

RESSALVA

Alertamos para ausência das páginas prefaciais não enviadas pelo(a) autor(a) no arquivo original.

1. INTRODUÇÃO

A incidência de doenças cardiovasculares e metabólicas na população mundial vem crescendo, e sua maior prevalência em indivíduos obesos tem chamado a atenção dos profissionais de saúde e pesquisadores da área. Muitos estudos populacionais têm demonstrado que o excesso de tecido adiposo, principalmente no abdômen, está intimamente relacionado ao risco de complicações cardiovasculares como o desenvolvimento das doenças arteriais coronárias e a hipertensão arterial. Além disso, o excesso de tecido adiposo também provoca algumas alterações metabólicas como as dislipidemias, a resistência à insulina e o diabetes mellitus tipo 2. Os fatores ambientais, entre eles o consumo de dietas inadequadas e a inatividade física, são os fatores que mais contribuem para a gênese da obesidade em humanos (PEREIRA et al., 2003, DESPRÉS E LEMIEUX, 2006).

O exercício físico regular, preferencialmente o aeróbio, tem sido recomendado na terapêutica não farmacológica da prevenção e/ou tratamento das doenças cardiovasculares e metabólicas, entre outras. Trabalhos mostram os benefícios do exercício físico na hemodinâmica cardiovascular, como a redução da resistência vascular periférica e do débito cardíaco, que ocorrem devido a uma maior produção de agentes relaxantes derivados do endotélio e pela redução da atividade simpática verificada após período de treinamento. Além disso, o exercício físico é capaz de promover aumento da sensibilidade à insulina e alterações benéficas do perfil lipídico

como redução dos triglicérides e aumento dos níveis de HDL colesterol (DURSTINE et al., 2001; IRIGOYEN et al., 2003; BRUM et al., 2005; HOLLOSZY, 2005).

No entanto, até o momento, nenhum estudo avaliou quais os efeitos do exercício físico crônico sobre a função endotelial e o perfil bioquímico de ratos que consumiram uma dieta hipercalórica. Diante deste quadro, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência do exercício físico regular sobre a reatividade do músculo liso vascular de anéis de artérias aorta e mesentérica de ratos que consumiram uma dieta hipercalórica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Músculo Liso Vascular e Endotélio

Os vasos possuem três camadas principais, a camada íntima (lúmen) constituída de células endoteliais, a camada média, composta de células musculares lisas, e a camada adventícia, constituída de tecido elástico (ZANESCO E ANTUNES, 2005).

Célula muscular lisa

A célula muscular lisa é comumente encontrada na forma de fuso com maior diâmetro na região do núcleo. O retículo sarcoplasmático, menos desenvolvido quando comparado aos retículos de outros tipos de células musculares, está em íntima associação com a membrana plasmática. A célula muscular lisa não apresenta o sistema de túbulos T responsável pela propagação do potencial de ação, mas observa-se a presença de invaginações denominadas de cavéolas que aumentam em até 75% a área de superfície celular, e estariam envolvidas na transdução de sinais por formarem sítios nos quais diferentes elementos de sinalização poderiam se agregar. Diferente do músculo esquelético, a troponina não está presente na musculatura lisa (VASCONCELOS E CARVALHO, 2005).

O processo de contração muscular ocorre quando um estímulo, mecânico ou químico, ativa as proteínas contráteis miosina e actina. O início do processo de contração da musculatura lisa ocorre quando a concentração de $[Ca^{2+}]_i$

aumenta, seja pela liberação deste íon proveniente do retículo sarcoplasmático ou pelo influxo extracelular. O Ca^{2+} presente no citosol liga-se à proteína calmodulina, formando o complexo cálcio-calmodulina que irá ativar a enzima miosina quinase, responsável por fosforilar o sítio ativo da cadeia leve de miosina, fazendo com que esta proteína ligue-se aos filamentos de actina promovendo a contração muscular (GUYTON E HALL, 1996).

Os agonistas contráteis ligam-se aos receptores acoplados a proteína G estimulando a fosfolipase C que cataliza a formação de segundos mensageiros como o inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) e o diacilglicerol. O IP_3 liga-se aos seus receptores localizados no retículo sarcoplasmático liberando Ca^{2+} para o citosol. A molécula de diacilglicerol ativa a proteína quinase C que por sua vez fosforila proteínas ligadas ao canal para cálcio do tipo L na membrana celular, favorecendo o influxo de Ca^{2+} para o citosol. A contração é inativada pela enzima miosina fosfatase que inibe a ligação entre a miosina e a actina (WEBB, 2003).

Endotélio e óxido nítrico

Até a metade do século XX, o endotélio era considerado apenas um conjunto de células homogêneas, razoavelmente estruturadas, com a função única de revestir internamente os vasos sanguíneos, separando o espaço intravascular do extravascular, garantindo uma superfície lisa para a corrente sanguínea. Somente a partir da década de 60, através de estudos de microscopia eletrônica, é que foi revelada a grande complexidade ultraestrutural das células endoteliais. Posteriormente, o isolamento e o cultivo *in vitro* destas células permitiram estudos detalhados de suas propriedades metabólicas e funcionais. Atualmente, sabe-se que as células endoteliais

são responsáveis pela síntese, metabolismo e liberação de grande variedade de mediadores que regulam a vasomotricidade, a permeabilidade vascular, o metabolismo de substâncias endógenas e exógenas, e a atividade plaquetária e leucocitária (IGNARRO, 1999).

Em 1980, Furchgott e Zawadzki demonstraram pela primeira vez, que a vasodilatação induzida pela acetilcolina em aorta isolada de coelhos requeria a presença de um endotélio íntegro. Assim, demonstraram que a ativação dos receptores colinérgicos (muscarínicos) nas células endoteliais pela acetilcolina induzia a liberação de uma substância lábil capaz de se difundir para o músculo liso vascular adjacente, causando relaxamento deste tecido por um mecanismo relacionado à elevação dos níveis intracelulares de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). Este mecanismo de relaxamento era semelhante ao dos nitrovasodilatadores, que também exerciam seu efeito através da formação de GMPc, mas de maneira independente do endotélio. Esta substância endotelial recebeu o nome de *Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio* (EDRF; *endothelium-derived relaxing factor*), e em 1987, foi demonstrado que o EDRF era o óxido nítrico (NO). Além da acetilcolina, outros mediadores endógenos como a histamina, bradicinina, ATP, trombina, noradrenalina, angiotensina e serotonina são capazes de liberar o EDRF/NO de artérias e veias de várias espécies animais, incluindo a humana. A biossíntese do NO compreende uma das funções mais importantes do metabolismo da L-arginina no organismo (FLEMING E BUSSE, 1999).

Enzimas conhecidas como sintases do NO (NOS) são capazes de catalisar a oxidação do nitrogênio terminal do grupamento guanidino da L-arginina formando quantidades equimolares de NO e L-citrulina. As sintases do NO dividem-se basicamente em dois grandes grupos: as isoformas constitutivas (cNOS) e a isoforma

induzível (iNOS). Ambas requerem um doador de elétron, a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH), e co-fatores como a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), a flavina mononucleotídeo (FMN) e (6R)-5,6,7,8-tetraidrobiopterina (BH₄). As cNOSs foram originalmente encontradas no endotélio e neurônios, sendo então denominadas eNOS (NOS endotelial) e nNOS (NOS neuronal), respectivamente. Ambas, eNOS e nNOS, são estimuladas por uma cascata bioquímica que envolve a participação dos íons Ca²⁺ e a calmodulina, e liberam o NO por curtos períodos de tempo. O NO produzido pela eNOS está envolvido no controle da pressão sanguínea, distribuição do fluxo sanguíneo aos órgãos e inibição da adesão e agregação de plaquetas e granulócitos polimorfonucleares. A nNOS é identificada em neurônios do sistema nervoso central e periférico e outras estruturas como glândulas adrenais, células epiteliais de pulmões, útero e estômago, células da mácula densa do rim, células da ilhota pancreática e músculo esquelético. No sistema nervoso central, o NO parece participar das funções de memória, aprendizado e visão. A iNOS é ativada por determinados estímulos patológicos, tais como lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) e citocinas, incluindo a interleucina-1 e fator de necrose tumoral. Esta isoforma pode ser expressa em uma grande variedade de tipos celulares incluindo macrófagos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, células de Kupffer, células endoteliais, hepatócitos e células epiteliais. É ativada independentemente do complexo Ca²⁺-calmodulina, e libera grandes quantidades de NO por períodos de tempo relativamente longos (MONCADA et al., 1991).

Uma vez liberado da célula, o NO difunde-se rapidamente da célula geradora para a célula alvo, onde interage com o grupamento heme da guanilato ciclase solúvel estimulando a sua atividade catalítica, levando à formação de GMPc que, por

sua vez, diminui os níveis intracelulares de Ca^{2+} . Os mecanismos pelos quais a via NO/GMPc induz vasodilatação incluem inibição da geração de IP_3 , aumento do seqüestro de Ca^{2+} citosólico, desfosforilação da cadeia leve de miosina, inibição do influxo de Ca^{2+} , ativação de proteínas quinases, estimulação da Ca^{2+} -ATPase de membrana e abertura de canais de K^+ (MONCADA et al., 1988; PALMER et al., 1988).

2.2 Dislipidemias e Função Endotelial

No modelo de obesidade animal, alguns estudos mostram que o consumo de dieta enriquecida de gorduras e sacarose por diferentes períodos entre três dias até 12 semanas provoca diminuição da resposta a agentes vasodilatadores como o carbacol em artéria mesentérica de ratos Wistar, mostrando que a função endotelial é reduzida quando os níveis de triglicérides estão aumentados e que estas alterações são tempo-dependentes (NADERALI et al., 2001; 2003).

Os mecanismos moleculares pelos quais a obesidade promove redução da resposta relaxante ainda não são claros. Trabalhos apontam para uma possível associação entre a disfunção endotelial e as dislipidemias, ou seja, altos níveis de triglicérides ou frações de LDL colesterol oxidado (LDLox) promoveriam danos à célula endotelial acarretando menor produção de NO, promovendo hipertensão arterial e distúrbios trombo-embólicos (KUSTERER et al., 1999; IMANISHI et al., 2006).

A dislipidemia é caracterizada pelo aumento na concentração de um ou mais componentes lipídicos presentes no sangue. Podem ocorrer de maneira isolada, quando apenas um dos componentes lipídicos está aumentado como na hipertrigliceridemia; ou podem caracterizar-se como mistas quando mais de um dos componentes está aumentado, ou ainda, quando temos aumento de um componente associado à diminuição de um outro. As causas das dislipidemias são de origem genética, metabólicas, falência de órgãos ou adquiridas em decorrência de maus hábitos alimentares. As dislipidemias podem ser classificadas em primárias, quando a origem esta relacionada a fatores genéticos, metabólicos e ambientais, e secundária, advindas de uma ou mais doenças, como: hipotireoidismo, diabetes mellitus, falência renal (LIMA, 1999).

Os fatores genéticos provocam dislipidemias pelo aumento de LDL e/ou diminuição de HDL plasmáticos. Entre as causas genéticas conhecidas estão as mutações relacionadas aos receptores de LDL colesterol que provocam uma menor captação do LDL sanguíneo pelo fígado (gene *LDLR*, relacionado ao desenvolvimento da hipercolesterolemia familiar); a redução do clearance de LDL plasmático causado por mutações no gene *APOB*; e a uma maior absorção de colesterol pelo intestino gerada por mutações nos genes *ABCG5* e *ABCG8*. Os níveis de HDL colesterol reduzidos estão relacionados aos genes *APOA1*, *ABCA1 transportador* e *LCAT* que provocam diminuição no transporte celular de colesterol e fosfolipídios (LUSIS et al., 2004).

A quantidade de gordura da dieta é um outro importante fator que contribui para o aumento e manutenção de altos níveis de colesterol sanguíneo. As dietas com alto teor de ácidos graxos saturados e colesterol, especialmente os de origem animal, aumentam os níveis de colesterol, portanto são responsáveis pelo desenvolvimento de hipercolesterolemia. Um indivíduo hipercolesterolêmico apresenta concentração de LDL colesterol elevada (> que 130 mg/dl), favorecendo o processo de oxidação desta partícula e aumentando o risco para a aterosclerose. Por outro lado, dietas ricas em ácidos graxos mono ou poli-insaturados aumentam a metabolização de lipoproteínas e elevam as quantidades de HDL colesterol plasmático (BITTENCOURT E SENNA, 2002).

A dislipidemia está estreitamente relacionada ao processo de aterosclerose. A aterosclerose é uma doença cardio-inflamatória, e caracteriza-se por um espessamento e acúmulo de lipídios na camada íntima do vaso, que produzem as estrias gordurosas e as placas ateromatosas ou fibrosas. A placa ateromatosa tem

coloração branca e apresenta calcificações em sua evolução, promovendo um endurecimento da parede arterial com possível rompimento e formação de trombos (coágulos sanguíneos) e seu desprendimento para a circulação. O primeiro evento para o desenvolvimento da aterosclerose é o acúmulo da lipoproteína LDL na camada íntima das artérias, e a adesão de células brancas (macrófagos, neutrófilos e linfócitos). Com o aumento da lesão, as células musculares lisas se proliferam e a produção de colágeno local aumenta formando assim uma capa fibrosa em torno da lesão, gerando diminuição do lúmen do vaso (LUSIS et al., 2004).

O processo de aterosclerose está estreitamente relacionado aos níveis plasmáticos de LDL colesterol. O primeiro passo para os efeitos deletérios destas moléculas é seu processo de oxidação. Vários trabalhos mostram que a existência de moléculas de LDL colesterol oxidado é um passo essencial para o aparecimento das placas de ateroma (WITZTUM E STEINBERG, 1991). A oxidação das moléculas de LDL colesterol está relacionada à sua alta concentração plasmática e a saturação do seu sistema de remoção, acarretando um aumento no seu tempo de permanência na circulação. A molécula de LDL colesterol pode ser oxidada por íons cálcio, lipoxigenases (produzidas pelas células endoteliais), mieloperoxidases (secretadas pelos fagócitos) e espécies reativas de oxigênio. O processo de oxidação das moléculas de LDL colesterol ocorre tanto no lúmen dos vasos como na camada íntima deste, ou seja, extra e intracelular. A molécula de LDL colesterol oxidada ou a molécula de LDL colesterol nativa é avidamente captada por receptores específicos (receptores de LDL) presentes na célula endotelial. A presença de LDL colesterol oxidado promove a migração de monócitos para a região, e sua posterior diferenciação em macrófagos. Dentro da camada íntima da artéria, os macrófagos

passam a englobar as moléculas de LDL colesterol oxidado e tornam-se células de espuma ou *foam cells* (HIRATA E HIRATA, 2002). Assim, as células de espuma nada mais são que macrófagos com grande concentração de molécula de LDL oxidadas em seu interior (Figura 1).

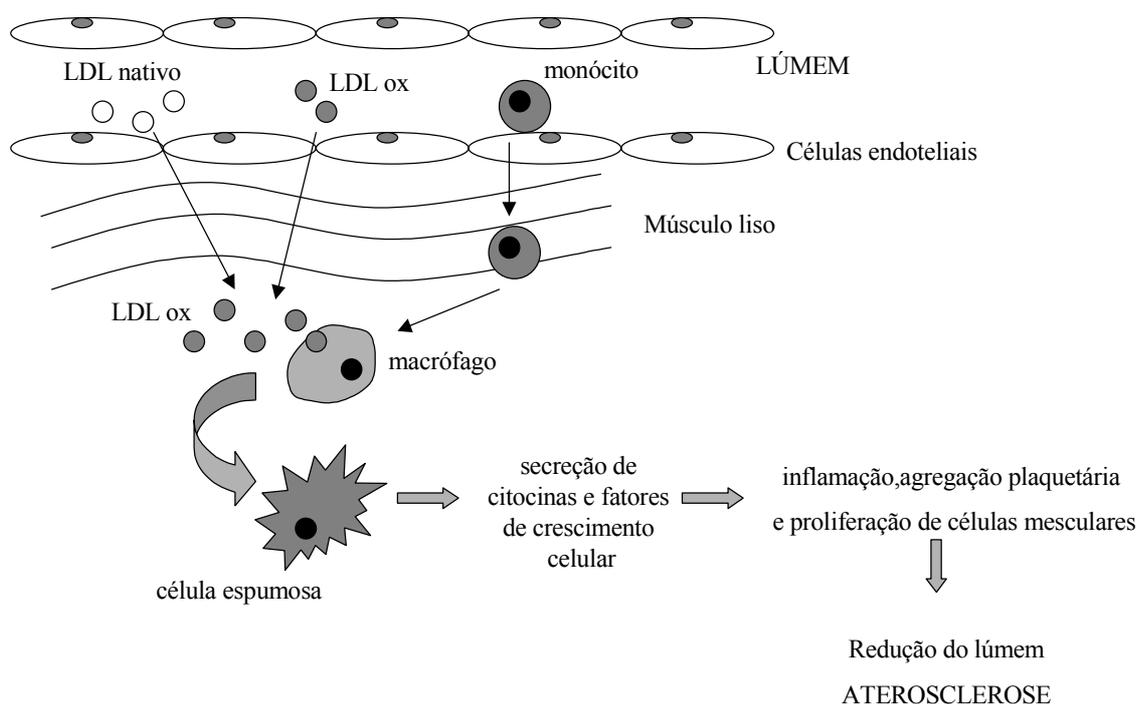


Figura 1. Etapas do processo de aterosclerose (adaptado de BARTER E RAY, 1996).

A captação da molécula de LDL colesterol oxidada é feita também por outros tipos de células como, as células endoteliais, as plaquetas e os adipócitos. Essa captação é dependente da expressão dos receptores de LDL colesterol que possuem maior afinidade pelo LDL colesterol oxidado do que pelo LDL colesterol não oxidado (nativo) e o seu bloqueio por antagonistas é uma importante abordagem terapêutica na prevenção da aterosclerose. Estas células de espuma passam a secretar citocinas

(substâncias pró-inflamatórias) que irão recrutar e ativar outras células de defesa (neutrófilos e linfócitos). Além disso, promovem a expressão de moléculas de adesão presentes nas células endoteliais (resposta inflamatória) que irão desencadear a adesão e agregação das plaquetas formando os trombos e conseqüentemente os eventos isquêmicos. Além das citocinas liberadas pelas células de espuma, a própria molécula de LDL colesterol oxidado possui propriedades pró-agregantes (ativação de plaquetas). O ácido lisofosfatídico formado durante a oxidação do LDL colesterol é considerado um componente importante na agregação plaquetária e formação de trombos no processo de aterosclerose na hipercolesterolemia (WILLOUGHBY et al., 2002).

O óxido nítrico impede a formação da molécula de LDL colesterol oxidada, através de sua ação antioxidante (dependente da concentração), diminuindo a formação de radicais livres, fundamentais para o processo de oxidação das moléculas de LDL colesterol. A ação antiagregante do NO é devida à sua ligação com a molécula de guanilato ciclase que induz a formação de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) que promove a redução da concentração de íons cálcio dentro da plaqueta e inibição de sua ativação e agregação. Portanto, a disfunção das células endoteliais com deficiência na produção de NO em decorrência de excesso de moléculas de LDL colesterol é um fator de risco de grande importância na doença arterial coronariana (WANG et al., 2000).

A lipoproteína HDL colesterol é considerada um fator de proteção para a doença arterial coronariana e seu nível reduzido (abaixo de 35 mg/dl) pode ser considerado como um fator de risco independente para o desenvolvimento prematuro de doença arterial coronária (ECKARDSTEIN et al., 2001). Sua propriedade anti-

aterogênica é devida ao transporte reverso das moléculas de colesterol, que consiste na remoção do excesso das moléculas de colesterol dos tecidos periféricos, transportando-o para o fígado, onde elas serão metabolizadas e eliminadas na forma de ácidos graxos e sais biliares (BARTER E RYE, 1996).

2.3 Exercício Físico, Endotélio e Espécies Reativas de Oxigênio

O exercício físico é caracterizado pela contração muscular esquelética, e durante sua execução ocorrem algumas alterações cardiovasculares como: aumento do fluxo sanguíneo para a musculatura em atividade e redução da resistência vascular periférica proporcional ao aumento do débito cardíaco e conseqüentemente elevação da pressão arterial sistólica. Para o ajuste de todas estas alterações cardiovasculares, que o exercício dinâmico provoca, alterações neurais e humorais ocorrem. Os fatores humorais que irão provocar o relaxamento da musculatura vascular com redução da resistência vascular periférica e conseqüentemente da pressão arterial são dependentes do endotélio (KINGWELL, 2000; MAEDA et al., 2001).

