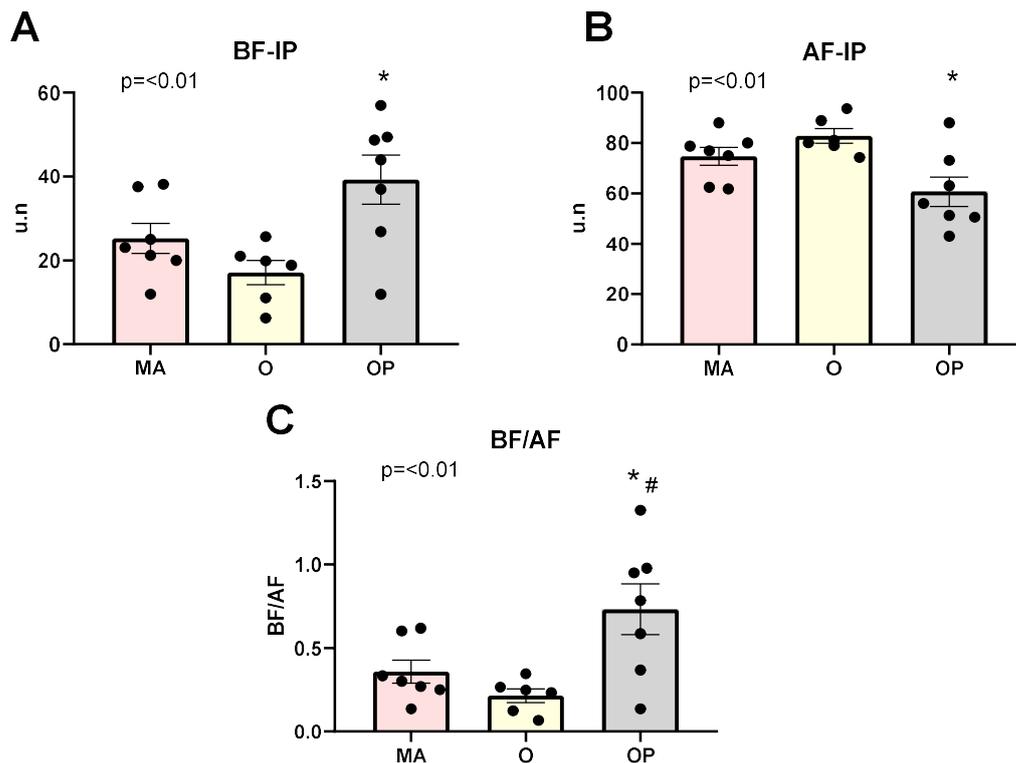


Figura 19: Parâmetros de modulação autonômica cardíaca no domínio da frequência. **A)** banda de baixa frequência do intervalo de pulso; **B)** banda de alta frequência do intervalo de pulso; **C)** Balanço simpatovagal; **Grupos:** Adultas na meia-idade (MA), Ooforectomizadas (O); Ooforectomizadas precocemente (OP). # $p < 0,05$ vs. MA; * $p < 0,05$ vs. O.

Na figura 20 apresentamos os dados de modulação da pressão arterial sistólica (indicadores da modulação simpática vascular), respectivamente, variância da pressão arterial sistólica (painel A) e banda de baixa frequência da pressão arterial sistólica (painel B). Não foram identificadas diferenças estatísticas na variância de pressão arterial sistólica; entretanto, o grupo ooforectomizado precocemente (OP) apresentou valores superiores de banda de baixa frequência em relação aos demais grupos.

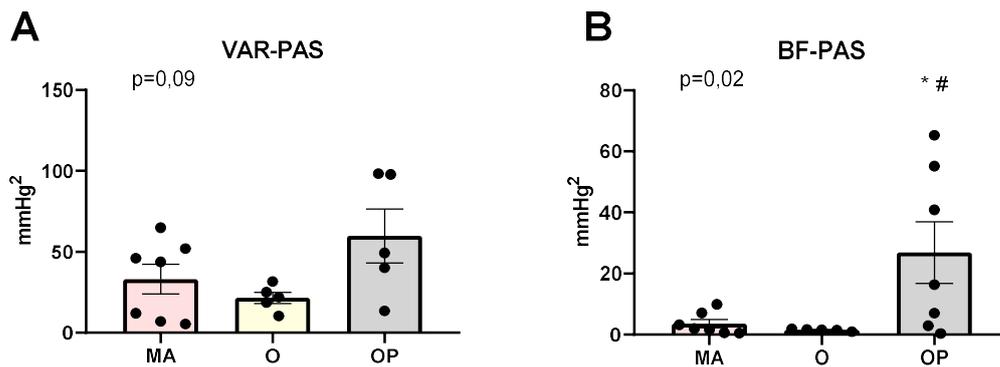


Figura 20: Parâmetros de modulação da pressão arterial sistólica. **A)** Variância da pressão arterial sistólica; **B)** banda de baixa frequência da pressão arterial sistólica; **Grupos:** Adultas na meia-idade (MA), Ooforectomizadas (O); Ooforectomizadas precocemente (OP). # $p < 0,05$ vs. MA; * $p < 0,05$ vs. O.

Não foram identificadas modificações no TNF- α ($p=0,49$) e na razão TNF- α /IL-10 ($p=0,51$). No entanto, os demais indicadores de inflamação foram modificados pela ausência de hormônios ovarianos. Como é possível observar na Figura 21 o grupo ooforectomizado precocemente apresentou maior quantidade de IL-6 (painel A) em comparação ao grupo meia-idade e maior quantidade de IL-10 (painel B) em relação aos grupos meia-idade e ooforectomizado. Adicionalmente, ambos os grupos ooforectomizados (O e OP) apresentaram maior razão IL6/IL-10 (painel C) em relação ao grupo MA.

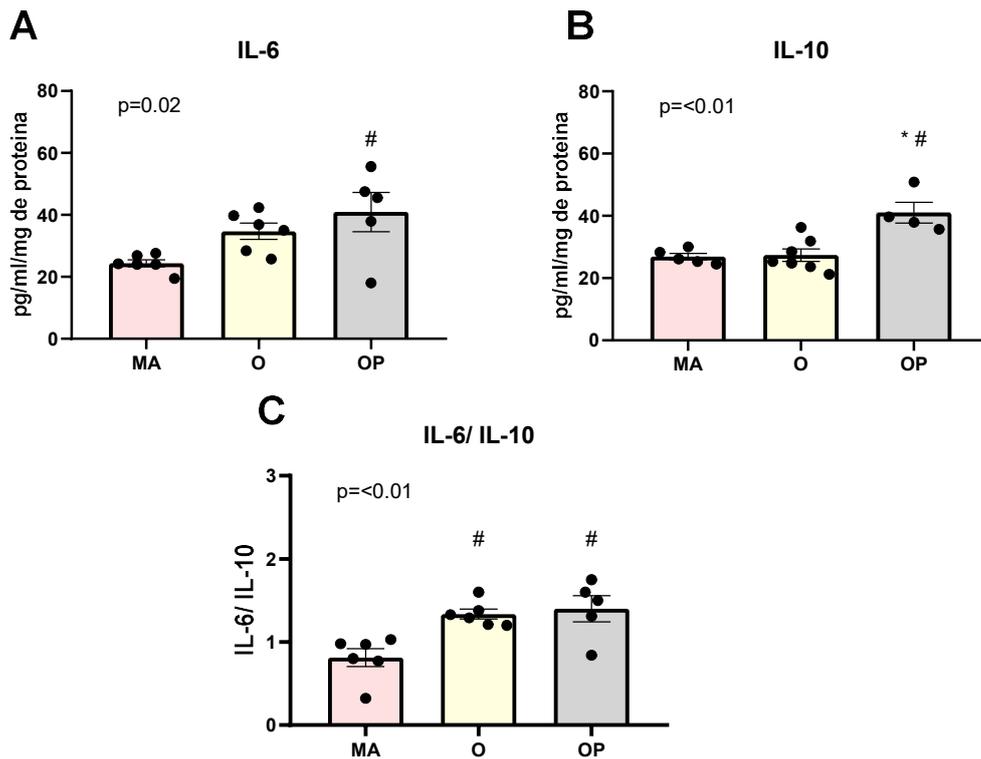


Figura 21: Mediadores inflamatórios. **A)** Interleucina-6; **B)** Interleucina-10; **C)** Razão da interleucina-6 em relação a Interleucina-10; **Grupos:** Adultas na meia-idade (MA), Ooforectomizadas (O); Ooforectomizadas precocemente (OP). # $p<0,05$ vs. MA; * $p<0,05$ vs. O.

Na tabela 3 estão descritos os dados de estresse oxidativo cardíaco e o percentual de colágeno cardíaco. A única modificação observada nestes parâmetros foi a menor capacidade de defesa antioxidante no grupo ooforectomizado precocemente, representada por uma menor atividade de superóxido dismutase em relação ao grupo meia-idade.

Tabela 3. Estresse oxidativo e colágeno cardíaco

Parâmetros	Grupos			Valor de <i>P</i> para Anova <i>one-way</i>
	MA	O	OP	
Indicadores de estresse oxidativo				
NADPH oxidase (mm)	0,10±0,01	0,10±0,01	0,08±0,01	0,70
Peróxido de hidrogênio (mm)	6,49±1,20	8,51±1,95	8,14±1,56	0,59
Nitrito	2,50±0,48	1,64±0,24	1,62±0,19	0,11
Superóxido dismutase	7,74±0,86	5,86±0,40	4,38±0,49 #	<0,01
Catalase	0,34±0,04	0,32±0,03	0,37±0,08	0,24
FRAP	0,44±0,08	0,54±0,06	0,50±0,04	0,50
Lipoperoxidação (TBARS)	31,52±4,46	29,96±1,72	21,63±2,66	0,12
Oxidação proteica (Carbonilas)	45,31±4,1	51,18±3,1	47,23±2,8	0,47
Colágeno cardíaco				
Colágeno cardíaco (%)	1,67±0,1	1,51±0,2	1,52±0,4	0,92

Grupos: Adultas na meia-idade (MA), Ooforectomizadas (O); Ooforectomizadas precocemente (OP). #*p*< 0,05 vs. MA.

A tabela 4 apresenta o sumário dos resultados do capítulo 2.

Tabela 4. Sumário dos resultados do capítulo 2.

Parâmetros	Grupo Ooforectomizado	Grupo Ooforectomizado Precocemente
Alterações morfométricas cardíacas	↑ #	↑ #
Modulação Parassimpática Cardíaca (AF-IP)		↓ *
Modulação Simpática Cardíaca (BF-IP)		↑ *
Balço Simpatovagal (BF/AF)		↑ * #
Modulação Simpática Vascular (BF-PAS)		↑ * #
Perfil inflamatório (IL-6 ; IL-6/IL-10)	↑ #	↑↑ #
Defesa antioxidante cardíaca (Superóxido dismutase)		↓ #

↓ = redução do parâmetro; ↑ = aumento do parâmetro; #p < 0.05 vs. grupo adultas na meia-idade; *p < 0.05 vs. grupo ooforectomizadas; letras ou símbolos na cor vermelha somente um dos parâmetros;

4.7 Discussão do capítulo 2

Neste capítulo analisou-se a influência da exposição à privação ovarina em desfechos cardiovasculares, autonômicos, inflamatórios e de estresse oxidativo cardíaco em camundongos fêmeas ApoE-KO. Ambos os grupos ooforectomizados apresentaram modificações na morfometria cardíaca e maior perfil inflamatório. Contudo os principais achados deste capítulo foram que o grupo submetido a um maior período de privação ovariana (o grupo ooforectomizado precocemente) apresentou piores desfechos na modulação autonômica cardiovascular e redução de defesa antioxidante cardíaca.

Independentemente do período da ooforectomia, observou-se modificações na morfometria do músculo cardíaco e maior perfil inflamatório (razão IL-6/IL-10) nos grupos ooforectomizados (O e OP) em relação ao grupo intacto (MA). Os hormônios estrógenos atuam em vias anti-apoptóticas, com ativação de vias protetivas (PI3K/AKT) e apresentam capacidade de atenuar a inflamação⁸⁷. Considerando que a inflamação crônica é uma característica da doença aterosclerótica, espera-se observar repercussões deletérias no tecido cardíaco decorrentes ao processo inflamatório crônico exacerbado em fêmeas ooforectomizadas.

Em estudo que comparou a prevalência de insuficiência cardíaca em mulheres com aterosclerose que vivenciaram a menopausa precocemente de forma espontânea ou cirurgicamente (abaixo dos 45 anos de idade) em relação à mulheres que vivenciaram a menopausa na idade esperada, foi observado no *baseline* que as mulheres que tiveram a menopausa precocemente tendem a ter maior quantidade de IL-6 e resistência à ação da insulina, adicionalmente, após o acompanhamento de 8 anos, foi demonstrado que essa população apresenta maior incidência de desenvolvimento de insuficiência cardíaca⁸⁸. De fato, uma revisão sistemática demonstrou que mulheres que vivenciaram a experiência

da menopausa precocemente têm maior risco de desenvolver DAC e maior mortalidade em comparação com as mulheres que vivenciam a menopausa tardiamente ⁸⁹.

Quando se compara mulheres com a menopausa prematura (abaixo de 40 anos de idade), seja de forma espontânea ou cirúrgica, em relação a mulheres que vivenciaram a menopausa em períodos subsequentes (após os 40 anos de idade), observa-se mais que o dobro de chances de desenvolvimento de DAC (1,5% vs. 3,7%) nas mulheres que perderam as funções reprodutivas, nesse caso, após procedimentos cirúrgicos ⁹⁰. Adicionalmente, essa população tende a ter maior incidência de hipertensão, dislipidemia e quantidade de LDL e proteína C reativa circulantes ⁹⁰. Estes dados de estudos clínicos reforçam que há um quadro pró-aterogênico e pró-inflamatório mediante a exposição a um maior período de ausência dos hormônios reprodutivos femininos no processo de envelhecimento.

No entanto, apesar das repercussões na morfometria cardíaca, os desfechos de função sistólica e diastólica cardíaca, assim como a hemodinâmica, permaneceram equivalentes aos do grupo que permaneceu intacto durante todo o protocolo (grupo Meia-Idade). Além disso, o percentual de colágeno cardíaco foi similar em todos os grupos experimentais. Portanto, embora tenham sido observadas modificações no músculo cardíaco, essas alterações não promoveram grande repercussões nos desfechos cardiovasculares e a histologia cardíaca manteve-se equivalente entre os grupos experimentais.

Em estudo com ratas idosas submetidas a ooforectomia, foi relatado que a ausência dos hormônios ovarianos promoveu menor capacidade funcional e menor sensibilidade barorreflexa (reposta bradicárdica reflexa) quando comparadas a ratas idosas controle. No entanto, não se observou prejuízos adicionais decorrentes da

ooforectomia em parâmetros cardiovasculares e no perfil inflamatório ⁶⁶. Em outro experimento desenvolvido com ratas idosas, a ooforectomia não modificou desfechos metabólicos, hemodinâmicos ou de sensibilidade barorreflexa quando comparadas a ratas idosas controle ⁶⁷.

Portanto, parece que os efeitos da privação ovariana na função cardíaca e hemodinâmica podem ser considerados mais brandos quando a comparação é realizada com roedores fêmeas que já passaram previamente pelo processo de envelhecimento, e consequentemente, já apresentam o sistema cardiovascular com menor funcionalidade.

Contudo as modificações relacionadas ao estresse oxidativo são bem características com a privação ovariana, mesmo em ratas envelhecidas. Já foi demonstrado que a ausência dos hormônios ovarianos pode promover um menor balanço redox de glutathiona (GSH/GSSG), indicando prejuízo no equilíbrio redox cardíaco, quando comparadas a ratas idosas controle ⁶⁶. Em outro estudo que também utilizou ratas idosas ooforectomizadas, foi demonstrado que a ausência de hormônios ovarianos prejudica a defesa antioxidante renal, gerando menor atividade de superóxido dismutase e catalase ⁶⁷.

No presente estudo, o grupo OP apresentou menor defesa antioxidante cardíaca através da menor atividade de superóxido dismutase (SOD) (vs. grupo MA). Este dado, em conjunto com o aumento de perfil inflamatório (IL-6 e IL-6/IL-10) e o consenso de quadro pró-apoptótico com a ausência de estrógenos ⁸⁷, pode ser o mecanismo chave para as repercussões na morfometria cardíaca do grupo ooforectomizado precocemente.

É importante destacar que, com a aterosclerose, ocorre a oxidação de LDL na camada interna do leito vascular. Este processo promove a ativação de macrófagos e monócitos que inibem a expressão de SOD ⁴⁰, justificando a redução de atuação desta

importante enzima antioxidante. Portanto, pode se considerar que o grupo OP apresentou uma menor quantidade de SOD através de uma ação inibitória acentuada para a produção desta enzima, considerando um maior perfil inflamatório (maior quantidade de IL-6, citocina pró-inflamatória) neste grupo experimental.

Apesar de não terem sido observadas modificações no tônus vagal e no tônus simpático em estudo anterior que comparou ratas idosas ooforectomizadas em relação a ratas idosas controle ⁶⁶, o presente estudo demonstra que a ausência precoce dos hormônios estrógenos acarreta piores repercussões na modulação autonômica cardiovascular de fêmeas com aterosclerose na meia-idade. O grupo OP apresentou maior modulação simpática vascular e balanço simpatovagal em relação aos demais grupos (MA e O). Adicionalmente, o grupo OP apresentou maior banda BF-IP e menor banda AF-IP em relação ao grupo O.

Vale mencionar que a diferença no período da ooforectomia entre os grupos O e OP está relacionada ao estágio de maturidade fisiológica dos animais. O grupo OP foi ooforectomizado no terceiro mês, período em que os animais iniciam a idade adulta, enquanto a ooforectomia no grupo O foi realizada no sexto mês, quando os animais já são adultos consolidados ⁴³. Portanto, o período superior de ausência da proteção dos hormônios estrógenos parece promover repercussões deletérias na capacidade de modulação autonômica cardiovascular.

Uma hipótese em potencial para o desequilíbrio na modulação autonômica cardiovascular em animais ooforectomizados é que a ausência de estrógenos pode provocar repercussões deletérias, modificando a expressão de ocitocina e a capacidade de atuação dos neurônios pré-autonômicos do núcleo paraventricular (PVN) no hipotálamo ⁹¹. Em um experimento com ratas jovens, a privação ovariana promoveu maior modulação

simpática cardiovascular, maior relação BF/AF, menor modulação parassimpática cardíaca, redução do mRNA da ocitocina no PVN e menor expressão proteica de ocitocina em todos os subnúcleos pré-autonômicos do PVN. Adicionalmente, os níveis reduzidos de ocitocina foram negativamente correlacionados com o aumento da relação BF/AF ⁹¹.

Quando há uma maior atividade de ânion superóxido no PVN, os roedores tendem a ter uma hiperativação simpática com redução de atuação de enzimas antioxidantes ⁹². No presente estudo o grupo OP apresentou aumento da razão BF/AF e redução de SOD no músculo cardíaco, portanto, um desequilíbrio em potencial relacionado ao balanço redox pode ter contribuído adicionalmente para os piores desfechos na modulação autonômica cardiovascular.

4.8 Considerações finais do capítulo 2

A privação ovariana modifica a morfometria cardíaca e promove maior perfil inflamatório em fêmeas com aterosclerose na meia-idade. Contudo, quando a ausência dos hormônios ovarianos ocorre precocemente, observam-se prejuízos na modulação autonômica cardiovascular e uma menor defesa antioxidante cardíaca.

CAPÍTULO 3

O terceiro capítulo apresenta os efeitos do treinamento físico aeróbio em desfechos cardiovasculares, sensibilidade barorreflexa, inflamação e estresse oxidativo cardíaco em camundongos fêmeas ApoE-KO na meia-idade, ooforectomizadas.

4.9 Delineamento experimental do capítulo 3

Foram utilizados 4 grupos experimentais neste protocolo:

O **grupo controle sedentário** foi constituído pelo os camundongos fêmeas ApoE-KO adultas na meia-idade (**grupo MA**), acompanhadas até o 15º mês de vida;

O **grupo ooforectomizado sedentário** são os camundongos fêmeas adultas na meia-idade submetidas a ooforectomia (**grupo O**): fêmeas ApoE-KO acompanhadas até o 15º mês de vida submetidas ao procedimento cirúrgico de retirada dos ovários no 6º mês de protocolo;

O **grupo controle treinado** são os camundongos fêmeas adultas na meia-idade treinadas (**grupo MAT**): fêmeas ApoE-KO acompanhadas até o 15º mês de vida submetidas a treinamento físico nas últimas 6 semanas de protocolo;

O **grupo treinado ooforectomizado** são os camundongos fêmeas adultas na meia-idade submetidas a ooforectomia treinadas (**grupo OT**): fêmeas ApoE-KO acompanhadas até o 15º mês de vida submetidas ao procedimento cirúrgico de retirada dos ovários no 6º mês de protocolo, treinadas nas últimas 6 semanas de protocolo.

Na figura 22 apresenta-se o delineamento experimental do capítulo 3.