Os efeitos benéficos do exercício físico têm sido descritos em diversos estudos tanto em humanos quanto em modelos animais. No entanto, grande variabilidade existe em cada estudo com relação ao volume de treinamento, envolvendo a intensidade (carga de trabalho), a freqüência (dias por semana) e a duração das sessões (tempo de cada sessão). O protocolo de exercício físico preconizado para melhora da capacidade cardiorespiratória é aquele onde o indivíduo faz exercício aeróbio (corrida, natação, andar de bicicleta são os mais comuns) com intensidade entre 50 a 85% do consumo máximo de oxigênio (VO_2max), com 3 a 5 sessões semanais e duração entre 20 e 60 minutos de atividade contínua. A interação entre a intensidade, a freqüência e a duração determina o dispêndio calórico, a melhora na capacidade de utilização do oxigênio, ou redução de riscos de doenças crônicas (ACSM, 2000). É importante salientar que toda a prescrição do exercício depende da condição inicial e da progressão do indivíduo dentro do protocolo escolhido. Estudos mostram que os exercícios de intensidade moderada (50 a 70% VO_2max) são suficientes em produzir

benefícios na melhora do perfil lipídico e da pressão arterial (BANZ et al., 2003; COUILLARD et al., 2001).

Sabe-se que o exercício físico aumenta o fluxo sanguíneo pulsátil e que a pressão que o sangue exerce sobre a parede vascular e a tensão de cisalhamento (shear stress) sob as células endoteliais são estímulos poderosos para a geração de NO, no sistema vascular (veja figura 2). Os mecanismos moleculares pelos quais o shear stress provoca maior atividade da enzima eNOS e conseqüentemente aumento na produção de NO são complexos e envolvem diversas vias de sinalização dentro da célula endotelial. A primeira etapa é a ativação de mecanorreceptores presentes na membrana das células endoteliais. Estes mecanorreceptores podem ser as proteínas Gs, os canais iônicos, a caveolina e as integrinas que captam as alterações de tensão sobre a parede celular e convertem os estímulos mecânicos em estímulos químicos para a ativação da eNOS (KOJDA E HAMBRECHT, 2005). As vias envolvidas neste processo estão relacionadas a ativação de proteínas como a PKC, a c-Src e a Akt/ PI3K que fosforilam a eNOS ativando-a independente de cálcio (HIGASHI E YOSHIKAWA, 2004; KOJDA E HAMBRECHT, 2005). A capacidade das células endoteliais de perceber e responder às mudanças no fluxo sanguíneo é um fator essencial na regulação do tono vascular e envolve a ativação de fatores de crescimento celular promovendo o remodelamento da parede arterial e manutenção da integridade do endotélio. Assim, um dos efeitos benéficos do exercício físico regular está estreitamente relacionado à sua capacidade de estimular a síntese de NO pelas células endoteliais (DELP et al., 1993; WANG et al., 1993; SESSA et al., 1994; SHEN et al., 1994; WOODMAN et al., 1997, KINGWELL, 2000).

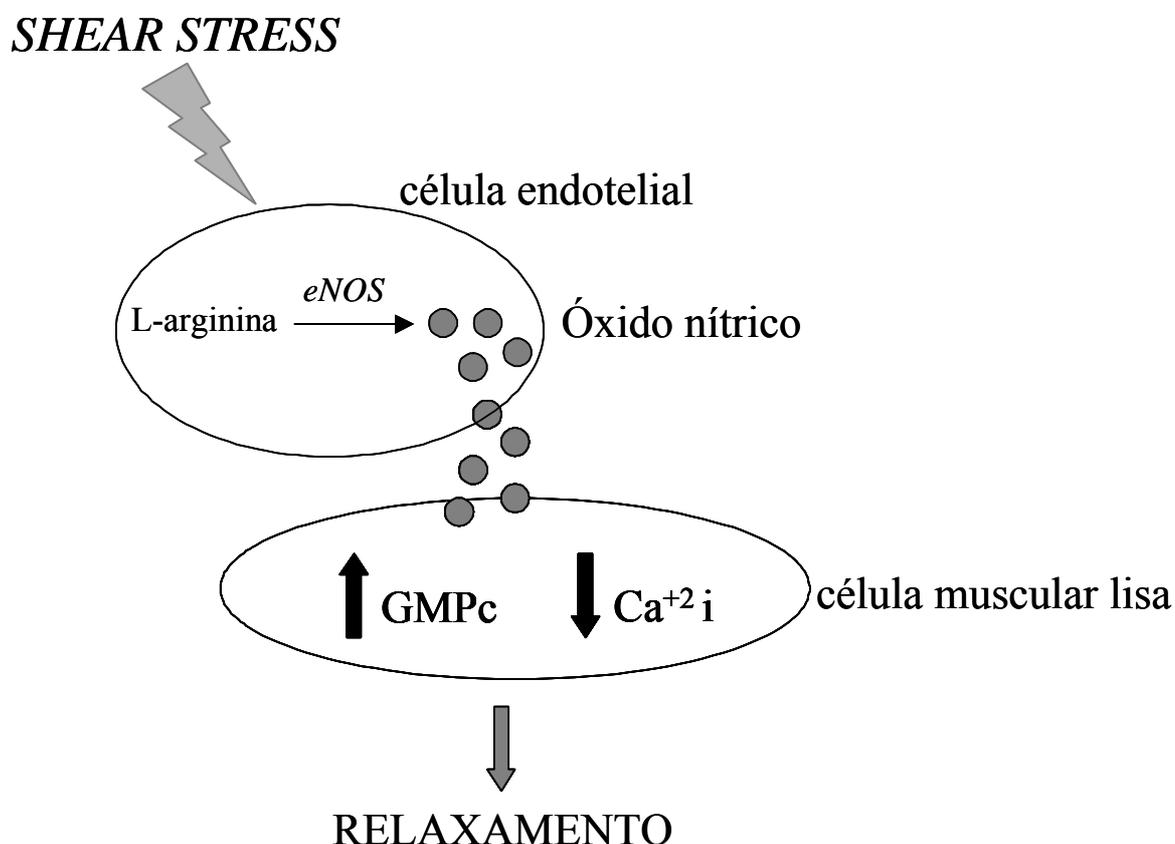


Figura 2. Formação e mecanismo de ação do óxido nítrico (NO) sobre as células musculares desencadeado pelo shear stress.

Outra modificação vascular provocada pelo exercício físico está relacionada à expressão e à atividade de enzimas pró e anti oxidantes. Dentre as enzimas antioxidantes presentes no tecido vascular temos a catalase, a glutathione peroxidase e mais três tipos de superóxido dismutase (SOD), sendo a SOD-1 dependente de Cu/Zn, presente no núcleo e no citosol, a SOD-2 dependente de Mn, presente na mitocôndria e a SOD-3 dependente de Cu/Zn, presente na matriz

extracelular. Destas enzimas, a SOD-1 Cu/Zn é a mais sensível ao shear stress provocado pelo exercício físico (RUSH et al., 2003).

O stress oxidativo é definido como a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por diferentes células do organismo, como as células endoteliais, a célula muscular lisa, as células da camada adventícia, células do sistema imunológico, etc (GRIENGLING et al., 2000). As EROs são formadas por atividade enzimática intra e extracelular, sendo a xantina oxidase, o citocromo P450, a via da cicloxigenase, a eNOS desacoplada e a NADPH oxidase as principais enzimas envolvidas neste processo. A NADPH oxidase é a principal enzima formadora de ânion superóxido, aumentando o stress oxidativo observado em doenças cardiovasculares (FORTUÑO et al., 2005).

A enzima eNOS desacoplada passa a produzir EROs em detrimento da produção de óxido nítrico (NO) quando a biodisponibilidade de L-arginina ou de (6R)-5,6,7,8-tetraidrobiopterina (BH₄), substratos para a formação de NO, apresentam-se em concentrações menores que a ideal (SHINOZAKI et al., 1999).

As EROs formadas no tecido vascular ativam enzimas que promovem o crescimento e a diferenciação celular, como a proteína ativada por mitose, e ativam proteínas que desencadeiam processos inflamatórios, como o fator nuclear kappaB, desencadeando alterações estruturais e funcionais como o remodelamento vascular, aumento da deposição de proteínas da matriz extracelular e aumento do processo inflamatório e da permeabilidade endotelial nos tecidos envolvidos. Por isso, as EROs possuem importante papel no desenvolvimento da disfunção endotelial e de doenças crônicas como a hipertensão e a aterosclerose (FORTUÑO et al., 2005). A reação do ânion superóxido com o NO produzido pela célula endotelial reduz a

biodisponibilidade deste agente vasodilatador e dá origem a uma molécula altamente instável, o peroxinitrito, capaz de oxidar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos provocando danos celulares (BECKMAN E KOPPENOL, 1996).

Por outro lado, a função endotelial é melhorada pela ação das enzimas antioxidantes, que tem a função de tornar as EROs formadas no tecido vascular menos reativas e até mesmo inativá-las. Por exemplo, a ação da SOD sobre o ânion superóxido converte-o em peróxido do hidrogênio, uma molécula mais estável que posteriormente é convertida à água pelas enzimas catalase e glutathione peroxidase, evitando assim que o ânion superóxido inative a molécula de NO (FORTUÑO et al., 2005). Outra importante enzima antioxidante que tem papel fundamental na manutenção ou melhora da função endotelial é a glutathione peroxidase que converte o NO em um composto mais estável e biologicamente ativo conhecido como S-nitrosoglutathione, que migra da célula endotelial onde é formado para o músculo liso relaxando-o, via ativação da guanilato ciclase solúvel (CARR E FREI, 2000).

O efeito protetor do exercício físico regular de intensidade moderada, contra o stress oxidativo, está relacionado ao aumento da atividade do sistema antioxidante, aumentando a expressão de enzimas antioxidantes (SOD-1 e SOD-3), e diminuição das enzimas pró oxidantes (NADPH e suas subunidades gp91^{phox}, gp67^{phox} e p22^{phox}), bem como redução da expressão de moléculas de adesão (HIGASHI E YOSHIZUMI, 2004; KODJA E HAMBRECHT, 2005).

2.4 Modelos de Obesidade em Animais

Diferente dos humanos, a gênese da obesidade em animais de laboratório está relacionada, em grande parte, a modificações genéticas que podem alterar ou suprimir a secreção de neuropeptídeos ou hormônios relacionados à saciedade ou ao metabolismo. Além disso, de acordo com o gene modificado, os animais desenvolvem a obesidade precoce ou tardiamente, em conjunto com outras doenças associadas como resistência à insulina, diabetes mellitus, hipercolesterolemia, hipertensão arterial e infertilidade, possibilitando a investigação da fisiopatologia da obesidade e das suas co-morbidades (TSCHÖP E HEIMAN, 2001).

O modelo mais utilizado para o estudo da obesidade é baseado na modificação genética dos animais. No entanto, este modelo é muitas vezes distante da gênese da obesidade em humanos, visto que são raros os casos de indivíduos obesos com alguma mutação genética (CONSIDINE et al., 1996). Isso pode ser exemplificado pela ação da leptina no controle da saciedade. Sabe-se que a leptina reduz o apetite através da inibição da formação de neuropeptídeos relacionados ao apetite, como o neuropeptídeo Y, e também através do aumento da expressão de neuropeptídeos anorexígenos, no sistema nervoso central (FRIEDMAN E HALLAS, 1998). Em animais de laboratório, como os camundongos *ob/ob* (com mutação no gene *ob*, gene responsável pela secreção endógena de leptina) os níveis de leptina estão muito reduzidos, o que provoca quadro de hiperfagia, e conseqüentemente obesidade. Quando estes animais são tratados com leptina, a ingestão alimentar é reduzida gerando perda de peso (WILDING, 2001). Em seres humanos, indivíduos obesos apresentam altos níveis plasmáticos de leptina, sugerindo uma possível resistência central a este hormônio, e a administração de leptina em voluntários obesos não reverte o quadro de

obesidade (CONSIDINE et al., 1996). Estes dados mostram que os mecanismos que controlam o metabolismo e o peso corporal, em seres humanos, são mais complexos (LEE et al., 2002).

Outro modelo de indução de obesidade em animais de laboratório que é muito utilizado é a adoção de dietas hipercalóricas que provocam maior ganho de peso. Este modelo em particular mostra-se muito útil nas pesquisas com obesidade em animais de laboratório devido a sua grande semelhança com a gênese e as respostas metabólicas decorrentes da obesidade em humanos (WEST E YORK, 1998; TSCHÖP E HEIMAN, 2001). Alguns estudos têm demonstrado a eficácia deste modelo na gênese da obesidade e de suas co-morbidades, principalmente em porcos (THOMAS et al., 2002; THOMPSON et al., 2004) e em roedores da linhagem Sprague-Dawley (PETRY et al., 2000; DOBRIAN et al., 2000). Animais da linhagem Wistar também são utilizados em estudos onde a obesidade é induzida por dietas, e os resultados mostram que o peso corporal, os níveis plasmáticos de leptina e os de triglicerídeos estão aumentados (NADERALI et al., 2001; ESTADELLA et al., 2004). Assim, o estudo de dietas hipercalóricas tem se mostrado uma ferramenta útil no estudo da obesidade.

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A obesidade é reconhecida como um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares incluindo doenças coronarianas, infarto e hipertensão arterial. Diversos modelos de obesidade animal foram desenvolvidos e assim, algumas das complicações decorrentes desta doença puderam ser investigadas. O modelo que mais se assemelha ao da obesidade humana é aquele no qual um balanço energético positivo crônico ocorre, ou seja, a obesidade induzida pelo consumo de dieta hipercalórica.

O exercício físico regular, preferencialmente o aeróbio, tem sido recomendado na terapêutica não farmacológica da prevenção e/ou tratamento das doenças cardiovasculares, entre outras. Diversos trabalhos mostram os benefícios do exercício na hemodinâmica cardiovascular, como redução da resistência vascular periférica com o aumento da produção ou da biodisponibilidade de substâncias vasoativas como óxido nítrico. No entanto, até o momento, nenhum estudo havia sido realizado para averiguar quais são os efeitos do condicionamento físico sobre a resposta vascular em animais submetidos à dieta hipercalórica.

A hipótese do nosso trabalho foi a de que o consumo de uma dieta hipercalórica promoveria alterações metabólicas que levariam a redução da função endotelial, e neste caso o exercício físico atuaria como um fator para a prevenção e normalização destas alterações.

Assim, o objetivo geral do presente estudo foi:

Avaliar a influência do exercício físico regular sobre a reatividade vascular de anéis de artéria aorta e mesentérica de ratos Wistar que consumiram dieta hipercalórica e foram submetidos a um programa de exercício físico.

Os objetivos específicos foram:

1. Avaliação das respostas relaxante e contrátil de anéis de artérias aorta e mesentérica de ratos sedentários e treinados que consomem dieta hipercalórica e ração padrão, através de:
 - ✓ Curvas concentração-efeito ao agonista muscarínico acetilcolina (avaliação do relaxamento dependente do endotélio);
 - ✓ Curvas concentração-efeito ao doador de óxido nítrico nitroprussiato de sódio (avaliação do relaxamento independente do endotélio);
 - ✓ Curvas concentração-efeito ao agonista α_1 adrenérgico fenilefrina
2. Avaliação do perfil lipídico (colesterol total, triglicérides e HDL-colesterol);
3. Avaliação da concentrações de insulina e de glicose no soro;
4. Dosagem dos ânions nitrito e nitrato plasmáticos;
5. Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase no soro;
6. Avaliação da expressão arterial das isoformas da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS), e a expressão da Cu/Zn superóxido dismutase (SOD) utilizando a técnica de Western-blotting.

4. MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Animais

Ratos Wistar com aproximadamente 10 semanas (270-290 g) provenientes do Biotério Central da UNICAMP foram mantidos no Biotério de Manutenção do Departamento Farmacologia da FCM-UNICAMP. Os animais foram alojados em caixas coletivas com quatro animais em cada, em ciclos de claro/escuro (12/12 h), recebendo dieta hipercalórica ou ração padrão (Labina, Purina) e água *ad libitum*.

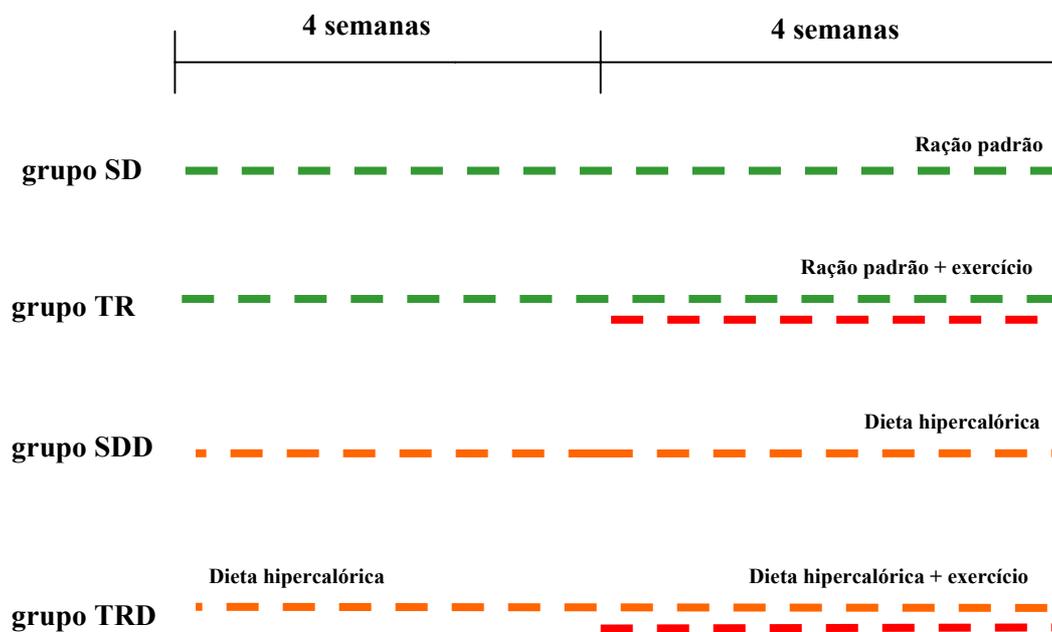
4.2 Protocolo experimental Terapêutico

Este protocolo experimental com duração de 08 semanas teve como objetivo avaliar a eficácia do exercício aeróbio sobre as alterações metabólicas e vasculares de ratos que consumiram dieta hipercalórica por 4 semanas. O treinamento físico foi iniciado após 4 semanas de consumo de dieta hipercalórica ou ração padrão e durou mais 4 semanas.

Para realização deste protocolo foram utilizados 32 animais, divididos em quatro grupos:

1. Grupo sedentário (SD)
2. Grupo treinado por 4 semanas (TR)
3. Grupo sedentário consumindo dieta hipercalórica (SDD)
4. Grupo treinado previamente ao início do consumo da dieta hipercalórica (TRD)

O esquema a seguir ilustra o desenho experimental utilizado para realização do protocolo terapêutico



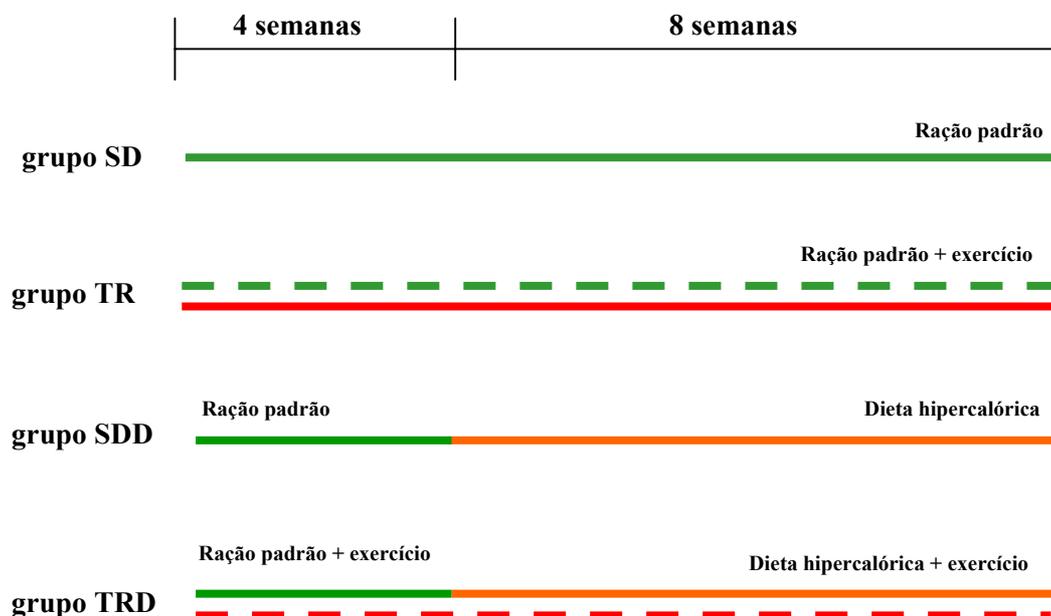
4.3 Protocolo experimental Preventivo

Este protocolo experimental com duração de 12 semanas teve como objetivo avaliar a eficácia preventiva do exercício aeróbio sobre o desenvolvimento de alterações metabólicas e vasculares de animais que consumiram dieta hipercalórica.

Para realização deste protocolo foram utilizados 32 animais, divididos em quatro grupos:

1. Grupo sedentário (SD);
2. Grupo treinado por 12 semanas (TR);
3. Grupo sedentário consumindo dieta hipercalórica (SDD);
4. Grupo treinado previamente ao início do consumo da dieta hipercalórica (TRD).

O esquema a seguir ilustra o desenho experimental utilizado para realização do protocolo preventivo.