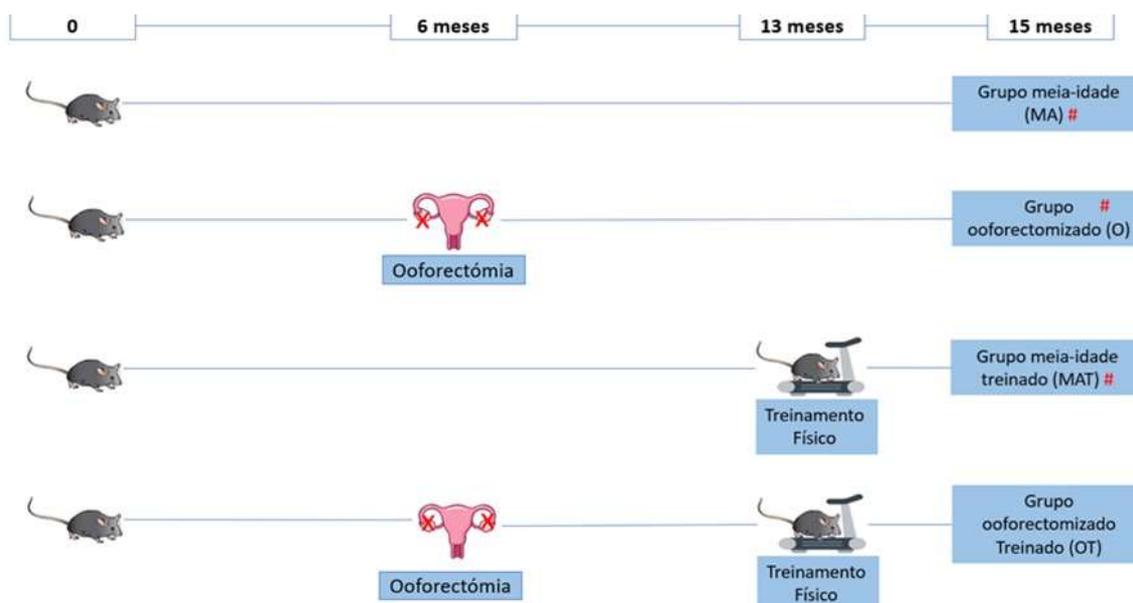


Figura 22: Delineamento experimental. # = grupos experimentais utilizados nos capítulos 1 e 2.

Os grupos meia-idade, foram acompanhados até o 15^o mês de vida, por ser o momento em que a literatura aponta estar estabelecida a senescência reprodutiva em camundongos ^{10,43}. O treinamento aeróbico foi prescrito nas últimas 6 semanas de protocolo por ter evidências prévias que é um período efetivo para atenuar os efeitos deletérios da aterosclerose nas artérias ⁵². Optamos por realizar a ooforectomia no 6^o mês de protocolo por ser um período em que os animais já estavam maduros fisiologicamente (vida adulta) ^{10,43}. Portanto, neste capítulo avaliou-se o impacto da ausência dos hormônios ovarianos na vida adulta de fêmeas com aterosclerose e o efeito do treinamento físico neste contexto.

Os grupos experimentais foram comparados por Análise de variância de duas vias (*Anova Two-way*), sendo os fatores de interesse a ooforectomia e o treinamento físico.

4.10 Resultados do capítulo 3

Não foram observadas diferenças em relação ao peso corporal, peso de tecido adiposo branco e peso do sóleo. Entretanto, o treinamento físico e a ausência de hormônios ovarianos promoveram modificações no peso de gastrocnêmio (painel A), na capacidade de corrida (painel B) e no peso do coração (painel C) (Figura 23). Os grupos treinados (MAT e OT) apresentaram maior capacidade de corrida e maior quantidade de músculo gastrocnêmio em relação aos grupos sedentários (MA e O). Adicionalmente, os grupos ooforectomizados (O e OT) apresentaram menor massa cardíaca em relação aos grupos controle (MA e MAT).

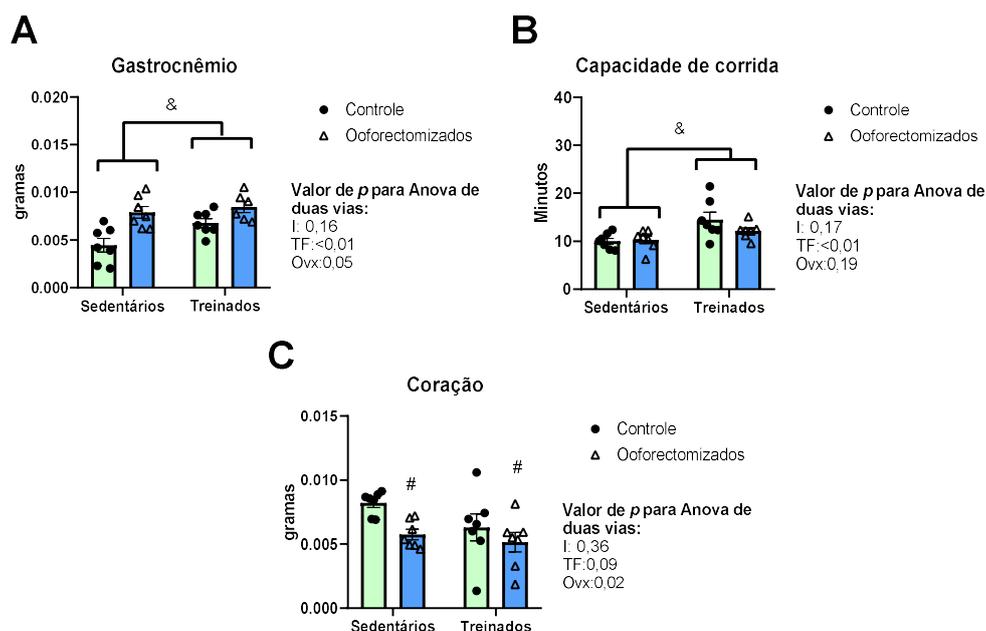


Figura 23: Capacidade de corrida e composição corporal. **A)** Músculo gastrocnêmio; **B)** Capacidade de corrida; **C)** Massa cardíaca; **Grupos sedentários:** Adultas na meia-idade (MA) e ooforectomizadas (O); **Grupos treinados:** Adultas na meia-idade treinadas (MAT) e ooforectomizadas treinadas (OT); **Grupos Controle:** Adultas na meia-idade (MA) Adultas na meia-idade treinadas (MAT); **Grupos Ooforectomizados:** ooforectomizadas (O) e ooforectomizadas treinado (OT). Dados comparados por Análise de variância de duas vias: valor de p da interação representado por I; valor de p do treinamento físico representado por TF; valor de p da ooforectomia representado por Ovx; &p < 0,05 vs. grupos sedentário; #p < 0,05 vs. grupos controle.

Não foram identificadas modificações na espessura da parede da aorta e no diâmetro da cavidade do ventrículo esquerdo na diástole. No entanto, a figura 24 demonstra que a ooforectomia promoveu diversas alterações no ventrículo esquerdo (VE). Os animais ooforectomizados (O; OT) apresentaram maior massa do VE; septo interventricular na diástole; diâmetro da parede na diástole; espessura relativa da parede em relação aos grupos controle (MA; MAT).

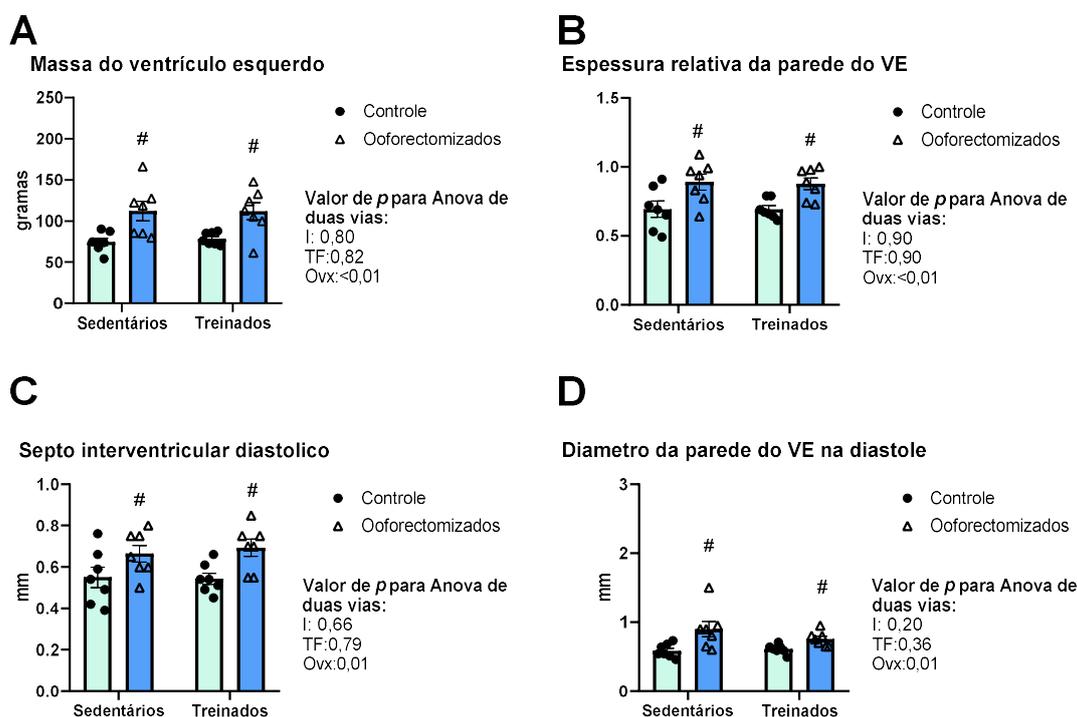


Figura 24: Morfometria cardíaca. **A)** Massa do ventrículo esquerdo; **B)** Espessura relativa da parede do ventrículo esquerdo; **C)** Septo interventricular diastólico; **D)** Diâmetro da parede do ventrículo esquerdo na diástole; **Grupos sedentários:** Adultas na meia-idade (MA) e ooforectomizadas (O); **Grupos treinados:** Adultas na meia-idade treinadas (MAT) e ooforectomizadas treinadas (OT); **Grupos Controle:** Adultas na meia-idade (MA) e adultas na meia-idade treinadas (MAT); **Grupos Ooforectomizados:** ooforectomizadas (O) e ooforectomizadas treinado (OT). Dados comparados por Análise de variância de duas vias: valor de p da interação representado por I; valor de p do treinamento físico representado por TF; valor de p da ooforectomia representado por Ov; # $p < 0,05$ vs. grupos controle.