4.4 Composição das dietas

A dieta hipercalórica utilizada neste estudo foi processada no Laboratório de Biodinâmica da UNESP/ Rio Claro. Esta dieta fornece 4 kcal/g, sendo 56% sob a forma de carboidratos, 18% sob a forma de proteínas e 26 % sob a forma de lipídeos (Anexo I e II). Como padrão será utilizada ração para animais de laboratório Labina (Purina) que fornece 3 kcal/g sendo 40% sob a forma de carboidratos, 3,8 % sob a forma de lipídeos e 26,5% sob a forma de proteínas

4.5 Programa de treinamento físico: corrida em esteira

Na primeira semana de estudo, todos os animais foram submetidos a um período de adaptação à esteira que consistia em manter os animais na esteira em velocidades variando entre de 0,3 no primeiro dia até 0,6 km/h no quinto dia da semana. Progressões de tempo na duração das sessões também foram realizadas até que os animais conseguissem permanecer correndo na esteira por 60 minutos. Durante o período de adaptação alguns animais foram excluídos porque em nenhum momento realizaram o exercício. Após este período, somente os animais “corredores” foram submetidos ao treinamento físico que foi iniciado com uma velocidade de 0,6 Km/h na primeira sessão, aumentando progressivamente conforme a evolução do grupo de animais, até a segunda semana onde se atingia a velocidade final entre 0,9 e 1,2 Km/h, o que corresponde a máxima fase estável de lactato do animal.

As sessões de exercício foram realizadas 5 dias por semana, com duração de 60 minutos cada, durante o período de treinamento previsto para o protocolo experimental. As sessões foram realizadas em uma esteira ergométrica elétrica, em baias individuais, com as seguintes dimensões: 0,70 m de largura, 0,45 m de altura e 1,35 m de comprimento. Após o término do período total de treinamento, os animais foram mantidos em repouso por um período de 48 horas, quando foram sacrificados.

4.6 Medida de pressão arterial

A pressão arterial dos animais foi medida pelo método de *tail cuff* (ZATZ, 1990) ao final do período experimental, no dia anterior ao sacrifício dos animais.

4.7 Avaliação da reatividade vascular

As artérias aorta e mesentérica foram isoladas e imediatamente colocadas em solução de Krebs-Ringer. Após remoção dos tecidos gorduroso e conjuntivo, cortes transversais foram feitos para a obtenção dos anéis. Cada artéria forneceu quatro anéis que foram montados em cubas para órgão isolado de 10 ml contendo solução de Krebs-Ringer (composição em mM: NaCl: 118; NaHCO₃: 25; glicose 5,6; KCl: 4,7; KH₂PO₄: 1,2; MgSO₄.7H₂O: 1,17 e CaCl₂.2H₂O: 2,5), aquecida a 37°C e borbulhada com 95% de O₂ e 5% de CO₂. Os tecidos foram então suspensos entre dois ganchos de metal e um deles fixo e o outro conectado a um transdutor de força permitindo assim o ajuste preciso da tensão. A tensão inicial de 10 mN foi aplicada aos tecidos (CHEN et al., 2001) e periodicamente ajustada até que ocorresse a estabilização de tensão dos mesmos. As alterações de tensão foram medidas usando-se transdutores isométricos (Ugo-Basile, Varese, Itália) e registradas em sistema PowerLab de aquisição de dados (software versão 4.2, AD Instruments, MA, EUA).

4.8 Curvas concentração-efeito em anéis de artéria aorta e mesentérica

A resposta contrátil foi avaliada através de curvas concentração-efeito para a fenilefrina (PE; 1nM- 3µM) na presença de propranolol (100 nM), enquanto que a resposta relaxante foi avaliada através do agonista acetilcolina (ACh; 10 nM-100 µM) em anéis de artéria aorta e de mesentérica com endotélio, nos diferentes grupos experimentais. Para as curvas concentração-efeito ao agente dilatador, os anéis de aorta e de mesentérica foram pré-contraídos com fenilefrina (PE; 1 µM) na ausência ou presença de N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME 100 µM) um inibidor da

formação de óxido nítrico, ou ainda, pré contraídos com solução de KCl 80 mM (composição em mM: NaCl: 43; NaHCO₃: 25; glicose 5,6; KCl: 80; KH₂PO₄: 1,2; MgSO₄.7H₂O: 1,17 e CaCl₂.2H₂O: 2,5) para bloquear a ação dos EDHFs, acrescido de indometacina (5 μM) um inibidor da ciclooxigenase.

Foram realizadas também curvas concentração-efeito ao doador de óxido nítrico que atua diretamente no músculo liso vascular, nitroprussiato de sódio (SNP; 100 pM- 10 nM), em anéis de artéria aorta e de mesentérica com e sem endotélio. Os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina (PE; 1μM) na ausência ou na presença do 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1 (ODQ 1μM) inibidor da guanilato ciclase solúvel, ou ainda, pré contraídos com solução de KCl (80 mM) acrescido de indometacina (5 μM).

As curvas concentração-efeito foram obtidas através do aumento cumulativo das concentrações da droga utilizada em meia unidade logarítmica entre doses sucessivas (VAN ROSSUM, 1963). Os dados obtidos nas curvas concentração-efeito em anéis de aorta e mesentérica foram avaliados segundo a equação descrita abaixo:

$$E = E_{\max} / ((1 + (10^c / 10^x)^n) + \Phi)$$

A letra E representa o efeito do agonista na resposta tecidual; E_{max} representa a resposta máxima que o agonista pode produzir; c representa o logaritmo da EC₅₀, definida como a concentração do agonista que produz metade da resposta máxima; x representa o logaritmo das concentrações do agonista; o exponencial n é o coeficiente angular ou inclinação, o qual define o tipo de curva concentração-efeito

obtida e, finalmente, o símbolo Φ representa a resposta observada na ausência do agonista.

O programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) foi utilizado para realização das análises estatísticas, que incluem regressão não linear para determinação da E_{\max} e do $\log EC_{50}$.

4.9 Determinação dos parâmetros bioquímicos

Após jejum noturno, de aproximadamente 14 horas, os animais foram anestesiados com halotano e uma incisão longitudinal no abdômen do animal foi feita para coleta de sangue arterial (7 ml), obtida do ramo descendente da artéria aorta. As amostras de sangue foram processadas para obtenção do soro e do plasma que foram utilizados para as dosagens bioquímicas.

4.9.1 Perfil lipídico

Amostras de soro foram utilizadas para a determinação dos níveis de colesterol total (CT) e triglicerídeos (TG) pelo método enzimático utilizando-se kit específico (LABORLAB, Guarulhos, SP, Brasil). O HDL-colesterol (HDL) foi determinado pelo método da precipitação utilizando também kit específico (LABORLAB, Guarulhos, SP, Brasil). O índice aterogênico foi determinado a partir da fórmula (YOKOZAWA et al., 2002):

$$IA = (CT - HDL) / HDL\text{-colesterol}$$

4.9.2 Insulina, glicose sangüínea e índice HOMA

A determinação da insulina no soro foi realizada pelo método de radioimunoensaio utilizando insulina marcada (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA), e para leitura das amostras um contador de emissão radioativa da marca RIASTAR foi utilizado. A glicose no soro foi determinada pelo método enzimático utilizando kit específico (LABORLAB, Guarulhos, SP, Brasil), as amostras foram lidas em espectrofotômetro da marca FENTO. O índice HOMA de resistência à insulina foi calculado a partir da fórmula (MATTHEWS et al., 1985):

$$\text{HOMA RI} = (\text{insulina jejum} \times \text{glicose jejum}) / 22,5$$

Onde: insulina de jejum em mU/l e glicose de jejum em mmol/l

4.9.3 Nitrito e nitrato plasmáticos (NO_x)

A produção de óxido nítrico foi determinada indiretamente pela quantificação dos produtos da reação do óxido nítrico com o oxigênio, nitrito e nitrato. Amostras de plasma foram filtradas utilizando filtro de membrana (Millipore, Bedford, MA, USA), a seguir a concentração de NO_x na solução filtrada foi determinada pelo método de ELISA, utilizando o kit colorimétrico (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA).

4.9.4 Atividade da SOD no soro

A atividade da SOD foi avaliada pelo método de ELISA utilizando o kit colorimétrico (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Este ensaio mede a atividade dos três tipos de SOD (Cu/Zn, Mn e Fe-SOD) e os resultados obtidos são expressos em

U/ ml, onde uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para a dismutação de 50% dos radicais superóxido formados pela adição da xantina oxidase à amostra.

4.10 Detecção da eNOS, nNOS e da Cu/Zn SOD pelo método de Western-blotting

4.10.1 Preparação das amostras e medidas de proteína

Os anéis de artéria aorta e mesentérica superior foram congelados a -70°C e posteriormente homogeneizados (homogeneizador de vidro) em tampão de Tris-HCL. O homogenato foi centrifugado e o sobrenadante recolhido. Alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para a determinação da concentração de proteína pelo método de Bradford (1976), e então a quantidade necessária para se aplicar 50 ou 100µg de proteína no gel de acrilamida foi calculada para cada amostra. Em seguida foi preparado o gel em um sistema Mini-Protean (BioRad, Hercules, CA, USA) com concentração de acrilamida de 7,5% para detecção das isoformas da NOS (com 100 µg de proteína) e outro com concentração de 12% para detecção da Cu/Zn SOD (com 50 µg de proteína).

4.10.2 Eletroforese e transferência das amostras

As alíquotas do homogenato foram diluídas em solução de Laemmli (Uréia- 0,5 mM; SDS- 0,17 mM; DTT- 39 µM; Tris- HCL pH=8 - 0,01 M e Azul de bromofenol- 0,5%) e mantidas a 99°C durante 4 minutos e, em seguida, estas amostras foram aplicadas no gel com SDS (Lauril Sulfato Sódico)-poliacrilamida

(SDS-PAGE) e submetidas a eletroforese em gel em um sistema Mini-Protean II (Electrophoresis Cell, BioRad, Hercules, CA, USA) durante aproximadamente 3 horas, a uma corrente constante de 90 Volts (Power Pac 200, BioRad, Hercules, CA, USA). Junto com as amostras foi aplicado no gel um padrão de proteínas “marcadores de peso molecular” (BioRad, Hercules, CA, USA), estes marcadores foram utilizados para comprovar a “transferência” das proteínas do gel para a membrana, e além disso, estes marcadores auxiliaram na localização das proteínas de interesse na membrana. No mesmo gel também foram aplicadas amostras de células endoteliais e de cérebro de rato como controle positivo para eNOS e nNOS/SOD, respectivamente (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA).

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de polivinil difluorida (PVDF Hybond, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), previamente ativada, durante 20 segundos, com metanol. Para a transferência o gel, a membrana e o papel Whatman foram colocados em um sistema de *sandwich* e imersos em uma cuba (Mini-Protean II, Modulo de Transferência, BioRad, Hercules, CA, USA) contendo a solução de transferência (Tris- 25 mM; Glicina- 190 mM; SDS-0,05 % e Metanol- 20 %). O sistema foi submetido a uma corrente de 230 mA (Power Pac 200, BioRad, Hercules, CA, USA), durante 18 horas.

A transferência foi confirmada através da coloração do gel com Azul de Croomassie, onde se observou a ausência de bandas no gel. As proteínas das membranas foram fixadas e coradas com ácido acético 1%, por 5 minutos, e coradas com Ponceau- 0,1%; ácido acético-1% durante 20 minutos. A descoloração das membranas foi feita com uma sequência de lavagens iniciada com ácido acético-1%, seguida por água e finalizando com o TBS-T (Tris- 10 mM, NaCl- 100 mM e Tween

20- 0,1 %). Todo este processo confirma a boa transferência das proteínas para o gel, além proporcionar a fixação destas proteínas na membrana. As membranas foram então incubadas durante 60 minutos à temperatura ambiente e sob agitação com uma solução bloqueante (leite desnatado 5%, Tris- 10 mM, NaCl- 100 mM e Tween 20- 0,1 %).

4.10.3 Incubação com os anticorpos e detecção das proteínas de interesse

Para a detecção das proteínas de interesse, as membranas foram incubadas durante 15 horas com anticorpo primário à temperatura de 4°C e sob agitação. Os anticorpos primários são monoclonais contra as isoformas da NOS e da Cu/Zn SOD , sendo utilizados em uma diluição de 1:1500 em solução bloqueante (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA). Em seguida, as membranas foram lavadas 6 X 15 minutos com TBS-T (Tris- 10 mM, NaCl- 100 mM e Tween 20- 0,1 %), sob agitação. Posteriormente, estas membranas foram incubadas com anticorpos secundários: Imunoglobulina IgG Anti-coelho unida à peroxidase de rábano (BioRad, Hercules, CA, USA), em uma diluição de 1:1500 para detecção da isoforma eNOS, ou Imunoglobulina IgG Anti-camundongo unida à peroxidase de rábano (BioRad, Hercules, CA, USA), em uma diluição de 1:1500 para detecção das isoformas da nNOS e da SOD. Os anticorpos secundários foram diluídos em solução bloqueante e incubados por 90 minutos, à temperatura ambiente e sob agitação. Ao final, o excesso dos anticorpos secundários foram lavados com solução de TBS-T em 6 lavagens sucessivas de 15 minutos cada. As proteínas de interesse foram detectadas por uma reação de quimioluminescência utilizando um sistema de detecção (ECL Plus, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). A seguir, as membranas foram

colocadas em contato com um filme fotográfico (Hyperfilm, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), e as bandas impregnadas foram posteriormente reveladas.

Após detecção da expressão das diferentes proteínas de interesse, as membranas foram incubadas com solução para limpeza (Tris-62,5 mM, SDS-10%, β -Mercaptoetanol-100 mM) por 40 minutos a 50°C e lavada por duas vezes com TBS-T por 30 minutos. Posteriormente, a membrana foi incubada com a solução bloqueante e todo o protocolo de incubação foi repetido com anticorpo primário monoclonal anti α -actina na diluição 1:3000 (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA). A expressão da α -actina foi medida para normalização da expressão das isoformas da NOS e da SOD.

As bandas das proteínas separadas pela técnica de Western blot foram quantificadas mediante análise densitométrica. Para tal, os filmes com as bandas proteicas impregnadas foram gravados por um *scanner* e para análise e quantificação das bandas foi utilizada o programa de análise de imagens Scion Image for Windows (Scion Corporate, Frederick, MD, USA).

4.11 Análise estatística

Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) para n experimentos. Foi realizada análise de variância (ANOVA *two-way*) para determinação das diferenças entre os grupos utilizando o programa SPSS 10.0, e foi adotado um nível de significância de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. PROTOCOLO TERAPÊUTICO

Peso corporal, gordura epididimal, pressão arterial e parâmetros bioquímicos

O peso inicial dos animais não foi diferente entre os grupos. Os animais tratados com dieta hipercalórica apresentaram um maior ganho de peso quando comparados aos do grupo controle (6%). O exercício físico por 4 semanas promoveu redução do peso corporal tanto nos animais que consumiam ração padrão (11%) quanto nos animais que consumiram dieta hipercalórica (6%). Resultados semelhantes foram verificados para a quantidade de gordura epididimal. O treinamento físico reduziu a quantidade de gordura epididimal, em cerca de 27% quando comparado ao grupo sedentário com dieta normal. A dieta hipercalórica induziu aumento significativo deste depósito de gordura (cerca de 56%, $p < 0,05$) quando comparado ao grupo sedentário. Este aumento foi significativamente reduzido nos animais que treinaram e que consumiram a dieta hipercalórica (tabela 1, figura 3).

A pressão arterial sistólica não foi modificada pela dieta hipercalórica ou pelo treinamento físico por 4 semanas (SD: 91 ± 3 ; TR: 87 ± 4 ; SDD: 86 ± 4 ; e TRD: 85 ± 3 mmHg, para $n = 6$).

Com relação ao perfil lipídico, a dieta hipercalórica elevou significativamente a concentração de triglicerídeos. O treinamento físico *per se* foi eficaz em reduzir a concentração de triglicerídeos em 31%, e aumentar a concentração de HDL-colesterol em 33% no grupo TR. Já a associação da dieta hipercalórica por 8 semanas e o exercício físico durante 4 semanas produziu uma redução de 46% na concentração de triglicerídeos no grupo TRD, sem nenhuma alteração na concentração de HDL-colesterol. Nenhuma alteração foi observada para os níveis de colesterol total em todos os grupos. A avaliação do índice aterogênico mostra uma elevação

significativa do risco para aterosclerose para o grupo que consumiu a dieta hipercalórica, que não foi modificada pelo treinamento físico. Os dados estão sumarizados na tabela 1.

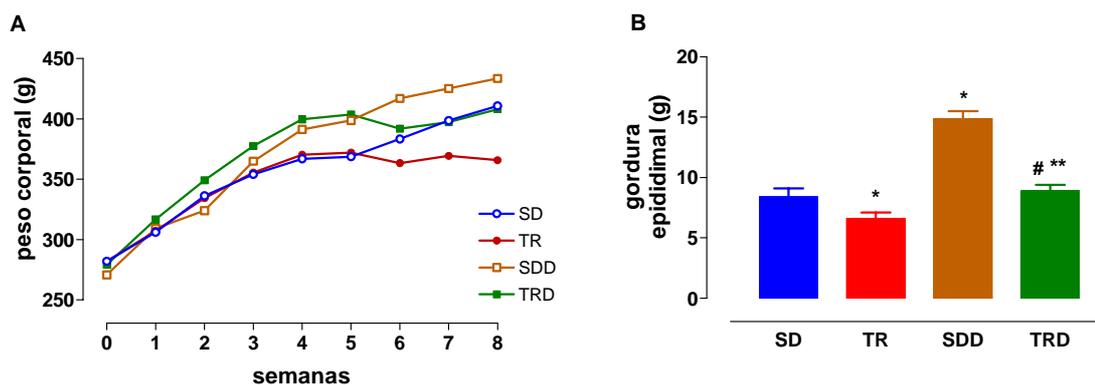


Figura 3. Evolução do peso corporal durante as 8 semanas do protocolo experimental (A) e peso da gordura epididimal ao final do estudo (B), para animais dos grupos sedentário (SD), treinado (TR), sedentário dieta (SDD) e treinado dieta (TRD). *diferente de SD; # diferente de SDD; ** diferente de TR; para $p < 0,05$ (ANOVA *two-way*). Dados estão expressos como média \pm EPM, $n = 8$ animais em cada grupo.

Tabela 1. Peso corporal, peso da gordura epididimal, perfil lipídico sérico e índice aterogênico de ratos dos grupos sedentário (SD); treinado (TR); sedentário dieta (SDD) e treinado dieta (TRD).

	SD	SDD	TR	TRD
Peso inicial (g)	271 ± 5	282 ± 4	282 ± 4	279 ± 4
Peso final (g)	410 ± 14	434 ± 9*	366 ± 10*	408 ± 6 [#]
Gordura epididimal (g)	8,4 ± 0,7	14,9 ± 0,6*	6,6 ± 0,5*	8,9 ± 0,5 ^{#**}
Triglicerídidos (mg/dl)	81,9 ± 12,6	111,1 ± 9,1*	62,4 ± 8,1*	50,8 ± 3,4 [#]
Colesterol total (mg/dl)	26,6 ± 1,3	31,2 ± 2,6	29,9 ± 1,8	30,4 ± 2,7
HDL- colesterol (mg/dl)	15,5 ± 0,6	13,9 ± 1,0	20,7 ± 1,5*	12,3 ± 1,6 ^{**}
Índice aterogênico	0,72 ± 0,08	1,40 ± 0,32*	0,86 ± 0,15	1,48 ± 0,25

Índice aterogênico= (colesterol total – HDL)/ HDL.*diferente de SD; # diferente de SDD; ** diferente de TR; para $p < 0,05$ (ANOVA *two-way*). Dados expressos como média ± EPM, $n = 8$ em cada grupo.

Com relação às concentrações séricas de glicose e de insulina em jejum, o consumo da dieta hipercalórica produziu um aumento significativo da glicemia em torno de 10% para o grupo SDD (SD: 136,0 ± 6,4; TR: 116,8 ± 6,7; SDD: 149,1 ± 7,0 e TRD: 142,1 ± 13,7 mg/ dl), e um aumento de 100% na insulinemia (SD: 0,62 ± 0,14; TR: 0,74 ± 0,13; SDD: 1,24 ± 0,10 e TRD: 0,94 ± 0,24 ng/ ml). O exercício físico não provocou alteração destes parâmetros. O cálculo do índice HOMA para avaliação de resistência à insulina mostra que o grupo SDD apresenta valores significativamente maiores que o seu grupo controle (figura 4).