Não foram observadas diferenças nos parâmetros de função sistólica cardíaca (volume sistólico cardíaco, débito cardíaco e fração de ejeção), bem como o volume diastólico cardíaco foi equivalente entre os grupos experimentais. Entretanto, o treinamento físico e a ausência de hormônios ovarianos promoveram modificações na função diastólica cardíaca (Figura 25). Os grupos treinados (grupo MAT e OT) apresentaram maior razão E/A e TRIV em relação aos grupos sedentários (MA e O). Adicionalmente, os grupos ooforectomizados (O e OT) apresentaram: menor razão E'/A'; maior razão E/E'; maior TRIV; em relação aos grupos controle (MA e MAT).

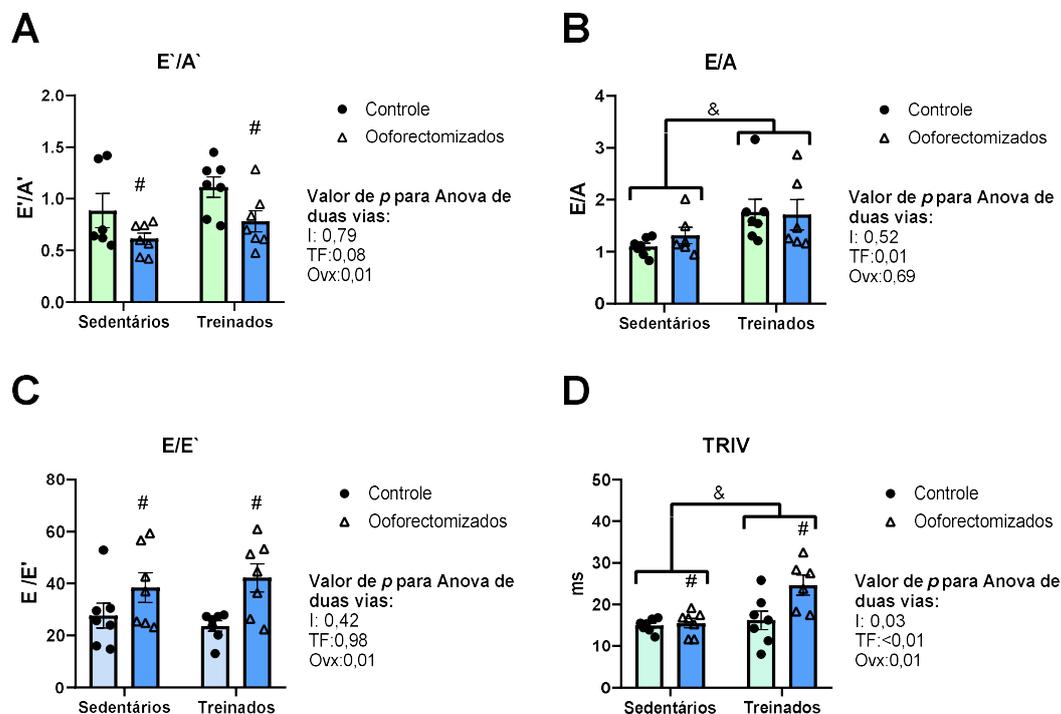


Figura 25: Parâmetros de função diastólica cardíaca. **A)** Razão E'/A'; **B)** Razão E/A; **C)** Razão E/E'; **D)** Tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) **Grupos sedentários:** Adultas na meia-idade (MA) e ooforectomizadas (O); **Grupos treinados:** Adultas na meia-idade treinadas (MAT) e ooforectomizadas treinadas (OT). **Grupos Controle:** Adultas na meia-idade (MA) e adultas na meia-idade treinadas (MAT); **Grupos Ooforectomizados:** ooforectomizadas (O) e ooforectomizadas treinado (OT). Dados comparados por Análise de variância de duas vias: valor de p da interação representado por I; valor de p do treinamento físico representado por TF; valor de p da ooforectomia representado por Oxv; &p < 0,05 vs. grupos sedentário; #p < 0,05 vs. grupos controle.

A figura 26 apresenta os parâmetros hemodinâmicos, respectivamente, pressão arterial sistólica (painel A), pressão arterial diastólica (painel B), pressão arterial média (painel C) e frequência cardíaca (painel D). Os grupos experimentais foram equivalentes nestes parâmetros.

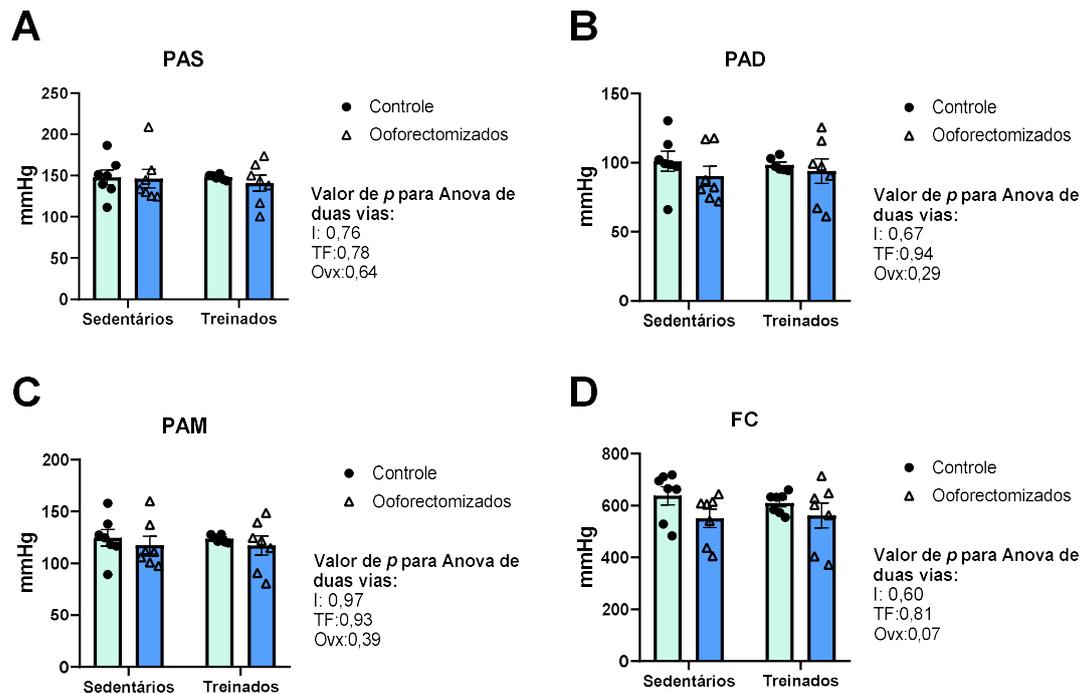


Figura 26: Parâmetros hemodinâmicas. **A)** Pressão arterial sistólica; **B)** Pressão arterial diastólica; **C)** Pressão arterial média; **D)** Frequência cardíaca. **Grupos sedentários:** Adultas na meia-idade (MA) e ooforectomizadas (O); **Grupos treinados:** Adultas na meia-idade treinadas (MAT) e ooforectomizadas treinadas (OT); **Grupos Controle:** Adultas na meia-idade (MA) e adultas na meia-idade treinadas (MAT); **Grupos Ooforectomizados:** ooforectomizadas (O) e ooforectomizadas treinado (OT). Dados comparados por Análise de variância de duas vias: valor de p da interação representado por I; valor de p do treinamento físico representado por TF; valor de p da ooforectomia representado por Ovx.

Não ocorreram modificações nos indicadores de variabilidade da pressão arterial sistólica. Entretanto, o treinamento físico modificou a sensibilidade barorreflexa testada através da utilização de drogas vasoativas (Figura 27). O painel A apresenta resposta bradicárdica reflexa e o painel B a resposta taquicárdica reflexa. Não foram identificadas modificações na resposta taquicárdica reflexa, no entanto, os grupos treinados (MAT e OT) apresentaram maior resposta bradicárdica reflexa em relação aos grupos sedentários (MA e O).

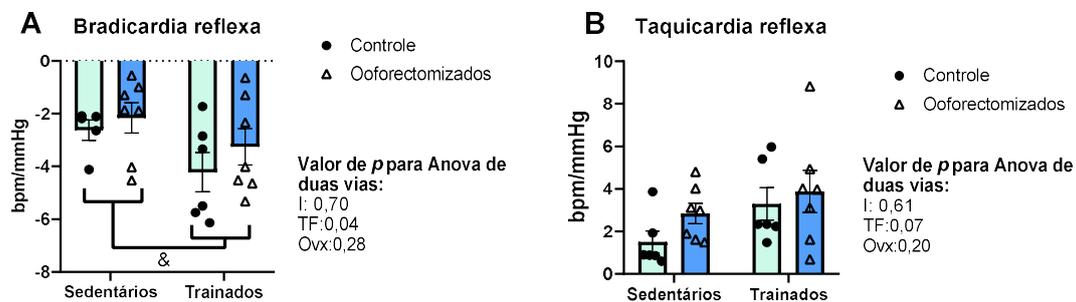


Figura 27: Sensibilidade barorreflexa. **A)** Bradicardia reflexa; **B)** Taquicardia reflexa. **Grupos sedentários:** Adultas na meia-idade (MA) e ooforectomizadas (O); **Grupos treinados:** Adultas na meia-idade treinadas (MAT) e ooforectomizadas treinadas (OT). **Grupos Controle:** Adultas na meia-idade (MA) e adultas na meia-idade treinadas (MAT); **Grupos Ooforectomizados:** ooforectomizadas (O) e ooforectomizadas treinadas (OT). Dados comparados por Análise de variância de duas vias: valor de p da interação representado por I; valor de p do treinamento físico representado por TF; valor de p da ooforectomia representado por Ovx. & $p < 0,05$ vs. grupos sedentário.

Não ocorreram alterações nos parâmetros inflamatórios analisados de forma isolada (IL-10, TNF- α e IL-6, respectivamente, nos painéis A, B e C da Figura 28). No entanto, os grupos treinados (MAT e OT) apresentaram redução na razão TNF- α /IL-10 (painel D) e redução na razão IL-6/IL-10 (painel E) em relação aos grupos sedentários (MA e O) (Figura 28).