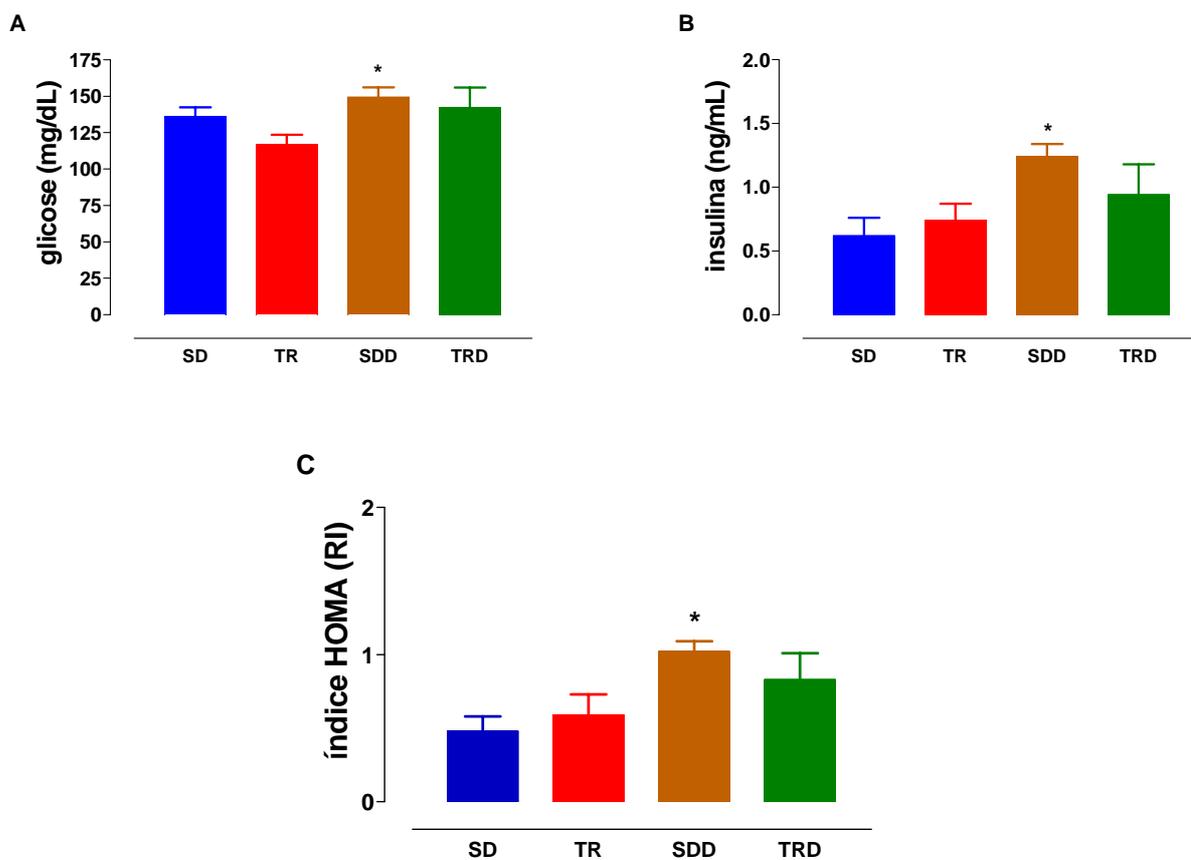


Figura 4. Concentrações séricas de glicose (A), insulina (B) e o índice HOMA (C) de ratos dos grupos sedentário (SD); treinado (TR); sedentário dieta (SDD) e treinado dieta (TRD). Índice HOMA de resistência à insulina, $HOMA\ RI = [insulina\ jejum\ (mU/l) \times glicemia\ jejum\ (mmol/l)] / 22,5$. Dados estão expressos como média \pm EPM, $n = 8$ animais em cada grupo. * diferente de SD, para $p < 0,05$ (ANOVA *two-way*).

Efeitos da dieta hipercalórica e do treinamento físico sobre a resposta contrátil e relaxante a concentração de fenilefrina (PE) e acetilcolina (ACh) em anéis de artéria aorta e mesentérica com endotélio

O consumo da dieta hipercalórica por 8 semanas não provocou diferença na resposta contrátil a fenilefrina em anéis de artéria aorta (SD: $5,9 \pm 1,0$; TR: $4,8 \pm 0,8$; SDD: $5,2 \pm 1,0$ e TRD: $5,3 \pm 1,4$ mN), porém em anéis de mesentérica a tensão gerada pela concentração de $1\mu\text{M}$ de PE foi significativamente maior no grupo SDD (SD: $4,6 \pm 0,6$; TR: $5,2 \pm 0,4$; SDD: $5,9 \pm 0,6$ e TRD: $5,5 \pm 0,6$). O treinamento físico não modificou a resposta contrátil em nenhum dos grupos (figura 5 painéis A e B).

Quanto ao relaxamento induzido pela concentração de $1\mu\text{M}$ de acetilcolina, nenhuma diferença foi provocada pelo consumo da dieta hipercalórica em anéis de artéria aorta (SD: $43,9 \pm 2,3$ e SDD: $46,5 \pm 5,1\%$), mas esta resposta relaxante foi significativamente reduzida em anéis de mesentérica (SD: $70,5 \pm 4,0$ e SDD: $42,1 \pm 5,5\%$). Por outro lado, o treinamento físico aumentou o relaxamento induzido pela acetilcolina em anéis de aorta (TR: $56,9 \pm 3,4$ e TRD: $60,2 \pm 2,8\%$) e de mesentérica (TR: $81,7 \pm 2,9$ e TRD: $71,8 \pm 3,5\%$). Os resultados estão ilustrados na figura 5, painéis C e D.

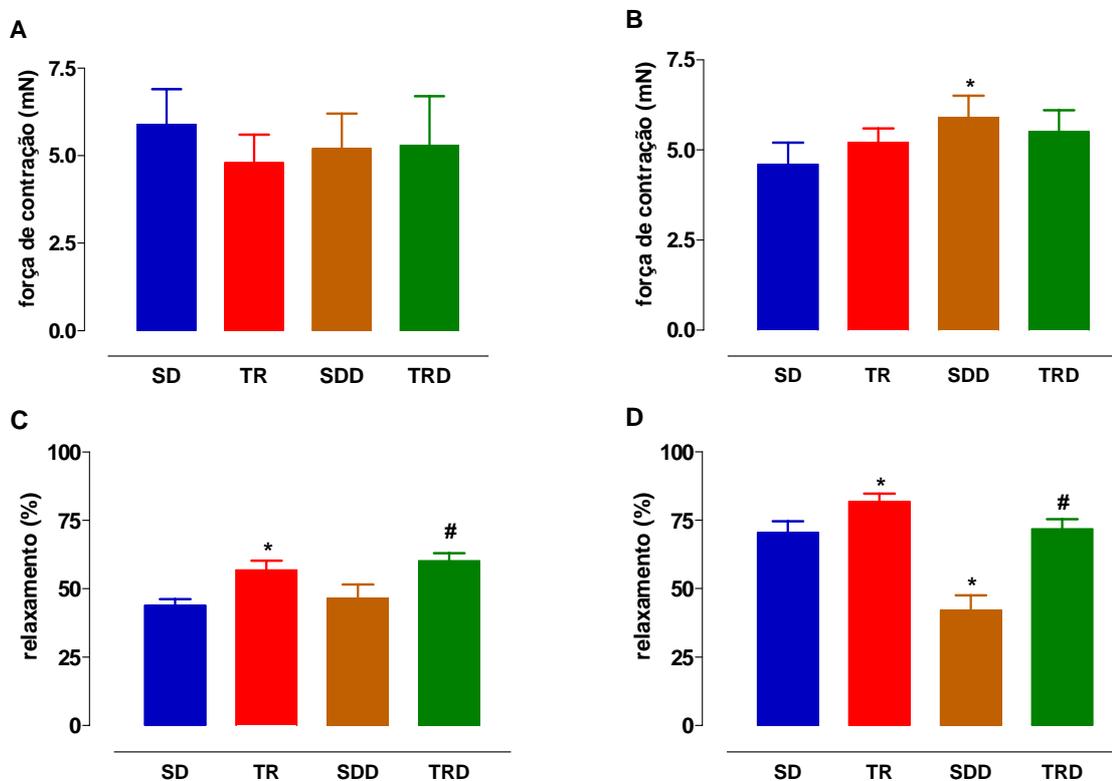


Figura 5. Efeito da dieta hipercalórica e do exercício físico sobre a resposta contrátil a dose de 1 μ M de fenilefrina em artéria aorta (A) e mesentérica (B). Os painéis inferiores referem-se ao relaxamento a dose de 1 μ M de acetilcolina em anéis de aorta (C) e mesentérica (D) pré-contraídos com 1 μ M de fenilefrina. Anéis de artérias provenientes de ratos dos grupos: sedentário (SD); treinado (TR); sedentário dieta (SDD), e treinado dieta (TRD). Dados apresentados como média \pm EPM para $n=6$ animais. * diferente de SD; # diferente de SDD, para $p<0,05$ (ANOVA *two-way*).

Efeitos da dieta hipercalórica e do treinamento físico sobre a resposta relaxante da acetilcolina (ACh) em anéis de artéria aorta e mesentérica com endotélio

AORTA

A ACh promoveu um relaxamento de anéis de aorta que foi dependente da concentração. O consumo da dieta hipercalórica não provocou qualquer alteração na resposta máxima a ACh em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina (SD: $77,0 \pm 1,3\%$ vs SDD: $76,6 \pm 2,3\%$). O treinamento físico *per se* ou associado ao consumo da dieta hipercalórica promoveu aumento significativo da resposta máxima (aproximadamente de 15%) em ambos os grupos. Um aumento de 2,5 vezes na potência da acetilcolina foi observado somente para o grupo TR. Os dados estão sumarizados na tabela 2 e as curvas concentração efeito estão ilustradas na figura 6A.

A pré-contração com KCl (80 mM) em presença de indometacina, reduziu significativamente a resposta máxima em todos os grupos. Os anéis de aorta de animais que consumiram a dieta hipercalórica, tanto aqueles do grupo sedentário (SDD) quanto do treinado (TRD), mostraram-se mais resistentes a redução da resposta máxima a ACh quando comparados aos resultados de seus respectivos controles. A potência à ACh foi reduzida de maneira semelhante em todos os grupos (tabela 2 e figura 6C). A adição de L-NAME no banho, aboliu completamente a resposta relaxante a acetilcolina em anéis de aorta com endotélio pré contraídos com fenilefrina (figura 6E).

MESENTÉRICA

O consumo da dieta hipercalórica provocou redução da resposta relaxante à ACh em cerca de 15%. O treinamento físico *per se* provocou um aumento de aproximadamente 7% na resposta máxima a acetilcolina nos animais TR e um aumento de 18% no relaxamento nos animais TRD, revertendo assim a diminuição do relaxamento provocada pelo consumo da dieta hipercalórica. Nenhuma alteração na potência da ACh foi observada em todos os grupos (tabela 2 e figura 6B).

A pré-contração com KCl (80 mM), na presença de indometacina, reduziu a resposta máxima a acetilcolina em anéis de artéria mesentérica para todos os grupos de maneira similar. A potência da ACh também foi reduzida em todos os grupos, porém no grupo TR essa redução foi de menor amplitude (tabela 2 e figura 7D). A adição de L-NAME no banho reduziu tanto a resposta máxima quanto a potência a acetilcolina em anéis de mesentérica, porém os anéis de artérias provenientes dos animais do grupo SD mostraram-se mais resistentes à inibição provocada pelo L-NAME (tabela 2 e figura 6F).

Tabela 2. Valores de potência (pEC₅₀) e de resposta máxima (E_{max}) a acetilcolina em anéis de artéria aorta e mesentérica com endotélio de animais sedentário (SD); treinado (TR); sedentário dieta (SDD) e treinado dieta (TRD).

	SD	TR	SDD	TRD
AORTA				
PE				
pEC ₅₀	6,52 ± 0,02	6,92 ± 0,02*	6,64 ± 0,06	6,53 ± 0,03
E _{max}	77,0 ± 1,3	88,1 ± 2,3*	76,6 ± 2,3	89,8 ± 2,6 [#]
KCI+INDO				
pEC ₅₀	5,75 ± 0,04	5,84 ± 0,04	5,96 ± 0,02	5,92 ± 0,04
E _{max}	20,9 ± 2,1	23,1 ± 2,2	33,9 ± 3,4*	31,5 ± 2,1**
PE+LNAME				
E _{max}	4,2 ± 0,4	4,5 ± 0,5	4,8 ± 0,9	3,6 ± 0,9
MESENTÉRICA				
PE				
pEC ₅₀	7,11 ± 0,01	7,19 ± 0,04	7,00 ± 0,04	6,97 ± 0,08
E _{max}	87,6 ± 1,7	93,3 ± 0,8*	76,2 ± 1,9*	90,7 ± 3,0 [#]
KCI+INDO				
pEC ₅₀	6,28 ± 0,16	6,60 ± 0,08*	6,13 ± 0,13	6,22 ± 0,12
E _{max}	53,0 ± 1,8	55,6 ± 2,6	46,2 ± 3,7	59,2 ± 3,0
PE+L-NAME				
E _{max}	39,4 ± 2,8*	24,1 ± 3,1	22,0 ± 3,2	17,9 ± 1,9

Valores são expressos como média ± EPM para $n = 6$ animais.* diferente de SD; [#] diferente de SDD; ** diferente de TR, para $p < 0,05$ (ANOVA *two-way*).

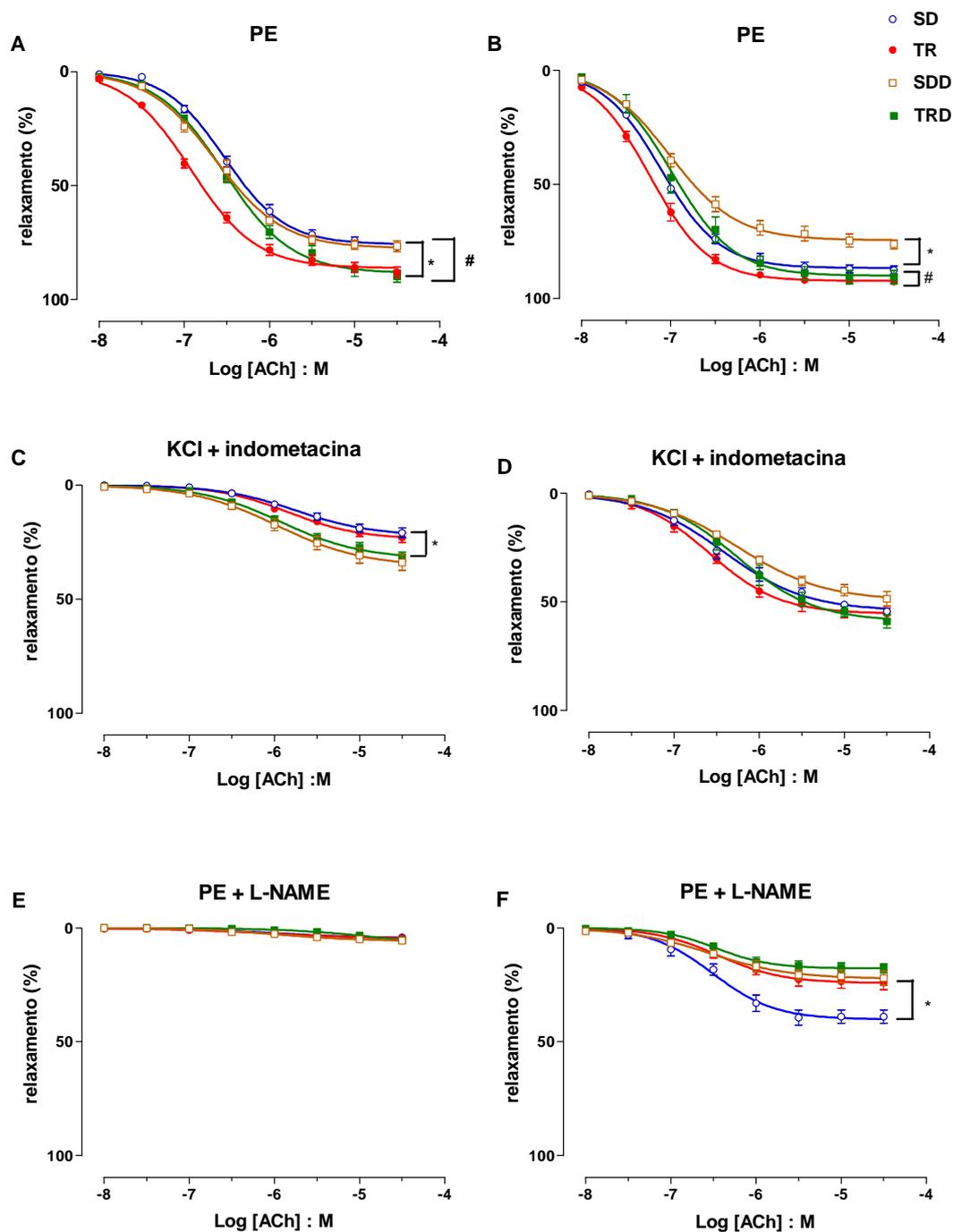


Figura 6. Curvas concentração-efeito a acetilcolina (ACh) em anéis de artéria aorta (A, C, E) e mesentérica (B, D, F) com endotélio de ratos sedentário (SD); treinado (TR); sedentário dieta (SDD) e treinado dieta (TRD). Os anéis pré-contraídos com fenilefrina (PE; 1 μ M) são mostrados nos painéis A e B, pré-contraídos com KCl 80mM na presença de indometacina (5 μ M) painéis C e D e pré-contraídos com fenilefrina (PE) na presença de L-NAME (100 μ M) nos painéis E e F. Dados apresentados como média \pm EPM para $n=6$ animais. Símbolos apontam diferença na resposta máxima em % de relaxamento. * diferente de SD; # diferente de SDD, para $p<0,05$ (ANOVA *two-way*).

Efeitos da dieta hipercalórica e do treinamento físico sobre a resposta relaxante ao nitroprussiato de sódio (SNP) em anéis de artéria aorta e mesentérica com endotélio intacto (E+) e mecanicamente removido (E-)

AORTA COM ENDOTÉLIO

A resposta máxima e a potência ao vasodilatador com ação independente do endotélio (SNP) não foi diferente entre os grupos estudados (tabela 3 e figura 7A).

A pré-contração com KCl (80 mM), na presença de indometacina, produziu redução significativa tanto na resposta máxima quanto na potência à este doador de óxido nítrico em todos os grupos de maneira similar (tabela 3 e figura 7C). A presença de ODQ no banho aboliu a resposta ao SNP em anéis de aorta, porém os anéis de artérias provenientes dos grupos treinados mostraram-se mais resistentes a inibição provocada pelo ODQ (tabela 3 e figura 7E).

MESENTÉRICA COM ENDOTÉLIO

As respostas ao SNP em anéis de artéria mesentérica foram semelhantes às observadas na aorta. Tanto a resposta máxima quanto a potência ao doador de óxido nítrico não foram modificadas pela dieta hipercalórica ou pelo exercício físico (tabela 3 e figura 7B).

A pré-contração com KCl (80 mM), na presença de indometacina, provocou redução da resposta e da potência nos anéis de mesentérica para todos os grupos (tabela 3 e figura 7D). A adição de ODQ aboliu a resposta ao SNP em anéis de artéria mesentérica em todos os grupos (tabela 3 e figura 7F).

AORTA SEM ENDOTÉLIO

A resposta máxima ao SNP em anéis sem endotélio não foi diferente entre os grupos estudados. A potência ao doador de NO está aumentada em 2,3 vezes no grupo TRD quando comparado ao grupo SDD (tabela 4 e figura 8A).

MESENTÉRICA SEM ENDOTÉLIO

Os resultados obtidos em anéis sem endotélio mostram que a dieta ou o exercício físico não promoveram alteração tanto na resposta máxima quanto na sensibilidade ao doador de NO utilizado (tabela 4 e figura 8B).

Tabela 3. Valores de potência (pEC₅₀) e de resposta máxima (E_{max}) ao nitroprussiato de sódio em anéis de artéria aorta e mesentérica com endotélio (E+) dos grupos sedentário (SD); treinado (TR); sedentário dieta (SDD) e treinado dieta (TRD).

	SD	TR	SDD	TRD
AORTA (E+)				
PE				
pEC ₅₀	8,18 ± 0,01	8,39 ± 0,03	8,40 ± 0,01	8,22 ± 0,02
E _{max}	102,7 ± 1,5	104,1 ± 1,0	107,5 ± 1,8	106,8 ± 2,4
KCI+INDO				
pEC ₅₀	7,39 ± 0,01	7,40 ± 0,02	7,57 ± 0,02	7,54 ± 0,04
E _{max}	76,7 ± 1,7	83,1 ± 2,6	80,6 ± 3,0	84,8 ± 2,4
PE + ODQ				
E _{max}	16,0 ± 1,7	25,2 ± 3,7*	10,2 ± 1,7	26,3 ± 4,0 [#]
MESENTÉRICA (E+)				
PE				
pEC ₅₀	8,32 ± 0,01	8,44 ± 0,01	8,35 ± 0,01	8,28 ± 0,02
E _{max}	105,6 ± 1,9	105,5 ± 1,1	106,3 ± 1,3	105,0 ± 3,3
KCI+INDO				
pEC ₅₀	7,83 ± 0,03	7,87 ± 0,02	8,00 ± 0,03	7,93 ± 0,03
E _{max}	88,6 ± 2,8	88,1 ± 2,8	90,4 ± 4,4	89,0 ± 3,2
PE + ODQ				
E _{max}	18,8 ± 2,0	19,5 ± 1,9	20,8 ± 1,4	22,0 ± 1,3

Valores expressos como média ± EPM para $n = 6$. * diferente de SD; [#] diferente de SDD; para $p < 0,05$ (ANOVA *two-way*).