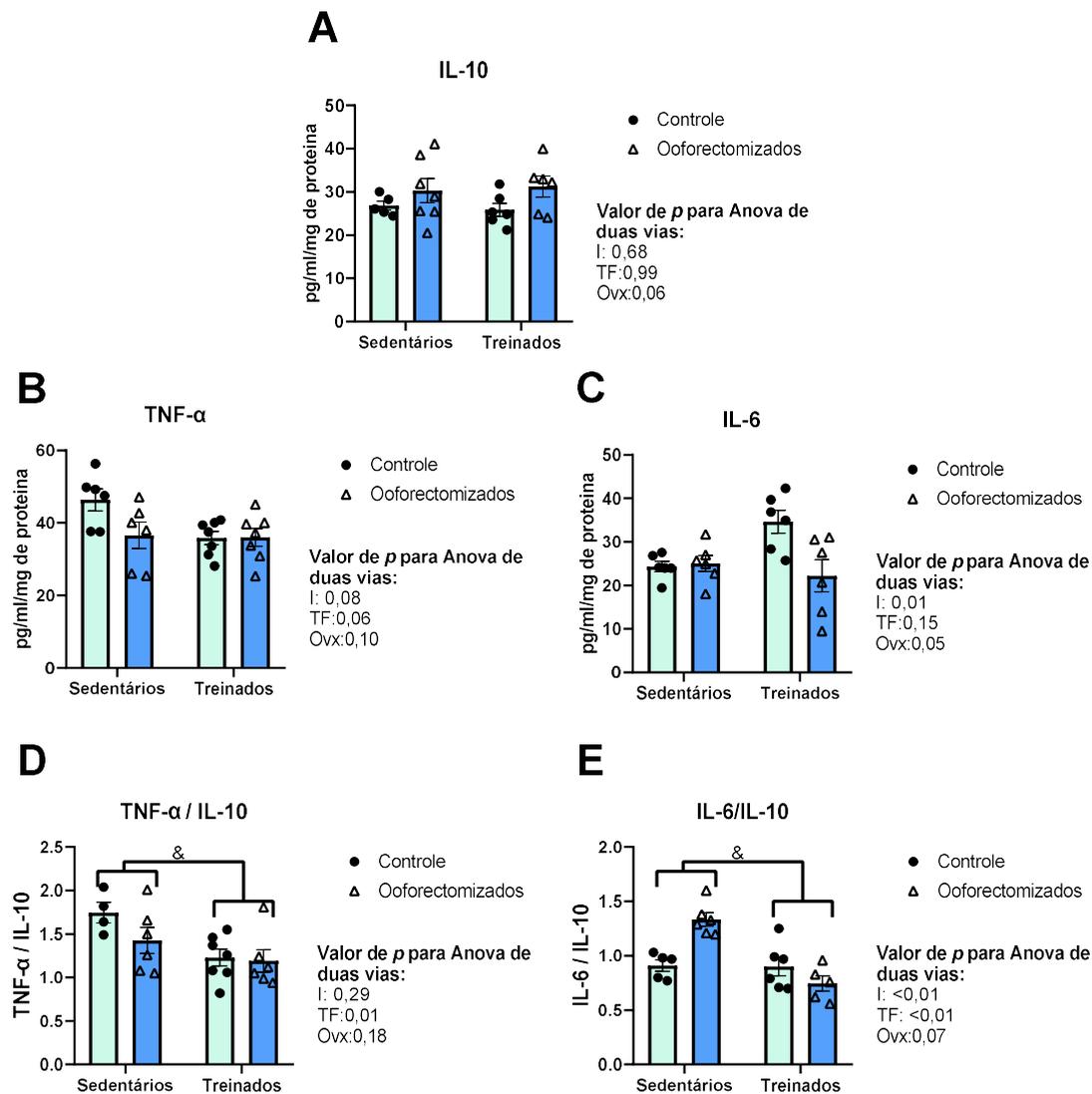


Figura 28: Mediadores inflamatórios. **A)** Interleucina 10 (IL-10); **B)** TNF- α ; **C)** Interleucina-6 (IL-6); **D)** TNF- α /IL-10; **E)** IL-6/IL-10; **Grupos sedentários:** Adultas na meia-idade (MA) e ooforectomizadas (O); **Grupos treinados:** Adultas na meia-idade treinadas (MAT) e ooforectomizadas treinadas (OT). **Grupos Controle:** Adultas na meia-idade (MA) e adultas na meia-idade treinadas (MAT); **Grupos Ooforectomizados:** ooforectomizadas (O) e ooforectomizadas treinadas (OT). Dados comparados por Análise de variância de duas vias: valor de p da interação representado por I; valor de p do treinamento físico representado por TF; valor de p da ooforectomia representado por Ovx. & p < 0,05 vs. grupos sedentário; # p < 0,05 vs. grupos controle.

Não ocorreram modificações nos parâmetros pró-oxidantes cardíacos (NADPH oxidase e peróxido de hidrogênio), bem como, não ocorreram modificações no Nitrito e na Catalase. No entanto, é possível observar na Figura 29, que os demais parâmetros de estresse oxidativo cardíaco foram modificados pela ausência de hormônios ovarianos e pelo treinamento físico.

Os animais ooforectomizados (O e OT) apresentaram menor atividade de superóxido dismutase (painel A), maior atividade de FRAP (painel B) e tendência de aumento ($p=0,05$) na oxidação de proteínas nas células cardíacas (Painel D) em relação aos grupos controle (MA e MAT). Os grupos treinados (MAT e OT) apresentaram maior atividade da enzima superóxido dismutase e menor lipoperoxidação das membranas lipídicas das células cardíacas em relação aos grupos sedentários (MA e OT).

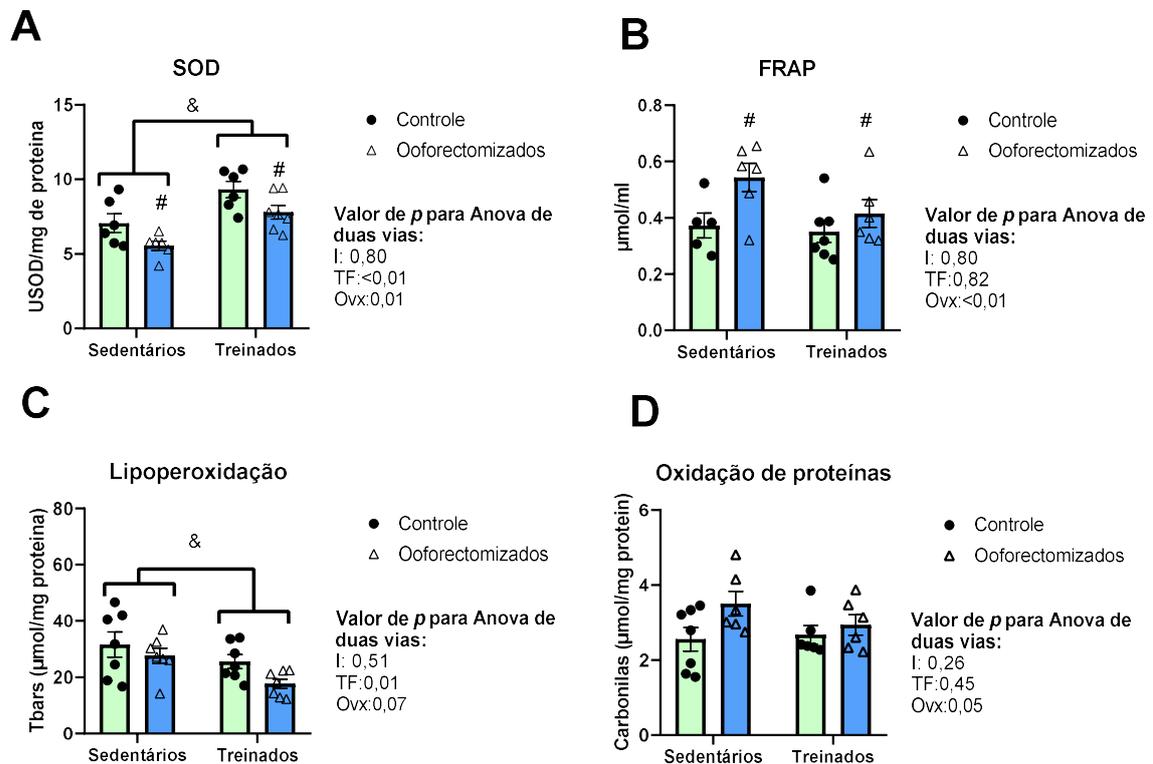


Figura 30: Estresse oxidativo cardíaco. **A)** Superóxido dismutase (SOD); **B)** FRAP; **C)** Lipoperoxidação (TBARS); **D)** Oxidação proteica (carbonilas). **Grupos sedentários:** Adultas na meia-idade (MA) e ooforectomizadas (O); **Grupos treinados:** Adultas na meia-idade treinadas (MAT) e ooforectomizadas treinadas (OT). **Grupos Controle:** Adultas na meia-idade (MA) e adultas na meia-idade treinadas (MAT); **Grupos Ooforectomizados:** ooforectomizadas (O) e ooforectomizadas treinado (OT). Dados comparados por Análise de variância de duas vias: valor de p da interação representado por I; valor de p do treinamento físico representado por TF; valor de p da ooforectomia representado por Ovx. & p < 0,05 vs. grupos sedentário; # p < 0,05 vs. grupos controle.

A tabela 5 apresenta o sumário dos resultados do capítulo 3.

Tabela 5. Sumário dos resultados do capítulo 3.

Parâmetros	Efeito Ooforectomia	Efeito do treinamento Físico
Massa muscular; Capacidade Funcional		↑ &
Alterações morfométricas cardíacas	↓ #	
Alterações na função diastólica cardíaca	↑ #	↑ &
Sensibilidade barorreflexa (resposta bradicárdica reflexa)		↑ &
Perfil inflamatório (TNF- α /IL-10; IL-6/IL-10)		↓ &
Defesa antioxidante cardíaca (Superóxido dismutase; FRAP)	↑ #	↑ &
Dano oxidativo (Lipoperoxidação)		↓ &

↓ = redução do parâmetro; ↑ = aumento do parâmetro; #p < 0.05 vs. grupos controle; &p < 0.05 vs. grupos sedentárias;

4.11 Discussão do capítulo 3

No presente capítulo foram avaliados os impactos da privação ovariana em desfechos cardiovasculares, na sensibilidade barorreflexa, perfil inflamatório e estresse oxidativo cardíaco, bem como os efeitos do treinamento físico em camundongos fêmeas com aterosclerose na meia-idade. Os principais achados relacionados à privação ovariana foram as alterações morfométricas cardíacas, o comprometimento da função diastólica cardíaca, a maior inflamação no baço e as modificações na defesa antioxidante no músculo cardíaco. Os principais achados relacionados ao treinamento físico foram o aumento da capacidade funcional, a maior sensibilidade barorreflexa, a menor inflamação no baço, a maior defesa antioxidante cardíaca e a menor peroxidação lipídica no músculo cardíaco.

Em diversos estudos a ooforectomia é realizada em roedores para induzir um modelo experimental de menopausa^{55,93}. Nesta fase da vida são esperadas alterações na composição corporal, com aumento de adiposidade, redução de massa magra e aumento no peso corporal³⁰. Interessantemente, estes desfechos não foram identificados no presente estudo.