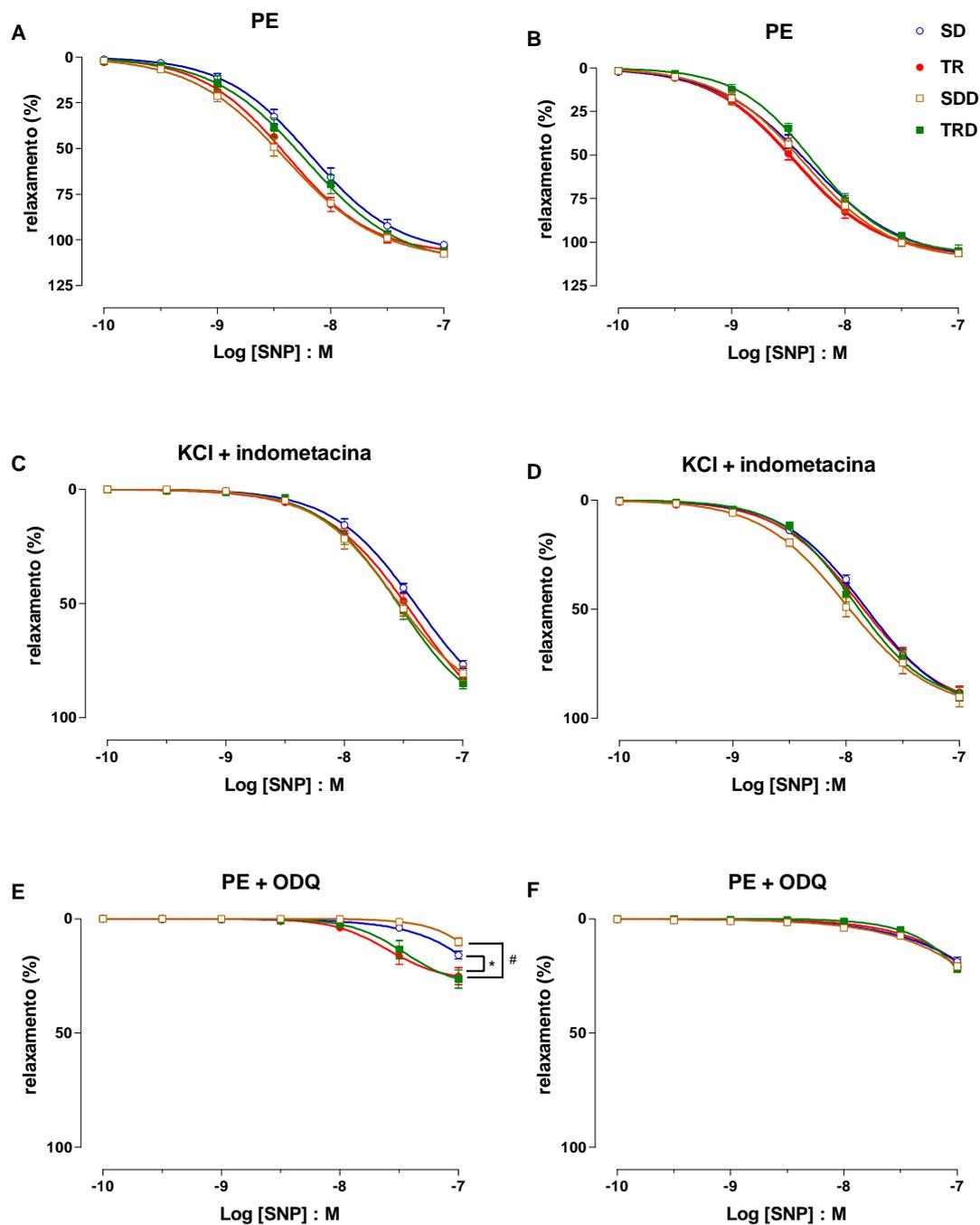


Figura 7. Curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio (SNP) em anéis de artéria aorta (A, C, E) e mesentérica (B, D, F) com endotélio de ratos sedentário (SD); treinado (TR); sedentário dieta (SDD) e treinado dieta (TRD). Os anéis pré-contraídos com fenilefrina ($1 \mu\text{M}$) são mostrados nos painéis A e B, pré-contraídos com KCl 80mM na presença de indometacina ($5 \mu\text{M}$) nos painéis C e D, e pré-contraídos com fenilefrina na presença de ODQ ($1 \mu\text{M}$) nos painéis E e F. Dados apresentados como média \pm EPM para $n=6$ animais. Símbolos apontam diferença na resposta máxima em % de relaxamento. * diferente de SD; # diferente de SDD, para $p < 0,05$ (ANOVA *two-way*).

Tabela 4. Valores de potência (pEC_{50}) e de resposta máxima (E_{max}) ao nitroprussiato de sódio em anéis de artéria aorta e mesentérica sem endotélio (E-) dos grupos sedentário (SD); treinado (TR); sedentário dieta (SDD) e treinado dieta (TRD).

	SD	TR	SDD	TRD
AORTA (E-)				
PE				
pEC_{50}	$8,23 \pm 0,04$	$8,40 \pm 0,06$	$8,11 \pm 0,03$	$8,47 \pm 0,02^*$
E_{max}	$111,9 \pm 4,3$	$110,0 \pm 2,2$	$117,6 \pm 3,8$	$113,7 \pm 4,0$
MESENTÉRICA (E-)				
pEC_{50}	$8,43 \pm 0,05$	$8,51 \pm 0,03$	$8,54 \pm 0,06$	$8,47 \pm 0,03$
E_{max}	$117,5 \pm 3,9$	$124,6 \pm 4,3$	$114,6 \pm 3,1$	$108,2 \pm 0,8$

Valores expressos como média \pm EPM para $n = 6$. * diferente de SD; para $p < 0,05$ (ANOVA *two-way*).

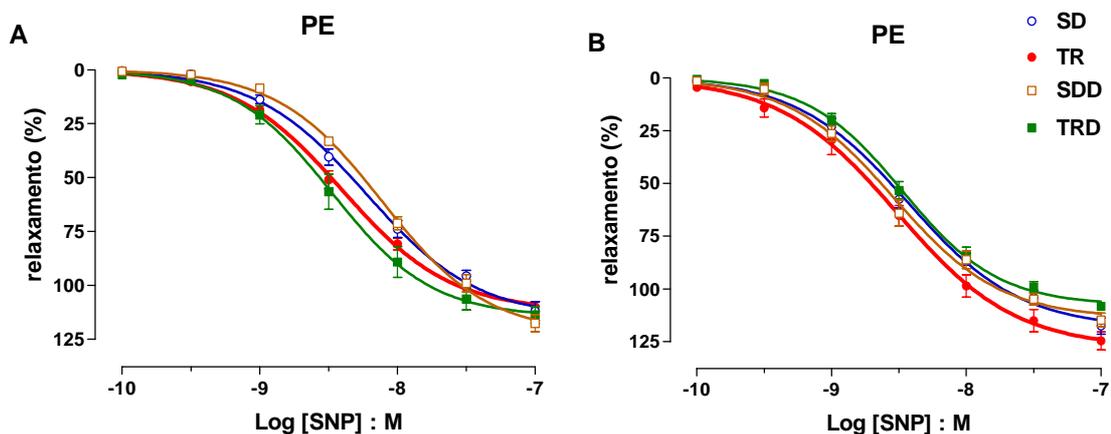


Figura 8. Curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio (SNP) em anéis de artéria aorta (A) e mesentérica (B) sem endotélio de ratos sedentário (SD); treinado (TR); sedentário dieta (SDD) e treinado dieta (TRD). Os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina ($1 \mu M$). Dados apresentados como média \pm S.E.M para $n=6$ animais.

Efeitos da dieta hipercalórica e do treinamento físico sobre a resposta contrátil à fenilefrina (PE) em anéis de artéria aorta e mesentérica

AORTA

O agonista α -adrenérgico, fenilefrina, promoveu resposta contrátil que foi concentração dependente em anéis de aorta. A resposta máxima e a potência a fenilefrina não foram modificadas pelo consumo da dieta hipercalórica ou pelo exercício físico (tabela 5 e figura 9A).

MESENTÉRICA

Os resultados obtidos em anéis de mesentérica com endotélio intacto não apontam diferença tanto na resposta máxima quanto na potência a fenilefrina para todos os grupos estudados (tabela 5 e figura 9B).

Tabela 5. Valores de potência (EC_{50}) e de resposta máxima (E_{max}) a fenilefrina em anéis de artéria aorta e mesentérica com endotélio intacto para os grupos sedentário (SD); treinado (TR); sedentário dieta (SDD) e treinado dieta (TRD).

	SD	TR	SDD	TRD
AORTA E+				
pEC_{50}	$7,23 \pm 0,05$	$7,17 \pm 0,05$	$7,06 \pm 0,05$	$7,06 \pm 0,03$
E_{max} (mN)	$4,4 \pm 0,5$	$3,0 \pm 0,2$	$3,9 \pm 0,5$	$5,6 \pm 0,7$
MESENTÉRICA E+				
pEC_{50}	$7,19 \pm 0,05$	$7,12 \pm 0,06$	$6,97 \pm 0,05$	$6,99 \pm 0,05$
E_{max} (mN)	$6,9 \pm 0,6$	$7,5 \pm 0,6$	$9,2 \pm 1,3$	$7,6 \pm 1,5$

Valores expressos como média \pm EPM para $n = 6$.

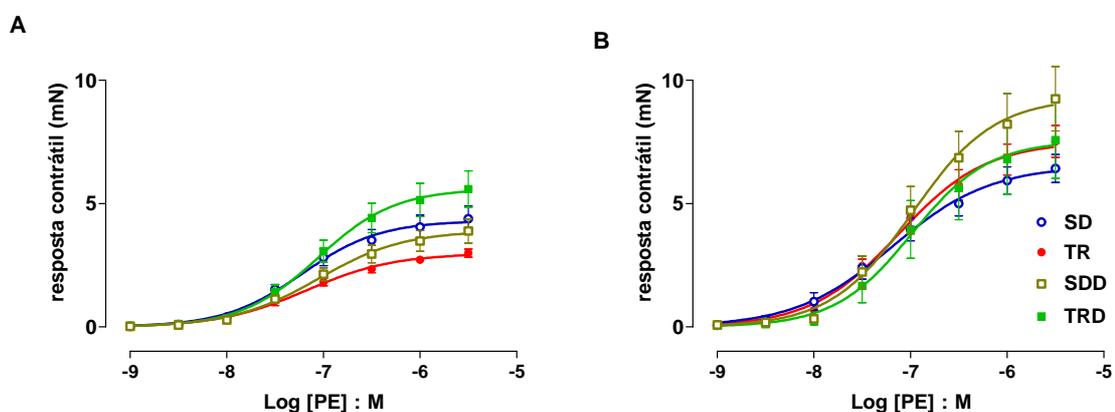


Figura 9 Curvas concentração-efeito a fenilefrina (PE; 1 nM – 3 μ M) na presença de propranolol (100 nM) em anéis de artéria aorta (A) e em anéis de mesentérica (B), para os grupos sedentário (SD); treinado (TR); sedentário dieta (SDD) e treinado dieta (TRD). Símbolos apontam diferença na resposta máxima em mN.

Os níveis plasmáticos de nitrito/nitrato ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) revelaram que tanto o treinamento físico quanto o consumo da dieta hipercalórica não produziram qualquer alteração na concentração de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$. Por outro lado, a associação do treinamento físico com o consumo da dieta hipercalórica produziu uma elevação significativa, cerca de 40%, nos níveis de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ no grupo TRD (SD: $27,0 \pm 3,5$; TR: $30,0 \pm 4,1$; SDD: $30,4 \pm 4,0$ e TRD: $41,7 \pm 3,5 \mu\text{M}$). Os dados estão ilustrados na figura 10.

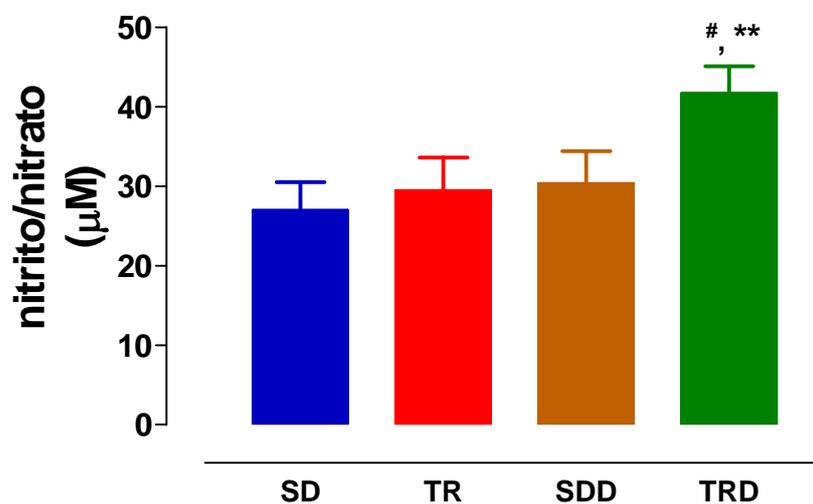


Figura 10. Concentração plasmática de nitrito/nitrato de ratos dos grupos sedentário (SD); treinado (TR); sedentário dieta (SDD), e treinado dieta (TRD). Os dados estão apresentados como média \pm EPM, para $n=6$ animais. # diferente de SDD, ** diferente de TR, para $p<0,05$ (ANOVA *two-way*).

A atividade da enzima anti-oxidante SOD no soro não foi modificada pelo consumo da dieta hipercalórica. Por outro lado, o treinamento físico por 4 semanas foi suficiente para aumentar significativamente (em torno de 17%) a atividade desta enzima nos animais do grupo TR (SD: $5,09 \pm 0,21$; TR: $5,93 \pm 0,33$; SDD: $5,55 \pm 0,22$ e TRD: $5,20 \pm 0,30$ μM). Os dados estão ilustrados na figura 11.

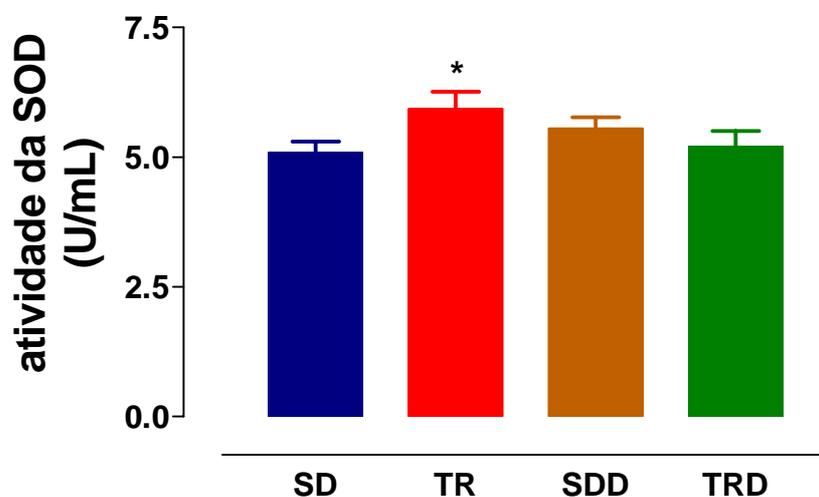


Figura 11. Atividade da SOD no soro de ratos dos grupos sedentário (SD); treinado (TR); sedentário dieta (SDD), e treinado dieta (TRD). Os dados estão apresentados como média \pm EPM, para $n=5$ animais. * diferente de SD, para $p<0,05$ (ANOVA *two-way*).

A expressão das isoformas endotelial e neuronal da oxido nítrico sintase (eNOS e nNOS) determinadas em artéria aorta pela técnica de Western blot não foi modificada pelo consumo da dieta hipercalórica ou pelo exercício físico, como ilustrado na figura 12. Resultados confiáveis da quantificação da expressão destas proteínas em artéria mesentérica não foram obtidos por problemas metodológicos.

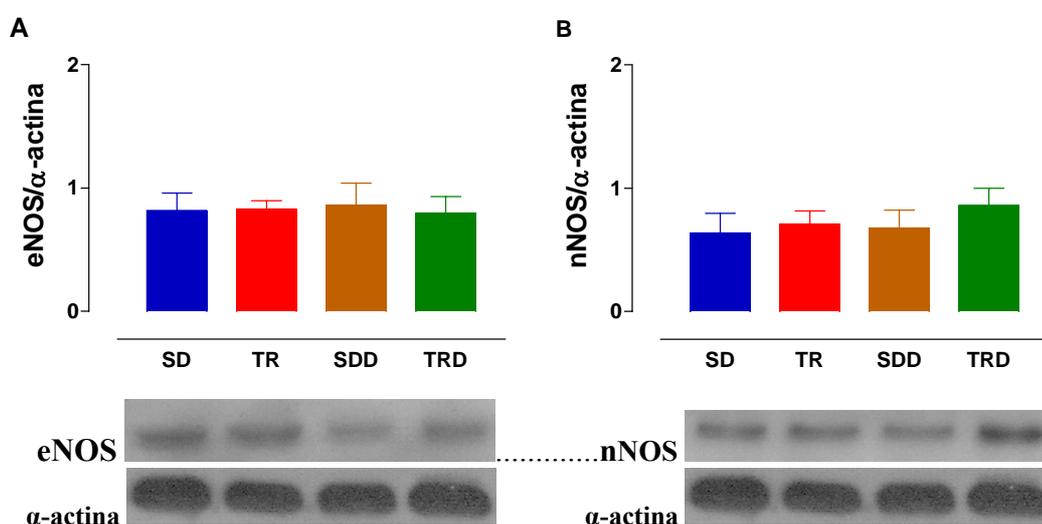


Figura 12. Expressão da eNOS (A) e da nNOS (B) em artéria aorta de ratos dos grupos sedentário (SD); treinado (TR); sedentário dieta (SDD), e treinado dieta (TRD). Os dados estão apresentados como média \pm EPM, para $n=7-8$ animais em cada grupo. Pesos moleculares: eNOS: 145 KDa; nNOS: 155 KDa; α -actina: 40 KDa.

A expressão da enzima antioxidante SOD foi quantificada nas duas artérias estudadas. Os resultados mostram que o consumo da dieta hipercalórica provoca diminuição da expressão desta enzima em artéria mesentérica (Figura 13B), mas não em aorta (figura 13A). O exercício físico realizado durante 4 semanas foi eficiente em aumentar significativamente a expressão da SOD em artéria aorta em ambos os grupos treinados (figura 13A). Já em artéria mesentérica, pode-se observar uma tendência ao aumento da expressão da SOD nas artérias obtidas de animais treinados (figura 13B).

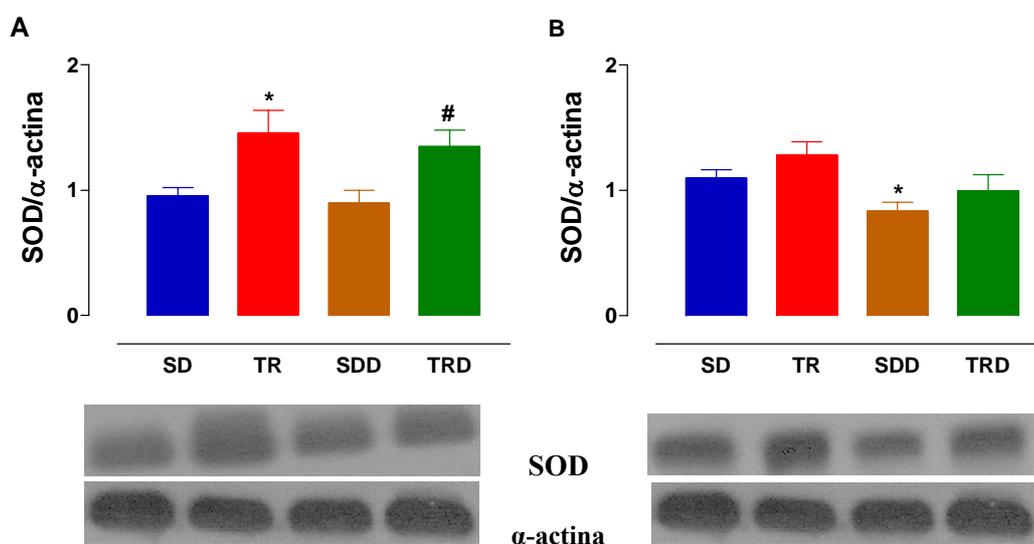


Figura 13. Expressão da SOD em artéria aorta (A) e mesentérica (B) de ratos dos grupos sedentário (SD); treinado (TR); sedentário dieta (SDD), e treinado dieta (TRD). Os dados estão apresentados como média \pm EPM, para $n=6-8$ animais em cada grupo. * diferente de SD; # diferente de SDD, para $p<0,05$ (ANOVA *two-way*). Pesos moleculares: Cu/Zn SOD: 19 KDa; α -actina: 40 KDa.

5.2. PROTOCOLLO PREVENTIVO

Peso corporal, gordura epididimal, pressão arterial e parâmetros bioquímicos

O peso inicial dos animais não foi diferente entre os grupos. Os animais tratados com dieta hipercalórica apresentaram um maior ganho de peso quando comparados aos do grupo controle (13%). O exercício físico por 12 semanas promoveu uma redução de 16% no ganho de peso tanto dos animais que consumiram ração padrão quanto nos animais que consumiram dieta hipercalórica. Quanto ao depósito de gordura epididimal, a dieta hipercalórica induziu aumento significativo (cerca de 85%), enquanto que o treinamento físico reduziu em cerca de 50% essa gordura, em ambos os grupos (tabela 6, figura 14).

A pressão arterial sistólica não foi modificada pela dieta hipercalórica ou pelo treinamento físico por 12 semanas (SD: 95 ± 3 ; TR: 92 ± 2 ; SDD: 100 ± 4 ; e TRD: 97 ± 3 mmHg, para $n= 7-8$).

Com relação ao perfil lipídico, a dieta hipercalórica elevou significativamente a concentração de triglicerídeos e de colesterol total, sem modificar a concentração de HDL colesterol. O treinamento físico *per se* foi eficaz em reduzir a concentração de triglicerídeos em 39%, e aumentar a concentração de HDL-colesterol em 28% no grupo TR. Já a associação do exercício físico durante 12 semanas e da dieta hipercalórica por 8 semanas produziu uma redução de 143% na concentração de triglicerídeos, redução de 54% do colesterol total e um aumento de 29% na concentração de HDL colesterol no grupo TRD.

A avaliação do índice aterogênico mostra uma elevação significativa do risco para aterosclerose para o grupo que consumiu a dieta hipercalórica, e o exercício

físico provocou uma pequena redução, embora não significativa, deste risco para o grupo TRD. Os dados estão sumarizados na tabela 6.

Tabela 6. Peso corporal, peso da gordura epididimal, perfil lipídico sérico e índice aterogênico de ratos dos grupos sedentário (SD); treinado (TR); sedentário dieta (SDD) e treinado dieta (TRD).

	SD	SDD	TR	TRD
Peso inicial (g)	306 ± 7	306 ± 8	297 ± 6	301 ± 8
Peso final (g)	478 ± 9	538 ± 11*	401 ± 8*	452 ± 14 ^{#**}
Gordura epididimal (g)	11,5 ± 0,8	20,4 ± 1,8*	6,1 ± 0,8*	10,1 ± 1,2 ^{#**}
Triglicerídidos (mg/dl)	90,6 ± 11,0	216,0 ± 25,1*	55,4 ± 7,7*	88,7 ± 8,8 ^{#**}
Colesterol total (mg/dl)	30,3 ± 3,5	53,0 ± 4,4*	32,4 ± 2,3	34,5 ± 1,7 [#]
HDL- colesterol (mg/dl)	14,3 ± 1,4	14,1 ± 0,8	18,3 ± 0,9*	18,3 ± 1,1 [#]
Índice aterogênico	1,12 ± 0,19	2,76 ± 0,38*	0,77 ± 0,27	0,88 ± 0,15

Índice aterogênico= (colest total – HDL)/ HDL.

*diferente de SD; # diferente de SDD; ** diferente de TR; para $p < 0,05$ (ANOVA *two-way*). Dados expressos como média ± EPM, $n = 8$ em cada grupo.

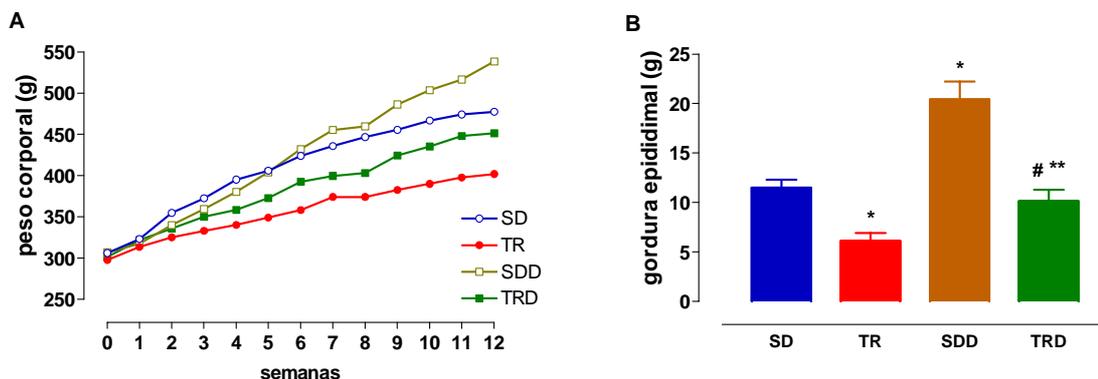


Figura 14. Evolução do peso corporal durante as 12 semanas do protocolo experimental (A) e peso da gordura epididimal ao final do estudo (B), para animais dos grupos sedentário (SD), treinado (TR), sedentário dieta (SDD) e treinado dieta (TRD). *diferente de SD; # diferente de SDD; ** diferente de TR; para $p < 0,05$ (ANOVA *two-way*). Dados estão expressos como média \pm EPM, $n = 8$ animais em cada grupo.

O consumo da dieta hipercalórica produziu um aumento de 25% na concentração de glicose sanguínea nos animais do grupo SDD, o exercício físico por 12 semanas não provocou qualquer modificação neste parâmetro bioquímico (SD: $125,8 \pm 6,0$; TR: $140,0 \pm 8,3$; SDD: $156,3 \pm 8,1$ e TRD: $152,9 \pm 9,0$ mg/ dl). Um aumento expressivo, em torno de 194%, foi verificado na insulinemia de ratos que consumiram a dieta hipercalórica, sendo que o treinamento físico foi efetivo em promover redução significativa dos níveis de insulina, tanto nos animais que consumiram ração padrão (38%), quanto nos animais que consumiram a dieta hipercalórica, cerca de 52% (SD: $0,87 \pm 0,10$; TR: $0,54 \pm 0,10$; SDD: $2,57 \pm 0,32$ e TRD: $1,24 \pm 0,32$ ng/ml). O cálculo do índice HOMA, para avaliação de resistência à insulina, mostra elevação significativa deste índice no grupo SDD comparado aos animais do grupo SD. O treinamento físico reduziu significativamente esse índice no grupo TRD (SD: $0,61 \pm 0,11$; TR: $0,45 \pm 0,09$; SDD: $2,42 \pm 0,24$ e TRD: $1,08 \pm 0,32$). Esses dados estão ilustrados na figura 15.

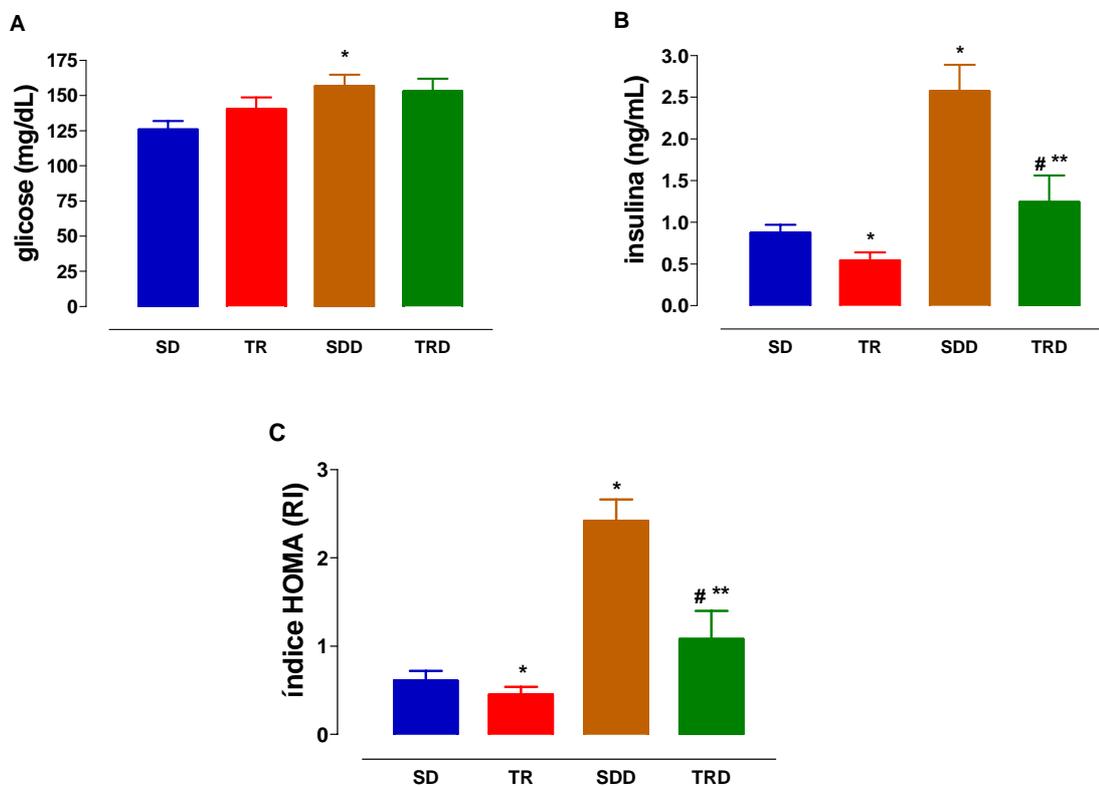


Figura 15. Concentrações séricas de glicose (A), insulina (B) e o índice HOMA (C) de ratos dos grupos sedentário (SD); treinado (TR); sedentário dieta (SDD) e treinado dieta (TRD). Índice HOMA de resistência à insulina, $HOMA\ RI = [insulina\ jejum\ (mU/l) \times glicemia\ jejum\ (mmol/l)] / 22,5$. Dados estão expressos como média \pm EPM, $n = 8$ animais em cada grupo. * diferente de SD, # diferente de SDD, para $p < 0,05$ (ANOVA *two-way*).

Efeitos da dieta hipercalórica e do treinamento físico sobre a resposta contrátil e relaxante a concentração de fenilefrina (PE) e acetilcolina (ACh) em anéis de artéria aorta e mesentérica com endotélio

Em anéis de artéria aorta, não foi observada diferença na força de contração produzida pela concentração de 1 μM de fenilefrina (PE) entre os grupos estudados (SD: $3,4 \pm 0,2$; TR: $4,1 \pm 0,5$; SDD: $3,8 \pm 0,5$ e TRD: $4,0 \pm 0,7$ mN). Por outro lado, em anéis de artéria mesentérica, a tensão gerada pela concentração de 1 μM de PE foi significativamente maior no grupo TRD quando comparado ao seu controle sedentário (SD: $4,4 \pm 0,4$; TR: $5,5 \pm 0,4$; SDD: $4,9 \pm 0,4$ e TRD: $6,6 \pm 0,4$). As respostas estão ilustradas na figura 16, painéis A e B, respectivamente.

Quanto ao relaxamento induzido pela concentração de 1 μM de acetilcolina em anéis de aorta, uma pequena redução foi observada nos anéis de animais que consumiram dieta hipercalórica (SD: $55,7 \pm 4,5$ e SDD: $46,6 \pm 5,2\%$), mas essa redução não atingiu significância estatística. O treinamento físico aumentou o relaxamento induzido pela acetilcolina em anéis de aorta (TR: $72,7 \pm 2,9$ e TRD: $71,4 \pm 4,2\%$). Em anéis de artéria mesentérica, a resposta relaxante a acetilcolina foi significativamente reduzida no grupo que consumiu dieta hipercalórica (SD: $72,3 \pm 3,8$ e SDD: $55,2 \pm 4,0\%$). Semelhante aos dados obtidos em aorta, o treinamento físico aumentou a resposta relaxante a acetilcolina em anéis de artéria mesentérica (TR: $86,1 \pm 2,0$ e TRD: $85,7 \pm 2,8\%$). Os resultados estão ilustrados na figura 16, painéis C e D.

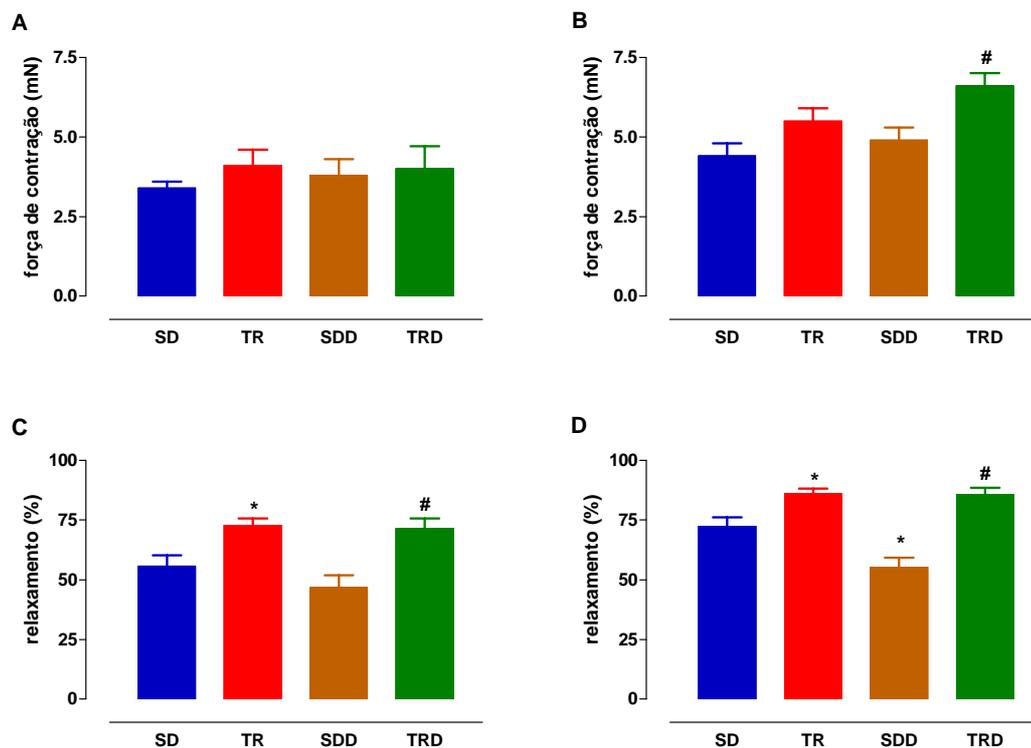


Figura 16. Efeito da dieta hipercalórica e do exercício físico sobre a resposta contrátil a concentração de $1\mu\text{M}$ de fenilefrina em artéria aorta (A) e mesentérica (B). Os painéis inferiores referem-se ao relaxamento a dose de $1\mu\text{M}$ de acetilcolina em anéis de aorta (C) e mesentérica (D) pré-contraídos com $1\mu\text{M}$ de fenilefrina. Anéis de artérias provenientes de ratos dos grupos: sedentário (SD); treinado (TR); sedentário dieta (SDD), e treinado dieta (TRD). Dados apresentados como média \pm EPM para $n=6$ animais. * diferente de SD; # diferente de SDD, para $p<0,05$ (ANOVA *two-way*).

Efeitos da dieta hipercalórica e do treinamento físico sobre a resposta relaxante a acetilcolina (ACh) em anéis de artéria aorta e mesentérica com endotélio

AORTA

O consumo da dieta hipercalórica durante 8 semanas não provocou qualquer alteração tanto na potência quanto na resposta máxima induzida pela acetilcolina em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina. Por outro lado, o exercício físico realizado durante 12 semanas provocou aumento significativo na resposta máxima a este agonista em cerca de 28% no grupo TR e de 16% para o grupo TRD. Nenhuma modificação na potência a ACh foi provocada pelo exercício físico (tabela 7 e figura 17A).

A pré-contracção com KCl 80 mM em presença de indometacina reduziu tanto a potência quanto a resposta máxima a acetilcolina, de maneira similar, em todos os grupos (tabela 7 e figura 14C). A adição de L-NAME aboliu a resposta relaxante a acetilcolina em anéis pré-contraídos com fenilefrina (tabela 7 e figura 17E).

MESENTÉRICA

Redução significativa do relaxamento a acetilcolina, em torno de 10%, foi observada em anéis de mesentérica provenientes de animais que consumiram a dieta hipercalórica. Esta redução foi totalmente revertida pelo treinamento físico durante 12 semanas nos animais do grupo TRD. Além disso, o exercício físico per se foi eficaz em aumentar o relaxamento dependente do endotélio nos animais do grupo TR (tabela 7 e figura 17B).

A pré-contracção dos anéis com KCl 80mM na presença de indometacina reduziu a resposta máxima e a potência a ACh em todos os grupos estudados (tabela 7 e figura 17D). A adição de L-NAME provocou redução da resposta máxima, sendo que todos os grupos estudados apresentaram relaxamento máximo em torno 20% (tabela 7 e figura 17F).

Tabela 7. Valores de potência (pEC₅₀) e de resposta máxima (E_{max}) a acetilcolina em anéis de artéria aorta e mesentérica com endotélio de animais sedentário (SD); treinado (TR); sedentário dieta (SDD) e treinado dieta (TRD).

	SD	TR	SDD	TRD
AORTA				
PE				
pEC ₅₀	6,40 ± 0,02	6,53 ± 0,01	6,51 ± 0,03	6,44 ± 0,01
E _{max}	70,7 ± 1,7	90,2 ± 3,2*	72,7 ± 3,2	84,6 ± 3,4*
KCI+INDO				
pEC ₅₀	6,00 ± 0,04	5,91 ± 0,06	5,90 ± 0,07	6,00 ± 0,03
E _{max}	24,7 ± 2,6	33,2 ± 4,2	30,7 ± 2,7	34,7 ± 4,1
PE+LNAME				
E _{max}	2,93 ± 1,8	3,8 ± 1,9	6,1 ± 0,7	6,2 ± 1,4
MESENTÉRICA				
PE				
pEC ₅₀	6,93 ± 0,02	6,94 ± 0,03	6,70 ± 0,03	6,71 ± 0,03
E _{max}	89,1 ± 1,9	98,3 ± 1,3*	77,4 ± 1,9*	90,4 ± 2,1 [#]
KCI+INDO				
pEC ₅₀	6,17 ± 0,04	6,10 ± 0,03	6,22 ± 0,03	6,35 ± 0,06
E _{max}	56,6 ± 1,4	53,0 ± 2,1	62,0 ± 5,8	54,5 ± 3,2
PE+L-NAME				
E _{max}	20,4 ± 1,2	21,8 ± 0,9	19,1 ± 1,8	21,6 ± 2,7

Valores são expressos como média ± EPM para $n = 6$ animais. * diferente de SD; [#] diferente de SDD; ** diferente de TR, para $p < 0,05$ (ANOVA *two-way*).

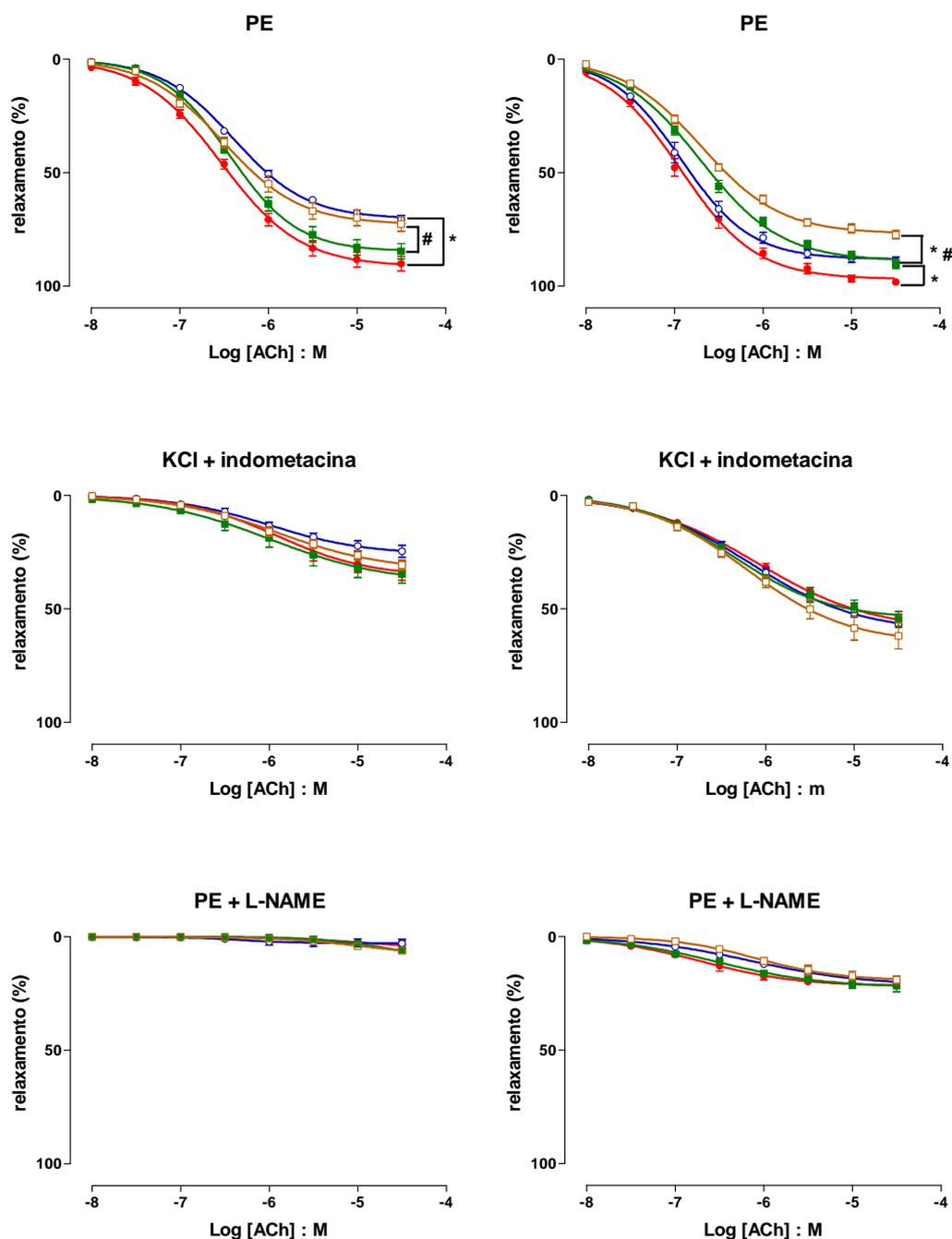


Figura 17. Curvas concentração-efeito a acetilcolina (ACh) em anéis de artéria aorta (A, C, E) e mesentérica (B, D, F) com endotélio de ratos sedentário (SD); treinado (TR); sedentário dieta (SDD) e treinado dieta (TRD). Os anéis pré-contraídos com fenilefrina (PE; 1 μ M) são mostrados nos painéis A e B, pré-contraídos com KCl 80mM na presença de indometacina (5 μ M) painéis C e D e pré-contraídos com fenilefrina (PE) na presença de L-NAME (100 μ M) nos painéis E e F. Dados apresentados como média \pm EPM para $n=6$ animais. Símbolos apontam diferença na resposta máxima em % de relaxamento. * diferente de SD; # diferente de SDD, para $p<0,05$ (ANOVA *two-way*).