O teste de capacidade máxima de corrida em roedores é um método validado para mensurar a capacidade funcional. Este teste possui grande correlação com o consumo máximo de oxigênio de roedores (Vo_2)⁹⁴. Portanto, é possível inferir que o treinamento físico melhorou o desempenho cardiorrespiratório nos grupos treinados.

Observou-se que a ausência dos hormônios ovarianos gerou diversas adaptações na massa cardíaca associada à hipertrofia cardíaca concêntrica, bem como redução na defesa antioxidante enzimática (\downarrow SOD) e aumento de 37.35% (S vs. OS) na oxidação proteica (embora não significativa estatisticamente, ooforectomia $p=0.05$) no músculo

cardíaco. De fato, estes desfechos são similares aos observados em ratas fêmeas idosas controle submetidas a privação ovariana ⁶⁶.

Neste modelo está bem estabelecido que há redução da eficiência da valva aórtica com o processo de envelhecimento ⁷¹. Nós demonstramos no capítulo 1 que as alterações na estrutura da aorta podem estar associadas aos prejuízos na função diastólica cardíaca e na redução da sensibilidade do barorreceptores ⁶⁴. Neste sentido, era esperado observar prejuízos decorrente do período adicional de privação ovariana resultando em queda nas propriedades vasodilatores ⁹⁵ e redução adicional na complacência arterial.

Vale mencionar que há evidências prévias na literatura sobre os efeitos deletérios da ausência dos estrógenos no músculo cardíaco. Alterações observadas através de análise de expressão gênica, como aumento da expressão de fibronectina, que é uma importante proteína da matriz extracelular associada a mediadores pró-inflamatórios; aumento da expressão de TNF- α , que indica inflamação associada a desbalanço vascular; aumento de expressão de Caspase 3, Caspase 9, e MADD que indicam apoptose de células cardíacas ⁹⁶ são alguns exemplos. Desta forma, hipotetizamos que as adaptações na estrutura do músculo cardíaco podem ter sido causadas pelos danos oxidativos associados ao aumento de quadro pró-inflamatório e pró-apoptótico, justificando as alterações morfométricas cardíacas e a redução de função diastólica cardíaca em fêmeas ⁶⁶.

Apesar de o treinamento físico apresentar capacidade de reverter fenótipos relacionados ao processo de envelhecimento no musculo cardíaco ⁹⁷, neste estudo, os efeitos mais importantes relacionados ao treinamento físico foram associados ao aumento de capacidade funcional, a uma melhor ação antioxidante (aumento de SOD) e à redução de danos no tecido cardíaco (redução da lipoperoxidação da membrana lipídica do musculo cardíaco).

A ausência de estrógenos induzida pela privação ovariana gera efeitos negativos nos receptores, causando perda de função a longo prazo. Conseqüentemente, nesta situação ocorre redução das propriedades vasodilatadoras, que tendem a elevar de maneira crônica os valores de pressão arterial ⁹⁵. No entanto, não foram observadas repercussões hemodinâmicas adicionais decorrentes da privação ovariana.

O envelhecimento associado à progressão da aterosclerose promove remodelamento na aorta (corte transversal) em fêmeas e machos ApoE-KO ⁷², bem como, promove piores desfechos cardiovasculares ⁷¹. Portanto, uma possível justificativa para este achado é que os grupos experimentais já estavam prejudicados pelo próprio processo de envelhecimento na aterosclerose. De fato, no capítulo 1 o grupo na meia-idade já apresenta aumento sistêmico dos valores pressóricos em relação ao grupo jovem, demonstrando que o comprometimento hemodinâmico já estava estabelecido neste grupo experimental.

Por outro lado, o treinamento físico promoveu melhor sensibilidade dos barorreceptores. É importante mencionar que já foi demonstrado previamente em outros modelos experimentais que as modificações na atuação dos barorreceptores precede as modificações nos outros sistemas ⁶¹. Além disto, estudos anteriores que prescreveram o treinamento físico com maior volume demonstraram uma redução do crescimento de lesões ateroscleróticas na região neointima arterial com estabilização de lesões vasculares em camundongos machos ApoE-KO ¹³. Desta forma, consideramos que uma possível adaptação do treinamento físico com maior volume seria a redução de valores pressóricos.

O estresse oxidativo e a inflamação são mecanismos interconectados que criam um ciclo de retroalimentação e impulsionam a progressão das placas de ateroma e a deterioração da matriz extracelular ⁴⁰. De fato, as espécies reativas de oxigênio em

excesso são importantes sinalizadores moleculares do sistema cardiovascular que apresentam capacidade de estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias e potencializar processos pró-apoptóticos ⁹⁸.

Adicionalmente, os processos de inflamação crônica estabelecidos na aterosclerose estimulam os mecanismos de rompimento das placas, e com o excesso de células inflamatórias há o aumento concomitante de espécies reativas de oxigênio decorrentes das lesões ateroscleróticas ⁸. Portanto, a redução da ação de SOD associado com a elevação de oxidação proteica de células musculares cardíacas indicam que a ausência dos hormônios estrógenos podem aumentar a suscetibilidade de piores desfechos relacionados à progressão da doença aterosclerótica.

De fato, na aterosclerose as placas de ateroma são constituídas por um conteúdo rico em lipídios e células inflamatórias (predominantemente macrófagos derivados de monócitos, linfócitos T e mastócitos) ⁸. A oxidação de LDL na camada interna vascular ativa a atuação de macrófagos e monócitos que podem inibir a expressão da SOD ⁴⁰. Portanto, a inibição deste importante mecanismo de defesa antioxidante pode ter ocorrido pela acentuação dos conteúdos ateroscleróticos nos animais ooforectomizados.

Há indicadores de que a oxidação lipídica promovida por lipoperoxidação pode ser gerada por processos ateroscleróticos ⁹⁹. O ânion superóxido é a espécie reativa de oxigênio mais abundante no organismo humano, podendo promover danos celulares como a lipoperoxidação ¹⁰⁰ enquanto a enzima SOD é a primeira enzima com ação antioxidante contra a ação do ânion superóxido ¹⁰⁰. Portanto, o aumento da produção de SOD nos grupos treinados pode justificar a redução de peroxidação no músculo cardíaco e reforça a habilidade do treinamento físico em promover cardioproteção em fêmeas com aterosclerose na meia-idade.

4.12 Considerações finais do capítulo 3

A privação ovariana causa hipertrofia cardíaca patológica, prejuízos na função diastólica cardíaca e modificações na defesa antioxidante cardíaca em fêmeas com aterosclerose na meia-idade. O treinamento físico promove aumento de capacidade física, aumento de sensibilidade barorreflexa, redução de inflamação no baço e de estresse oxidativo cardíaco em camundongos fêmeas com aterosclerose ooforectomizadas.

5 CONCLUSÕES

O treinamento físico aeróbico é uma estratégia eficaz para promover benefícios sistêmicos em desfechos cardiovasculares, autonômicos, inflamatórios e de estresse oxidativo cardíaco em fêmeas com aterosclerose expostas ao processo de envelhecimento.

A privação ovariana, por outro lado, gera repercussões negativas em fêmeas com aterosclerose, especialmente no perfil inflamatório. Quando a ausência dos estrógenos ocorre precocemente, observam-se grandes prejuízos na modulação autonômica cardiovascular.

O treinamento físico demonstrou ser capaz de mitigar os danos mesmo em fêmeas com aterosclerose ooforectomizadas, reduzindo o avanço da inflamação, melhorando a sensibilidade dos barorreceptores e diminuindo o dano oxidativo cardíaco.

REFERÊNCIAS

1. Kochanek KD, Murphy S, Xu J, Arias E. Mortality in the United States, 2016. *NCHS Data Brief*. 2017;(293):1-8.
2. Santos MCB dos, Vieira JA de M, César BN, Novaes MRCG. Hábitos e perfil socioeconômico do paciente aterosclerótico no Brasil. *Com Ciências Saúde*. 2011;22(3):247-256.
3. Association. AH. *Heart Disease and Stroke Statistics-2019: At-a-Glance*. 2019.; 2019.
4. Malachias MVB, Souza WKS, Plavnik FL, Rodrigues CIS. *7ª Diretriz Brasileira De Hipertensão Arterial*. Vol 107.; 2016. doi:10.5935/abc.2013S010
5. Saúde. BrasilM da. ATUALIZAÇÃO DA DIRETRIZ BRASILEIRA DE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE – 2017. 2017;109. doi:10.5935/abc.2013S010
6. Portal VL. Aterosclerose - Uma Doença Complexa. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul*. Published online 2004:1-3.
7. Negrão CE, Barreto ACP. *Cardiologia Do Exercício: Do Atleta Ao Cardiopata*. 3rd ed. Manole; 2016.
8. Bäck M, Yurdagul A, Tabas I, Öörni K, Kovanen PT. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cardiol*. 2019;16(7):389-406. doi:10.1038/s41569-019-0169-2
9. Lo Sasso G, Schlage WK, Boué S, Veljkovic E, Peitsch MC, Hoeng J. The Apoe^{-/-} mouse model: A suitable model to study cardiovascular and respiratory diseases

- in the context of cigarette smoke exposure and harm reduction. *J Transl Med.* 2016;14(1):1-16. doi:10.1186/s12967-016-0901-1
10. Dutta S, Sengupta P. Men and mice: Relating their ages. *Life Sci.* 2016;152:244-248. doi:10.1016/j.lfs.2015.10.025
 11. Castor LRG, Oba E, Pereira OCM. Effects of swimming and nandrolone decanoate treatment on vas deferens response to norepinephrine. *Life Sci.* 2009;85(13-14):541-545. doi:10.1016/j.lfs.2009.08.009
 12. Plump AS, SJD, HT, ASK, WA, VJG, . . . & BJL. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell.* 1992;2:343-353.
 13. Pynn M, Schäfer K, Konstantinides S, Halle M. Exercise Training Reduces Neointimal Growth and Stabilizes Vascular Lesions Developing after Injury in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Circulation.* 2004;109(3):386-392. doi:10.1161/01.CIR.0000109500.03050.7C
 14. Ferreira GS, Pinto PR, Iborra RT, et al. Aerobic exercise training selectively changes oxysterol levels and metabolism reducing cholesterol accumulation in the aorta of dyslipidemic mice. *Front Physiol.* 2017;8(SEP):1-9. doi:10.3389/fphys.2017.00644
 15. Ledesma MD, Dotti CG. Amyloid excess in Alzheimer's disease: What is cholesterol to be blamed for? *FEBS Lett.* 2006;580(23):5525-5532. doi:10.1016/j.febslet.2006.06.038
 16. Nichols M, Townsend N, Scarborough P, Rayner M. Trends in age-specific coronary heart disease mortality in the European Union over three decades: 1980-2009. *Eur Heart J.* 2013;34(39):3017-3027. doi:10.1093/eurheartj/eh159