Efeitos da dieta hipercalórica e do treinamento físico sobre a resposta relaxante ao niroprussiato de sódio (SNP) em anéis de artéria aorta e mesentérica com endotélio intacto (E+) e endotélio removido (E-)

AORTA COM ENDOTÉLIO

A resposta máxima ao doador de óxido nítrico não foi alterada pelo consumo da dieta hipercalórica ou pelo treinamento físico por 12 semanas, porém os anéis de aorta provenientes do grupo TR apresentaram um aumento de aproximadamente 2 vezes na sensibilidade ao doador de NO utilizado (tabela 8 e figura 18A).

A pré-contração com KCl 80 mM em presença de indometacina provocou redução em torno de 20% da resposta máxima em todos os grupos estudados. Quanto a potência ao SNP, todos os grupos apresentaram redução neste parâmetro, porém o grupo SDD apresentou valor de potência maior comparado aos grupos SD e TRD (cerca de 2 vezes). Os dados estão sumarizados na tabela 8 e ilustrados na figura 18C. A adição do inibidor da guanilato ciclase solúvel, ODQ, aboliu a resposta relaxante em todos os grupos estudados (tabela 8 e figura 18E).

MESENTÉRICA COM ENDOTÉLIO

Não foram observadas modificações provocadas pelo consumo da dieta hipercalórica ou pelo treinamento físico, na resposta máxima e na potência ao doador de óxido nítrico em anéis de mesentérica pré-contráidos com fenilefrina, em todos os grupos estudados (tabela 8 e figura 18B).

A pré-contração dos anéis com KCl 80 mM na presença de indometacina reduziu a resposta ao SNP. A potência foi reduzida de forma similar entre os grupos estudados (tabela 8 e figura 18D). A adição de ODQ ao banho, praticamente aboliu as respostas relaxantes dos anéis de mesentérica, porém os anéis de artéria dos animais treinados mostraram-se mais resistentes a inibição provocada pelo ODQ (tabela 8 e figura 18F).

AORTA SEM ENDOTÉLIO

A remoção do endotélio não provocou diferença na resposta máxima ou mesmo na potência ao SNP entre os grupos estudados. Os dados estão sumarizados na tabela 9 e ilustrados na figura 19A.

MESENTÉRICA SEM ENDOTÉLIO

Os resultados obtidos em anéis de mesentérica com endotélio removido não apontam diferença tanto na resposta máxima quanto na potência ao SNP entre os grupos estudados. Os dados estão sumarizados na tabela 9 e ilustrados na figura 19B.

Tabela 8. Valores de potência (pEC_{50}) e de resposta máxima (E_{max}) ao nitroprussiato de sódio em anéis de artéria aorta e mesentérica com endotélio (E+) dos grupos sedentário (SD); treinado (TR); sedentário dieta (SDD) e treinado dieta (TRD).

	SD	TR	SDD	TRD
AORTA (E+)				
PE				
pEC_{50}	8,05 ± 0,03	8,31 ± 0,03*	8,16 ± 0,02	8,25 ± 0,02
E_{max}	108,3 ± 2,3	105,1 ± 1,3	108,5 ± 3,1	105,3 ± 1,2
KCl+INDO				
pEC_{50}	7,22 ± 0,04	7,29 ± 0,09	7,60 ± 0,03*	7,30 ± 0,08 [#]
E_{max}	83,8 ± 2,4	85,4 ± 2,6	83,0 ± 1,4	83,4 ± 3,8
PE + ODQ				
E_{max}	7,6 ± 1,4	8,7 ± 2,9	1,9 ± 1,0*	7,2 ± 2,7 [#]
MESENTÉRICA (E+)				
PE				
pEC_{50}	8,15 ± 0,03	8,13 ± 0,02	8,18 ± 0,02	8,27 ± 0,02
E_{max}	105,9 ± 1,8	104,5 ± 1,6	107,8 ± 2,1	102,1 ± 1,2
KCl+INDO				
pEC_{50}	7,80 ± 0,03	7,99 ± 0,01	7,89 ± 0,09	8,14 ± 0,04
E_{max}	95,7 ± 2,0	98,0 ± 1,8	93,9 ± 2,0	95,9 ± 2,2
PE + ODQ				
E_{max}	11,8 ± 1,0	19,3 ± 1,0*	13,7 ± 1,0	20,2 ± 0,9 [#]

Valores expressos como média ± EPM para $n = 6$. * diferente de SD; [#] diferente de SDD; ** diferente de TR, para $p < 0,05$ (ANOVA *two-way*).

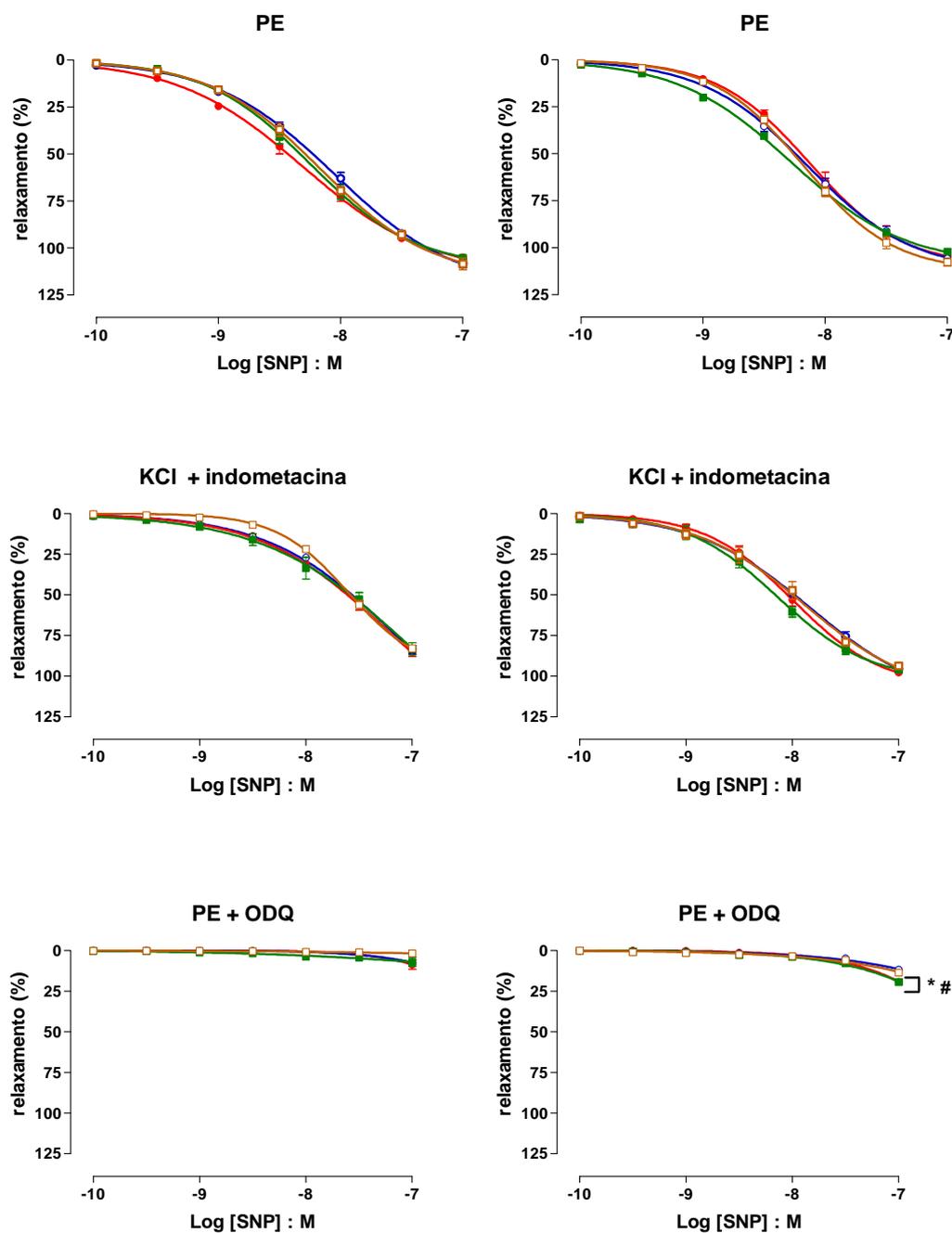


Figura 18. Curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio (SNP) em anéis de artéria aorta (A, C, E) e mesentérica (B, D, F) com endotélio de ratos sedentário (SD); treinado (TR); sedentário dieta (SDD) e treinado dieta (TRD). Os anéis pré-contraídos com fenilefrina ($1 \mu\text{M}$) são mostrados nos painéis A e B, pré-contraídos com KCl 80 mM na presença de indometacina ($5 \mu\text{M}$) nos painéis C e D, e pré-contraídos com fenilefrina na presença de ODQ ($1 \mu\text{M}$) nos painéis E e F. Dados apresentados como média \pm EPM para $n=6$ animais. Símbolos apontam diferença na resposta máxima em % de relaxamento. * diferente de SD; # diferente de SDD, para $p < 0,05$ (ANOVA *two-way*).

Tabela 9. Valores de potência (pEC_{50}) e de resposta máxima (E_{max}) ao nitroprussiato de sódio em anéis de artéria aorta e mesentérica sem endotélio (E-) dos grupos sedentário (SD); treinado (TR); sedentário dieta (SDD) e treinado dieta (TRD).

	SD	TR	SDD	TRD
AORTA (E-)				
pEC_{50}	$8,44 \pm 0,07$	$8,42 \pm 0,06$	$8,34 \pm 0,08$	$8,50 \pm 0,08$
E_{max}	$112,7 \pm 3,7$	$109,2 \pm 2,0$	$117,4 \pm 4,0$	$113,1 \pm 6,1$
MESENTÉRICA (E-)				
pEC_{50}	$8,65 \pm 0,02$	$8,62 \pm 0,03$	$8,76 \pm 0,02$	$8,68 \pm 0,01$
E_{max}	$107,8 \pm 2,1$	$113,2 \pm 3,8$	$114,6 \pm 1,1$	$109,9 \pm 2,9$

Valores expressos como média \pm EPM para $n = 6$.

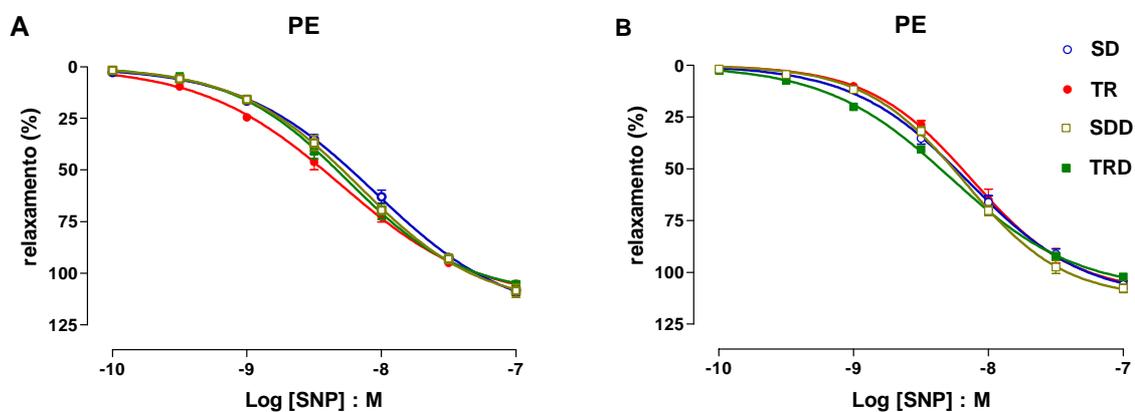


Figura 19. Curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio (SNP) em anéis de artéria aorta (A) e mesentérica (B) sem endotélio de ratos sedentário (SD); treinado (TR); sedentário dieta (SDD) e treinado dieta (TRD). Os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina ($1 \mu M$). Dados apresentados como média \pm S.E.M para $n=6$ animais.

Efeitos da dieta hipercalórica e do treinamento físico sobre a resposta contrátil a fenilefrina (PE) em anéis de artéria aorta e de mesentérica, com endotélio intacto

AORTA

O consumo da dieta hipercalórica não provocou qualquer alteração na resposta máxima e na potência ao agonista α -adrenérgico em anéis de aorta com endotélio intacto. O exercício físico por 12 semanas promoveu uma redução de 2 vezes na potência à fenilefrina somente no grupo TR (tabela 10 figura 20A).

MESENTÉRICA

Nenhuma diferença na resposta máxima ou na potência à fenilefrina foi provocada pelo consumo da dieta hipercalórica e pelo exercício físico em anéis de artéria mesentérica (tabela 10 e figura 20B).

Tabela 10. Valores de potência (EC_{50}) e de resposta máxima (E_{max}) a fenilefrina em anéis de artéria aorta e mesentérica com endotélio intacto (E+) e mecanicamente removido (E-) para os grupos sedentário (SD); treinado (TR); sedentário dieta (SDD) e treinado dieta (TRD).

	SD	TR	SDD	TRD
AORTA E+				
EC_{50}	$7,19 \pm 0,06$	$6,88 \pm 0,03^*$	$7,00 \pm 0,05$	$7,15 \pm 0,05$
E_{max} (mN)	$10,8 \pm 1,2$	$7,5 \pm 1,1$	$11,1 \pm 0,8$	$10,6 \pm 0,8$
MESENTÉRICA E+				
EC_{50}	$7,14 \pm 0,03$	$7,08 \pm 0,08$	$7,06 \pm 0,06$	$7,13 \pm 0,05$
E_{max} (mN)	$9,6 \pm 1,4$	$9,1 \pm 0,6$	$10,3 \pm 0,5$	$8,3 \pm 1,3$

Valores expressos como média \pm EPM para $n = 6$. * diferente de SD; para $p < 0,05$ (ANOVA *two-way*).

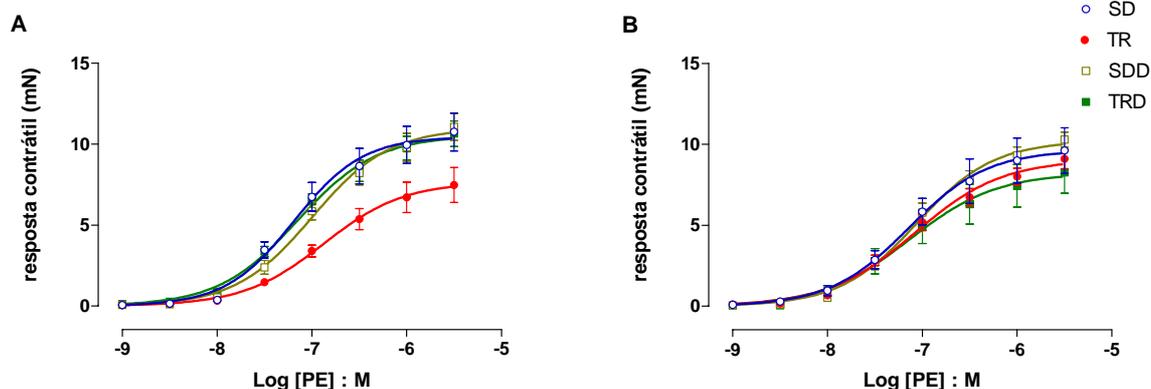


Figura 20 Curvas concentração-efeito a fenilefrina (PE; 1 nM – 3 μ M) na presença de propranolol (100 nM) em anéis de artéria aorta com endotélio (A) e em anéis de mesentérica com endotélio (B), para os grupos sedentário (SD); treinado (TR); sedentário dieta (SDD) e treinado dieta (TRD)

A concentração plasmática de nitrito/ nitrato ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) mostra que tanto o consumo da dieta hipercalórica quanto o treinamento físico não provocaram qualquer alteração na concentração destes metabólitos, (SD: $26,9 \pm 4,1$; TR: $28,4 \pm 6,0$; SDD: $27,4 \pm 2,6$ e TRD: $30,0 \pm 2,4 \mu\text{M}$). Os dados estão ilustrados na figura 21.

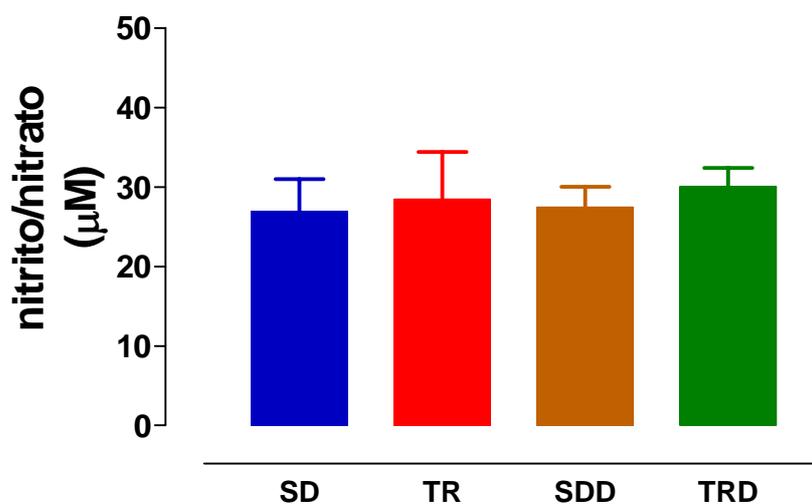


Figura 21. Concentração plasmática de nitrito/nitrato de ratos dos grupos sedentário (SD); treinado (TR); sedentário dieta (SDD), e treinado dieta (TRD). Os dados estão apresentados como média \pm EPM, para $n=6$ animais.

A atividade da enzima anti-oxidante SOD no soro não foi modificada pelo consumo da dieta hipercalórica. Por outro lado, o treinamento físico por 12 semanas foi eficaz em aumentar de maneira significativa, em torno de 14%, a atividade desta enzima, (SD: $5,22 \pm 0,16$; TR: $5,93 \pm 0,18$; SDD: $5,08 \pm 0,41$ e TRD: $4,86 \pm 0,68$ μM). Os dados estão ilustrados na figura 22.

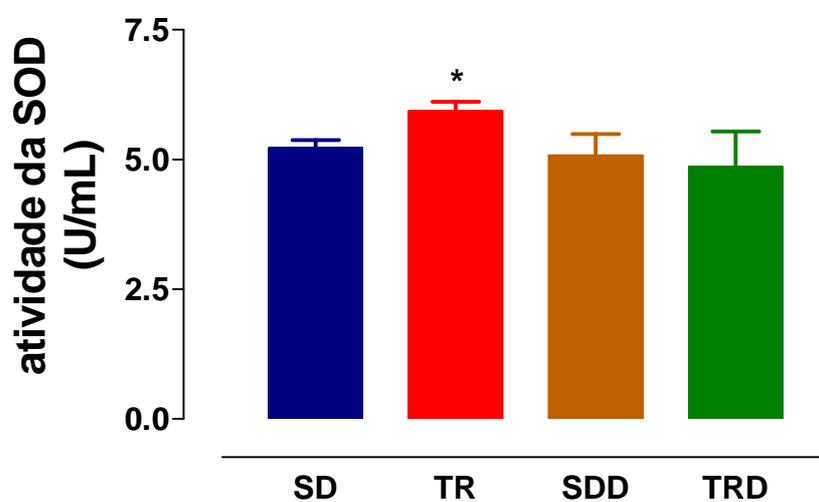


Figura 22. Atividade da SOD no soro de ratos dos grupos sedentário (SD); treinado (TR); sedentário dieta (SDD), e treinado dieta (TRD). Os dados estão apresentados como média \pm EPM, para $n=5$ animais. * diferente de SD, para $p<0,05$ (ANOVA *two-way*).

A análise dos resultados obtidos pela técnica de Western blot mostra que a expressão das isoformas endotelial e neuronal da oxido nítrico sintase (eNOS e nNOS) em artéria aorta não apresentou diferença significativa decorrente do consumo da dieta hipercalórica ou do exercício físico, como ilustrado na figura 23. Resultados confiáveis da quantificação da expressão destas proteínas em artéria mesentérica não foram obtidos por problemas metodológicos.

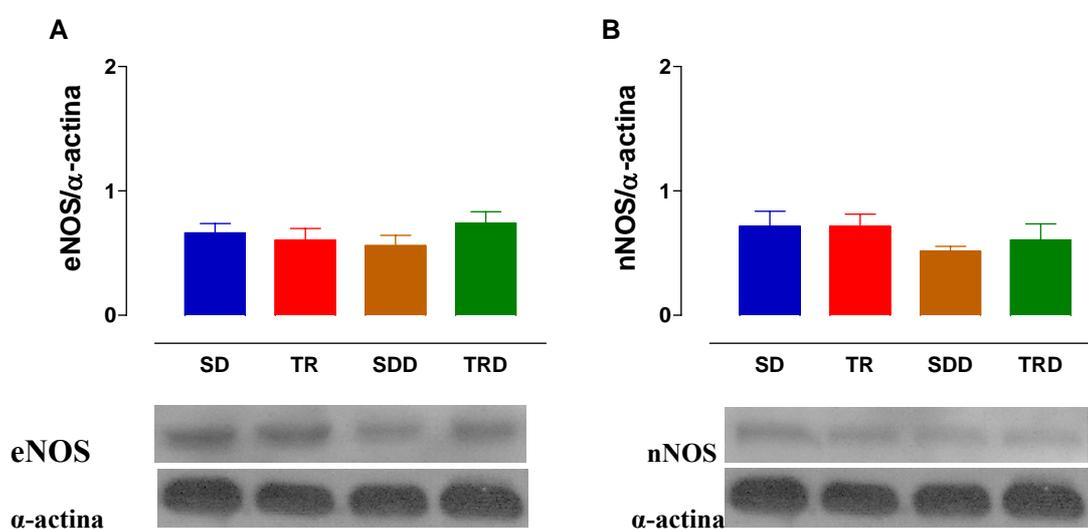


Figura 23. Expressão da eNOS (A) e da nNOS (B) em artéria aorta de ratos dos grupos sedentário (SD); treinado (TR); sedentário dieta (SDD), e treinado dieta (TRD). Os dados estão apresentados como média \pm EPM, para $n=7-8$ animais em cada grupo. Pesos moleculares: eNOS: 145 KDa; nNOS: 155 KDa; α -actina: 40 KDa.

Os resultados acerca da expressão da enzima antioxidante SOD foram obtidos nas duas artérias estudadas. Pode-se observar que assim como no protocolo terapêutico, o consumo da dieta hipercalórica provoca diminuição da expressão da SOD em artéria mesentérica (figura 24B), mas não em aorta (figura 24A). O exercício físico realizado por 12 semanas foi eficiente em aumentar significativamente a expressão da SOD em artérias aorta e mesentérica em ambos os grupos treinados (figura 24A e B).

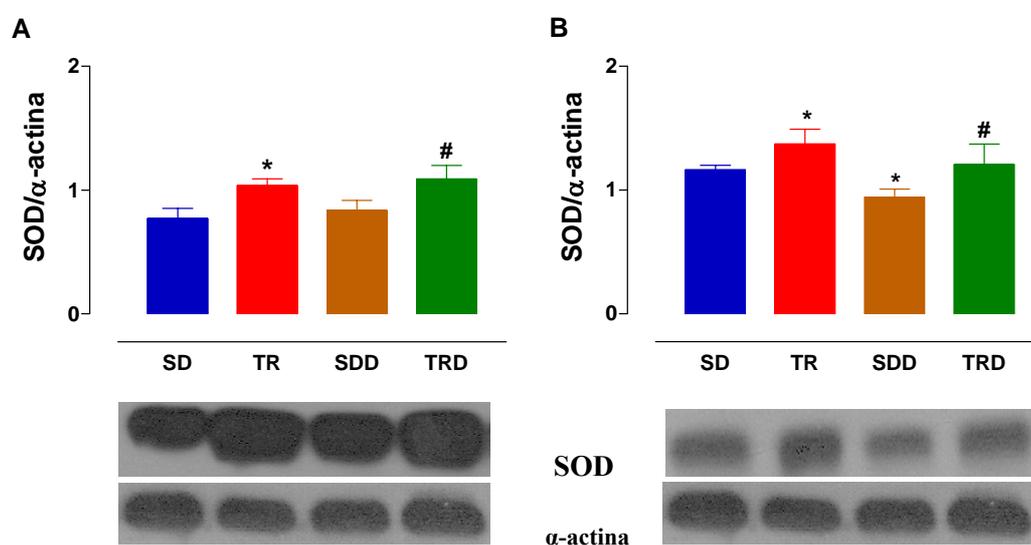


Figura 24. Expressão da SOD em artéria aorta (A) e mesentérica (B) de ratos dos grupos sedentário (SD); treinado (TR); sedentário dieta (SDD), e treinado dieta (TRD). Os dados estão apresentados como média \pm EPM, para $n=7-8$ animais em cada grupo. * diferente de SD; # diferente de SDD, para $p<0,05$ (ANOVA *two-way*). Pesos moleculares: Cu/Zn SOD: 19 KDa; α -actina: 40 KDa.

6. SUMÁRIO DOS RESULTADOS

PROTOCOLO TERAPÊUTICO

O consumo da dieta hipercalórica por 8 semanas provocou:

- Aumento de 10% na glicemia;
- Aumento de 100% na insulinemia;
- Aumento de 35% nos triglicerídeos
- Diminuição do relaxamento dependente do endotélio em artéria mesentérica, mas não em aorta;
- Diminuição da expressão da superóxido dismutase em artéria mesentérica.

O exercício físico por 4 semanas foi eficiente em:

- Reduzir a concentração de triglicerídeos em 23% no grupo TR e em 54% no grupo TRD;
- Aumentar em 26% a fração HDL colesterol no grupo TR;
- Aumentar o relaxamento dependente do endotélio em artéria aorta e mesentérica nos grupos TR e TRD;
- Aumentar a atividade da superóxido dismutase em 17% no grupo TR;
- Aumentar significativamente a expressão da superóxido dismutase em artéria aorta.

PROTOCOLO PREVENTIVO

O consumo da dieta hipercalórica por 8 semanas provocou:

- Aumento de 25% na glicemia;
- Aumento de 194% na insulinemia;
- Aumento de 138% nos triglicerídeos
- Aumento de 75% no colesterol total
- Diminuição do relaxamento dependente do endotélio em artéria mesentérica, mas não em aorta;
- Diminuição da expressão da superóxido dismutase em artéria mesentérica.

O exercício físico por 12 semanas, iniciado previamente ao consumo da dieta hipercalórica, foi eficiente em:

- Diminuir a insulinemia em 38% no grupo TR e em 52% no grupo TRD;
- Diminuir os triglicerídeos em 39% no grupo TR e em 143% no grupo TRD;
- Diminuição de 54% no colesterol total nos animais do grupo TRD;
- Aumentar em 29% na fração HDL colesterol nos grupos TR e TRD;
- Aumentar o relaxamento dependente do endotélio em artéria aorta e mesentérica nos grupos TR e TRD;
- Aumentar a atividade da superóxido dismutase em 14% no grupo TR;
- Aumentar significativamente a expressão da superóxido dismutase em artéria aorta e mesentérica.

7. DISCUSSÃO

O consumo de dieta hipercalórica utilizada neste estudo promoveu, em ambos os protocolos estudados terapêutico e preventivo, maior ganho de peso corporal e acúmulo de gordura epididimal, aumento significativo das concentrações de triglicerídeos, glicose e insulina, além de reduzir a resposta relaxante a ACh em artéria mesentérica de ratos SDD.

O treinamento físico realizado durante 4 semanas ou durante 12 semanas promoveu a redução do peso corporal, do depósito de gordura epididimal e da concentração de triglicerídeos, de maneira tempo dependente. O treinamento físico também promoveu aumento do relaxamento induzido pela ACh das artérias aorta e mesentérica dos animais dos grupos TR e TRD. A concentração de HDL-colesterol foi aumentada somente no grupo TR após 4 semanas de exercício, porém quando os animais foram submetidos a 12 semanas de treinamento se observou um aumento do HDL-colesterol também no grupo TRD. A glicemia não foi alterada pelo exercício físico tanto em 4 quanto em 12 semanas de exercício. Entretanto, a concentração de insulina foi significativamente reduzida somente nos grupos treinados por 12 semanas, mostrando que alterações neste parâmetro são tempo dependentes.

Estudos mostram que o exercício físico, preferencialmente o aeróbio, é uma ferramenta eficaz que pode ser utilizada para o controle do peso corporal, e para a prevenção ou tratamento de doenças cardiovasculares e metabólicas em humanos (OBERBACH et al., 2006) e em animais de laboratório (ESTADELLA et al., 2004; CLAUDINO et al., 2004). Neste estudo, o protocolo terapêutico tinha a finalidade de avaliar a eficácia do exercício físico na redução de alterações antropométricas, metabólicas e vasculares dos animais que consumiram a dieta hipercalórica. Podemos notar uma redução significativa do peso corporal dos animais exercitados a partir da 5ª

semana do estudo, quando foi iniciado o treinamento físico, inclusive para os animais do grupo que consumiam a dieta hipercalórica. No protocolo preventivo, onde o treinamento físico foi iniciado previamente ao consumo da dieta hipercalórica, o ganho de peso dos animais treinados é mais lento durante todo o período experimental, inclusive para os animais alimentados com a dieta hipercalórica, demonstrando que o volume do treinamento físico utilizado em nosso estudo foi eficaz, ou seja, a intensidade (medida pelo consumo de utilização de oxigênio, $VO_2\text{max}$); a duração (4 ou 12 semanas), e a frequência (5 dias por semana, 60 minutos por dia) foram suficientes para reduzir ou prevenir o ganho de peso corporal.

As dietas hipercalóricas com altos índices de açúcares e gorduras são utilizadas para indução do modelo de obesidade em animais de laboratório e têm-se mostrado eficazes em induzir alterações metabólicas (NADERALI et al., 2004; BURNEIKO et al., 2006). A dieta utilizada neste estudo, também promoveu um maior ganho de peso, além de alterações metabólicas como aumento dos triglicerídeos, glicemia e da insulinemia.

A resistência à insulina é caracterizada pela redução da ação insulina na captação de glicose e de aminoácidos pelas células, além da ineficiência em suprimir a produção de glicose no fígado. No estágio inicial da resistência à insulina, as células β pancreáticas aumentam a produção de insulina como um mecanismo compensatório à ineficiência periférica do hormônio mantendo a condição normoglicêmica do organismo. Nos estágios mais avançados de resistência à insulina, ocorre a intolerância a glicose e o aparecimento de sintomas clínicos do diabetes tipo 2 (SALTIEL E KAHN, 2001). Ao nível celular, a insulina liga-se ao seu receptor de membrana (IR) levando a fosforilação do IRS-1 nos sítios Ser³⁰⁷, Ser⁶¹² e Ser⁶³² o que ativará sequencialmente as

proteínas IP 3-k e Akt, produzindo os efeitos da insulina na célula. Sabe-se que outras substâncias podem fosforilar o receptor de insulina, como o Fator de Necrose Tumoral α (TNF α) e os ácidos graxos livres (AGL) que se ligam ao RI fosforilando o sítio Ser³⁰⁷, tornando-o indisponível para a ligação com a insulina (GUAL et al., 2005). Além disso, hormônios secretados pelos adipócitos, como a leptina e a adiponectina, também estão envolvidos na regulação da sensibilidade celular a insulina. Estudos mostram que quadros de resistência à insulina são verificados em animais com deficiência ou resistência a leptina (SHIMOMURA et al., 1999) e em animais obesos com baixos níveis de adiponectina (YAMAUCHI et al., 2001). Assim, podemos especular que a grande elevação da concentração plasmática de insulina em nosso modelo de obesidade poderia ser devida aos níveis reduzidos de adiponectina ou aos níveis elevados de ácidos graxos livres.

Além de distúrbios no metabolismo glicídico, a ingestão de uma dieta rica em carboidratos provoca aumento da concentração dos triglicerídeos em decorrência de maior síntese hepática de lipoproteínas (VLDL-TG) e de um menor catabolismo de lipoproteínas ricas em colesterol (FRIED E RAO, 2003; McCARTY, 2004) e sabe-se que, a administração aguda de insulina promove redução dos níveis plasmáticos de triglicerídeos (LEWIS et al., 1993; MALMSTROM et al., 1997). Estados de resistência a insulina promovem altos níveis de triglicerídeos circulantes (McLAUGHLIN et al., 2000). Assim, em nosso modelo, seria plausível afirmar que os altos índices de trigliceridemia apresentados pelos animais que consumiram a dieta hipercalórica são gerados por problemas na sinalização hepática da insulina.

O exercício físico regular, principalmente o aeróbio, provoca algumas adaptações morfológicas, uma delas ocorre ao nível dos transportadores de glicose

principalmente nas das células musculares (GLUT-4), e a contração muscular *per se* aumenta o transporte de glicose para a célula independente da ação da insulina (PLOUG et al., 1984), sendo que um dos estímulos para a ocorrência deste fenômeno está relacionado a via contração/ hipóxia durante a contração muscular (HOLLOSZY, 2005). O treinamento físico está associado ao aumento da captação de glicose, mediado ou não pela ação da insulina, em aproximadamente 20-30%. Além do aumento da translocação dos GLUT-4 otimizando a sinalização da insulina, outra adaptação causada pelo exercício é a melhor perfusão decorrente do maior fluxo sanguíneo e da angiogênese somado ao aumento da atividade enzimática muscular (KIRWAN E DEL AGUILA, 2003).

Em nosso estudo, não foi verificada redução significativa da glicemia nos grupos treinados, semelhante ao resultado encontrado por Kim et al (2000). Por outro lado, redução significativa da insulinemia foi observada nos animais dos grupos TR e TRD submetidos ao treinamento por 12 semanas, estes resultados podem estar relacionados a maior sensibilidade à insulina e a redução de ácidos graxos livres (AGL) circulantes provocada pelo aumento da capacidade de oxidação de AGL pelo músculo ativo (SIGAL et al., 2004).

Com relação ao perfil lipídico, observa-se que o exercício físico promove, em geral, um aumento nos níveis de HDL-colesterol e uma redução na concentração plasmática de triglicerídeos. Em humanos, programas de exercício físico de intensidade moderada, com frequência de 3 vezes por semana promovem modificações nos níveis de triglicerídeos e de HDL-colesterol (DUSTINE et al., 2001). Em ratos da linhagem Wistar, foi verificada redução de 50% na concentração dos triglicerídeos e de 38% no colesterol total de animais submetidos à natação durante 8

semanas, e que consumiram ração padrão (BURNEIKO et al., 2006). Outro trabalho, utilizando a mesma linhagem de ratos e tipo de exercício, mostrou redução dos níveis de triglicérides em torno de 40%, e um aumento de 13% na concentração de HDL-colesterol (ESTADELLA et al., 2004). Os resultados obtidos em nosso estudo, que utilizou protocolos de exercício em esteira com diferentes durações, mostram que a redução dos níveis de triglicérides tanto em animais que consumiram ração padrão quanto nos que consumiram a dieta hipercalórica ocorre mesmo após um curto período de treinamento (4 semanas), e esta redução é tempo dependente, uma vez que os animais que exercitaram-se por 12 semanas apresentaram maior redução. O aumento na concentração de HDL-colesterol para o grupo TR foi observado após curto ou longo período de treinamento, porém os animais do grupo TRD, que consumiram a dieta hipercalórica, tiveram a concentração de HDL-colesterol aumentada somente após 12 semanas de exercício, mostrando a importância do treinamento físico no controle da concentração de HDL colesterol.

Com relação à reatividade vascular das artérias aorta e mesentérica, o consumo da dieta hipercalórica provocou em ambos os protocolos experimentais, uma redução do relaxamento dependente do endotélio induzido pelo agonista muscarínico acetilcolina em anéis de artéria mesentérica, mas não em anéis de aorta. Estudos prévios mostraram resultados similares, onde se observou redução da resposta relaxante a acetilcolina em artéria coronária e nenhuma modificação foi encontrada em artéria braquial de porcos submetidos à dieta hipercolesterolêmica (THOMPSON et al., 2004; WOODMAN et al., 2005). Estes resultados sugerem que os efeitos de dieta hipercalórica variam conforme o leito vascular estudado.

Diversos trabalhos mostram redução da resposta relaxante dependente do endotélio em artéria mesentérica de ratos Wistar que consumiram dieta com altos teores de açúcar e de gordura, onde a duração do protocolo experimental variou de 3 dias até 15 semanas (NADERALI et al., 2001; NADERALI E WILLIAMS, 2003; NADERALI et al., 2004). Assim, nosso modelo de obesidade mostrou-se efetivo em provocar alterações na resposta relaxante dependente de endotélio em artéria mesentérica. Diferentes mecanismos têm sido apontados como fator causal para explicar a redução do relaxamento vascular em resposta à ingestão de dieta hipercalórica. Entre eles, redução da produção do NO pelas células endoteliais, aumento da produção das espécies reativas de oxigênio e/ou das enzimas pró-oxidantes e a redução da expressão e/ou atividade das enzimas anti-oxidantes (RUSH et al., 2003, THOMPSON et al., 2004, ROBERTS et al., 2006). Nossos achados mostram uma associação entre a redução da resposta relaxante dependente do endotélio e redução da expressão da Cu/Zn SOD em artéria mesentérica de animais que consumiram a dieta hipercalórica.

O efeito do exercício físico sobre a reatividade vascular tem sido extensivamente estudado em animais de laboratório (WANG et al., 1993; SUN et al., 1994; YEN et al., 1995; CHEN et al., 1996; DELP E LAUGHLIN, 1997; McALLISTER E LAUGHLIN, 1997; CHEN et al., 1999; CHOATE et al. 2000; LAUGHLIN et al., 2002; GRAHAN E RUSH, 2004). Estes estudos mostram que a resposta relaxante dependente de endotélio é significativamente aumentada após um programa de treinamento físico, e uma correlação positiva entre o exercício físico e os efeitos benéficos à saúde tem sido relatada. Especificamente, o efeito do exercício físico em modelos de obesidade foi estudado sistematicamente em porcos. Woodman et

al (2003), mostraram que as respostas relaxantes a bradicinina e acetilcolina de artéria braquial de porcos submetidos a exercício físico e dieta eram significativamente melhoradas pelo treinamento físico. Confirmando estes achados, Thompson et al (2004) mostraram que o exercício físico promove aumento da resposta relaxante a bradicinina em artéria coronária de porcos após 16-20 semanas de exercício físico, porém este aumento foi observado, somente em artérias provenientes de animais que consumiram uma dieta hipercolesterolêmica durante o protocolo experimental. Os autores atribuem este resultado a maior expressão da enzima superóxido dismutase presente nas artérias, e à diminuição na liberação de um agente constritor derivado da cicloxigenase. Por outro lado, um estudo avaliando coronária de porcos submetidos à dieta hipercolesterolêmica e exercício físico não encontrou qualquer alteração na resposta relaxante a bradicinina (HENDERSON et al., 2004).

Embora a medida da produção de NO e/ou a expressão da eNOS sejam usados como marcadores para avaliar os efeitos do exercício na resposta vascular, nem todos os trabalhos conseguiram encontrar uma direta correlação entre estes marcadores e os efeitos benéficos do exercício no sistema cardiovascular (OLTMAN et al., 1992; McALLISTER et al.; 1996; JASPERSE E LAUGHLIN; 1999, RUSH et al., 2003; WOODMAN et al.; 2005, DELBIN et al.; 2006). Em nosso estudo, o exercício físico *per se*, em ambos os protocolos de treinamento promoveu aumento da resposta relaxante derivada do endotélio tanto em anéis de aorta quanto em anéis de mesentérica. Este resultado ocorreu de maneira independente do aumento da expressão das isoformas eNOS e nNOS quantificadas em artéria aorta. Além disso, nossos resultados mostram que não houve associação entre o aumento da resposta relaxante a acetilcolina em anéis de aorta e mesentérica e a concentração plasmática de nitrito e

nitrito em animais treinados. Assim, a melhora da resposta relaxante a acetilcolina em aorta e mesentérica de animais treinados não está relacionada à expressão da eNOS e nem a concentração plasmática de nitrito e nitrito. Passamos a investigar então, o papel da enzima anti-oxidante Cu/Zn superóxido dismutase no aumento da resposta relaxante dependente do endotélio provocado pelo exercício físico.

A reação do ânion superóxido com o NO produzido pela célula endotelial reduz a biodisponibilidade deste agente vasodilatador e dá origem a uma molécula altamente instável