17. Heeren MV, Dias S, Francica JV, Humano M, Judas S. Treinamento físico melhora a saúde cardiovascular em mulheres no climatério Janaina de Oliveira Britto Íris Callado Sanches. *Motriz rev educ fis.* 2008;14(2):187-195.
18. Zanesco A, Antunes E. Effects of exercise training on the cardiovascular system: pharmacological approaches. *Pharmacol Ther.* 2007;114(3):307-317. doi:10.1016/j.pharmthera.2007.03.010
19. Koebele S V., Bimonte-Nelson HA. Modeling menopause: The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research. *Maturitas.* 2016;87:5-17. doi:10.1016/j.maturitas.2016.01.015
20. Weiss NS. Relationship of menopause to serum cholesterol and arterial blood pressure: The United States health examination survey of adults. *Am J Epidemiol.* 1972;96(4):237-241. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a121454
21. Staessen JA, Ginocchio G, Thijs L, Fagard R. Conventional and ambulatory blood pressure and menopause in a prospective population study. *J Hum Hypertens.* 1997;11(8):507-514.
22. Sanches IC, Conti FF, Bernardes N, et al. Impact of combined exercise training on cardiovascular autonomic control and mortality in diabetic ovariectomized rats. *J Appl Physiol.* 2015;119(6):656-662. doi:10.1152/jappphysiol.00883.2014
23. Shimojo GL, Palma RK, Brito JO, Sanches IC, Irigoyen MC, Angelis K De. Dynamic resistance training decreases sympathetic tone in hypertensive ovariectomized rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2015;48:523-527.
24. Braga VAVN, Couto GK, Lazzarin MC, Rossoni L V., Medeiros A. Aerobic exercise training prevents the onset of endothelial dysfunction via increased nitric oxide bioavailability and reduced reactive oxygen species in an experimental model of menopause. *PLoS One.* 2015;10:1-13.

25. Vokonas PS, Kannel WB, Cupples LA. Epidemiology and risk of hypertension in the elderly: the Framingham Study. *J Hypertens Suppl.* 1988;6(1):S3-9.
26. Strong JP, Malcom GT, McMahan CA, et al. Prevalence and extent of atherosclerosis in adolescents and young adults: Implications for prevention from the pathobiological determinants of atherosclerosis in youth study. *J Am Med Assoc.* 1999;281(8):727-735. doi:10.1001/jama.281.8.727
27. Neves LM, Fortaleza AC, Rossi FE, et al. Functional training reduces body fat and improves functional fitness and cholesterol levels in postmenopausal women: a randomized clinical trial. *J Sports Med Phys Fitness.* 2017;57(4):448-456. doi:10.23736/S0022-4707.17.06062-5
28. Miyaki A, Maeda S, Choi Y, Akazawa N, Tanabe Y, Ajisaka R. Habitual aerobic exercise increases plasma pentraxin 3 levels in middle-aged and elderly women. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism.* 2012;37(5):907-911. doi:10.1139/h2012-069
29. Kim JW, Kim DY. Effects of Aerobic Exercise Training on Serum Sex Hormone Binding Globulin, Body Fat Index, and Metabolic Syndrome Factors in Obese Postmenopausal Women. *Metab Syndr Relat Disord.* 2012;10(6):452-457. doi:10.1089/met.2012.0036
30. Peppas M, Koliaki C, Dimitriadis G. Body Composition as an Important Determinant of Metabolic Syndrome in Postmenopausal Women. *Endocrinol Metabol Syndr.* 2012;2:2161-1017.
31. Sanches IC, Conti FF, Sartori M, Irigoyen MC, De Angelis K. Standardization of resistance exercise training: effects in diabetic ovariectomized rats. *Int J Sports Med.* 2014;35(4):323-329. doi:10.1055/s-0033-1351254
32. Ludgero-Correia A, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Faria TS. Effects of high-fat diet on plasma lipids, adiposity, and inflammatory markers in ovariectomized C57BL/6 mice. *Nutrition.* 2012;28:316-323.

33. Flues K, Paulini J, Brito S, et al. Exercise training associated with estrogen therapy induced cardiovascular benefits after ovarian hormones deprivation. *Maturitas*. Published online 2010.
34. da Palma RK, Moraes-Silva IC, da Silva Dias D, et al. Resistance or aerobic training decreases blood pressure and improves cardiovascular autonomic control and oxidative stress in hypertensive menopausal rats. *J Appl Physiol*. 2016;121:1032-1038.
35. Pavlov VAAP, Ang HONGW, Zura CHJC, Riedman STGF, Racey KEJT. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. *Molecular Medicine*. 2003;9:125-134.
36. Lee CG, Carr MC, Murdoch SJ, et al. Adipokines, Inflammation, and Visceral Adiposity across the Menopausal Transition: A Prospective Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(4):1104-1110. doi:10.1210/jc.2008-0701
37. Malutan AM, Dan M, Nicolae C, Carmen M. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine changes related to menopause. *Prz Menopauzalny*. 2014;13(3):162-168. doi:10.5114/pm.2014.43818
38. Alenghat FJ. The Prevalence of Atherosclerosis in Those with Inflammatory Connective Tissue Disease by Race, Age, and Traditional Risk Factors. *Sci Rep*. 2016;6(September 2015):1-9. doi:10.1038/srep20303
39. Themis Moura Cardinot. Efeito do treinamento físico aeróbico na prevenção e terapêutica da doença aterosclerótica em modelo experimental de aterosclerose. Published online 2008.
40. Yang X, Li Y, Li Y, et al. Oxidative stress-mediated atherosclerosis: Mechanisms and therapies. *Front Physiol*. 2017;8(AUG). doi:10.3389/fphys.2017.00600

41. Ferreira MJ, Sanches IC, Jorge L, Llesuy SF, Irigoyen MC, De Angelis K. Ovarian status modulates cardiovascular autonomic control and oxidative stress in target organs. *Biol Sex Differ.* 2020;11(1):1-10. doi:10.1186/s13293-020-00290-y
42. Latour MG, Shinoda M, Lavoie J marc. Metabolic effects of physical training in ovariectomized and hyperestrogenic rats Metabolic effects of physical training in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *J Appl Physiol.* 2001;90:235-241.
43. K. Flurkey, J.M. Curren DEH. Mouse Models in Aging Research. In: *The Mouse in Biomedical Research, 2nd Edition American College Laboratory Animal Medicine (Elsevier).* ; 2007:637–672.
44. Lima LDF, Lacerda KC, Ghetti FDF, Cristina S, Dutra P. Relação Entre Medidas Antropométricas , Escolaridade , Renda e Índice de Qualidade da Dieta de Mulheres Climatéricas. *HU Revista.* 2017;42(4):297-305.
45. Bertagnolli M, Campos C, Schenkel PC, et al. Baroreflex sensitivity improvement is associated with decreased oxidative stress in trained spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens.* 2006;24(12):2437-2443. doi:10.1097/01.hjh.0000251905.08547.17
46. Irigoyen MC, Paulini J, Flores LJF, et al. Exercise training improves baroreflex sensitivity associated with oxidative stress reduction in ovariectomized rats. *Hypertension.* 2005;46:998-1003.
47. Hong J, Kim K, Park E, et al. Exercise ameliorates endoplasmic reticulum stress-mediated vascular dysfunction in mesenteric arteries in atherosclerosis. *Sci Rep.* 2018;8(1):1-10. doi:10.1038/s41598-018-26188-9
48. Wu W qiang, Peng S, Wan X qin, Lin S, Li L yu, Song Z yuan. Physical exercise inhibits atherosclerosis development by regulating the expression of neuropeptide Y in apolipoprotein E-deficient mice. *Life Sci.* 2019;237(May):116896. doi:10.1016/j.lfs.2019.116896

49. Sanches IC, de Oliveira Brito J, Candido GO, et al. Cardiometabolic benefits of exercise training in an experimental model of metabolic syndrome and menopause. *Menopause: The Journal of The North American Menopause Society*. 2012;19(5):562-568. doi:10.1097/gme.0b013e3182358c9c
50. De Angelis K, Wichi R, Jesus W, et al. Exercise training changes autonomic cardiovascular balance in mice. *J Appl Physiol (1985)*. 2004;96:2174-2178.
51. Heeren M, De Sousa L, Mostarda C, et al. Exercise improves cardiovascular control in a model of dislipidemia and menopause. *Maturitas*. 2009;62:200-204.
52. Katsimpoulas M, Kadoglou NE, Moustardas P, et al. The role of exercise training and the endocannabinoid system in atherosclerotic plaque burden and composition in apo-E-deficient mice. *Hellenic Journal of Cardiology*. 2016;57(6):417-425. doi:10.1016/j.hjc.2016.11.013
53. Sanches IC, Sartori M, Jorge L, Irigoyen MC, De Angelis K. Tonic and reflex cardiovascular autonomic control in trained-female rats. *www.bjournal.com.br Braz J Med Biol Res Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2009;42(42):942-948.
54. Souza SBC, Flues K, Paulini J, et al. Role of exercise training in cardiovascular autonomic dysfunction and mortality in diabetic ovariectomized rats. *Hypertension*. 2007;50(4):786-791. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.095000
55. Nascimento-Carvalho B, Dos-Santos A, Da Costa-Santos N, et al. Food readjustment plus exercise training improves cardiovascular autonomic control and baroreflex sensitivity in high-fat diet-fed ovariectomized mice. *Physiol Rep*. 2023;11(5):e15609. doi:10.14814/phy2.15609
56. Moraes OA de. *Infarto Agudo Do Miocárdio Em Modelos de Polimorfismo Da Enzima Conversora de Angiotensina.*; 2018.

57. Scapini KB. *Força Muscular Respiratória, Capacidade Funcional, Controle Autonômico Cardiovascular e Função Endotelial de Pacientes Com Doença Renal Crônica*. 2016.
58. Thireau J, Zhang BL, Poisson D, Babuty D. Heart rate variability in mice: A theoretical and practical guide. *Exp Physiol*. 2008;93:83-94.
59. Pelat M, Dessy C, Massion P, Desager JP, Feron O, Balligand JL. Rosuvastatin decreases caveolin-1 and improves nitric oxide-dependent heart rate and blood pressure variability in apolipoprotein E^{-/-} mice in vivo. *Circulation*. 2003;107:2480-2486.
60. Firoozmand LT, Sanches A, Damaceno-Rodrigues NR, et al. Blockade of AT1 type receptors for angiotensin II prevents cardiac microvascular fibrosis induced by chronic stress in Sprague–Dawley rats. *Stress*. 2018;21(6):484-493. doi:10.1080/10253890.2018.1462328
61. Bernardes N, Da Silva Dias D, Stoyell-Conti FF, et al. Baroreflex Impairment Precedes Cardiometabolic Dysfunction in an Experimental Model of Metabolic Syndrome: Role of Inflammation and Oxidative Stress. *Sci Rep*. 2018;8:1-10.
62. Viana do Nascimento Filho A, Gomes Gurgel G, Thomazetti D, et al. Impacto do treinamento físico no perfil inflamatório e redox renal no desenvolvimento de síndrome metabólica. *ConScientiae Saúde*. 2023;22(1):e23408. doi:10.5585/22.2023.23408
63. Da Silva Dias D, Bernardes N, Stoyell-Conti FF, et al. Impact of combined exercise training on the development of cardiometabolic and neuroimmune complications induced by fructose consumption in hypertensive rats. *PLoS One*. 2020;15(6). doi:10.1371/journal.pone.0233785
64. Nascimento-Carvalho B, da Silva BD, da Silva MB, et al. Aerobic exercise attenuates dysautonomia, cardiac diastolic dysfunctions, and hemodynamic overload in female mice with atherosclerosis. *Sci Rep*. 2024;14(1):7835. doi:10.1038/s41598-024-52883-x

65. Dai DF, Chen T, Johnson SC, Szeto H, Rabinovitch PS. Cardiac aging: From molecular mechanisms to significance in human health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2012;16(12):1492-1536. doi:10.1089/ars.2011.4179
66. Machi JF, da Silva Dias D, Freitas SC, et al. Impact of aging on cardiac function in a female rat model of menopause: Role of autonomic control, inflammation, and oxidative stress. *Clin Interv Aging*. 2016;11:341-350. doi:10.2147/CIA.S88441
67. da Silva Dias D, Moraes-Silva IC, Bernardes N, et al. Exercise training initiated at old stage of lifespan attenuates aging-and ovariectomy-induced cardiac and renal oxidative stress: Role of baroreflex. *Exp Gerontol*. 2019;124. doi:10.1016/j.exger.2019.110635
68. Onathan J, Yers M, Anish M, et al. *The New England Journal of Medicine EXERCISE CAPACITY AND MORTALITY AMONG MEN REFERRED FOR EXERCISE TESTING A BSTRACT*. Vol 346.; 2002.
69. Santelices LC, Rutman SJ, Prantil-Baun R, Vorp DA, Ahearn JM. Relative Contributions of Age and Atherosclerosis to Vascular Stiffness. *Clin Transl Sci*. 2008;1(1):62-66. doi:10.1111/j.1752-8062.2008.00014.x
70. de Souza RR. Aging of myocardial collagen. *Biogerontology*. 2002;3(6):325-335. doi:10.1023/a:1021312027486
71. Vasquez EC, Peotta VA, Gava AL, Pereira TMC, Meyrelles SS. Cardiac and vascular phenotypes in the apolipoprotein E-deficient mouse. *J Biomed Sci*. 2012;19(1). doi:10.1186/1423-0127-19-22
72. Pereira TMC, Nogueira B V., Lima LCF, et al. Cardiac and vascular changes in elderly atherosclerotic mice: The influence of gender. *Lipids Health Dis*. 2010;9. doi:10.1186/1476-511X-9-87

73. Wang YX. Cardiovascular functional phenotypes and pharmacological responses in apolipoprotein E deficient mice. *Neurobiol Aging*. 2005;26(3):309-316. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2004.06.018

74. Gomes DJ, Velosa AP, Okuda LS, et al. Glycated albumin induces lipid infiltration in mice aorta independently of DM and RAS local modulation by inducing lipid peroxidation and inflammation. *J Diabetes Complications*. 2016;30(8):1614-1621. doi:10.1016/j.jdiacomp.2016.07.001

75. Vasquez EC, Peotta VA, Meyrelles SS. Cardiovascular Autonomic Imbalance and Baroreflex Dysfunction in the Apolipoprotein E-Deficient Mouse. *Cell Physiol Biochem*. 2012;29(5-6):635-46.

76. Berk BC, Haendeler J, Sottile J. Angiotensin II, atherosclerosis, and aortic aneurysms. *Journal of Clinical Investigation*. 2000;105(11):1525-1526. doi:10.1172/JCI9820

77. Weiss D, Kools JJ, Taylor WR. Angiotensin II–Induced Hypertension Accelerates the Development of Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice. *Circulation*. 2001;103(3):448-454. doi:10.1161/01.CIR.103.3.448

78. Cheng C, Tempel D, van Haperen R, et al. Activation of MMP8 and MMP13 by angiotensin II correlates to severe intra-plaque hemorrhages and collagen breakdown in atherosclerotic lesions with a vulnerable phenotype. *Atherosclerosis*. 2009;204(1):26-33. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.01.025

79. Whelton, P. K., Carey, R. M., Aronow, W. S., Casey, D. E., Collins, K. J., Himmelfarb et. al. ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice. *J Am Coll Cardiol*. 2018;71:e127-e248.

80. Pierce GL, Harris SA, Seals DR, Casey DP, Barlow PB, Stauss HM. Estimated aortic stiffness is independently associated with cardiac baroreflex sensitivity in humans: role of ageing and habitual endurance exercise. *J Hum Hypertens*. 2016;30(9):513-520. doi:10.1038/jhh.2016.3
81. Lan YS, Khong TK, Yusof A. Effect of Exercise on Arterial Stiffness in Healthy Young, Middle-Aged and Older Women: A Systematic Review. *Nutrients*. 2023;15(2):308. doi:10.3390/nu15020308
82. Canoy D, Nazarzadeh M, Copland E, et al. How Much Lowering of Blood Pressure Is Required to Prevent Cardiovascular Disease in Patients With and Without Previous Cardiovascular Disease? *Curr Cardiol Rep*. 2022;24(7):851-860. doi:10.1007/s11886-022-01706-4
83. Almeida, Marcos B.; ARAÚJO CGS. Efeitos do treinamento aeróbico sobre a frequência cardíaca. *Rev Bras Med Esporte*. 2003;9:104-112.
84. Bandoni RL, Bricher Choque PN, Dellê H, et al. Cholinergic stimulation with pyridostigmine modulates a heart-spleen axis after acute myocardial infarction in spontaneous hypertensive rats. *Sci Rep*. 2021;11(1):9563. doi:10.1038/s41598-021-89104-8
85. La Rovere MT, Bigger JT Jr, Marcus FI, Mortara A SPJ. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. *Lancet*. 1998;351:478-84.
86. La Rovere MT, Bersano C, Gnemmi M, Specchia G, Schwartz PJ, Cad O vessel. Exercise-Induced Increase in Baroreflex Sensitivity Predicts Improved Prognosis After Myocardial Infarction. Published online 2002:945-949. doi:10.1161/01.CIR.0000027565.12764.E1
87. Knowlton AA, Lee AR. Estrogen and the cardiovascular system. *Pharmacol Ther*. 2012;135(1):54-70. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.03.007

88. Ebong IA, Watson KE, Goff DC, et al. Age at menopause and incident heart failure. *Menopause*. 2014;21(6):585-591. doi:10.1097/GME.000000000000138
89. Muka T, Oliver-Williams C, Kunutsor S, et al. Association of Age at Onset of Menopause and Time Since Onset of Menopause With Cardiovascular Outcomes, Intermediate Vascular Traits, and All-Cause Mortality. *JAMA Cardiol*. 2016;1(7):767. doi:10.1001/jamacardio.2016.2415
90. Honigberg MC, Zekavat SM, Aragam K, et al. Association of Premature Natural and Surgical Menopause With Incident Cardiovascular Disease. *JAMA*. 2019;322(24):2411. doi:10.1001/jama.2019.19191
91. De Melo VU, Saldanha RRM, Dos Santos CR, et al. Ovarian Hormone Deprivation Reduces Oxytocin Expression in Paraventricular Nucleus Preautonomic Neurons and Correlates with Baroreflex Impairment in Rats. *Front Physiol*. 2016;7. doi:10.3389/fphys.2016.00461
92. Sun H -J., Zhou H, Feng X -M., et al. Superoxide anions in the paraventricular nucleus mediate cardiac sympathetic afferent reflex in insulin resistance rats. *Acta Physiologica*. 2014;212(4):267-282. doi:10.1111/apha.12405
93. Conti FF, Brito J de O, Bernardes N, et al. Positive effect of combined exercise training in a model of metabolic syndrome and menopause: Autonomic, inflammatory, and oxidative stress evaluations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015;309:R1532-R1539.
94. Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda CT, Heeren M V., Irigoyen MC, De Angelis K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol*. 2007;6. doi:10.1186/1475-2840-6-38
95. Shi H, Kumar SPDS, Liu X. G protein-coupled estrogen receptor in energy homeostasis and obesity pathogenesis. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Vol 114. Elsevier B.V.; 2013:193-250. doi:10.1016/B978-0-12-386933-3.00006-6

96. Pechenino AS, Lin L, Mbai FN, et al. Impact of aging vs. estrogen loss on cardiac gene expression: estrogen replacement and inflammation. *Physiol Genomics*. 2011;43:1065-1073. doi:10.1152/physiolgenomics.00228.2010.-Despite
97. Roh JD, Houstis N, Yu A, et al. Exercise training reverses cardiac aging phenotypes associated with heart failure with preserved ejection fraction in male mice. *Aging Cell*. 2020;19(6). doi:10.1111/accel.13159
98. Clempus RE, Griendling KK. *Reactive Oxygen Species Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells*.; 2006.
99. Zhong S, Li L, Shen X, et al. An update on lipid oxidation and inflammation in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med*. 2019;144:266-278. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.036
100. Nunes Da Silva A. *Associação Entre Exercício Físico e Produção de Espécies Reativas de Oxigênio Exercise and Reactive Oxygen Species Relationship*.

ANEXOS

Aprovação do comitê de ética no uso de animais



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “**Efeito do treinamento físico em modelo experimental de aterosclerose submetido a privação ovariana: perfil hemodinâmico, autonômico e inflamatório**” registrada com o nº **1297/2019**, sob a responsabilidade de **Maria Claudia Costa Irigoyen** e **Bruno do Nascimento Carvalho**, apresentada pela Comissão Científica do InCor - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 26.07.19.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 13-05-2019 Término: 13-05-2023
Espécie/linhagem/idade	60 Camundongos fêmeas - Knockout para a Apolipoproteína-E (ApoE-Ko) – 2 meses 10 Camundongos machos C57Bl/6 – 7 semanas
Origem	Laboratório de Lípidos (LIM-10) do HCFMUSP Biotério FMUSP

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 26 de Julho de 2019

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais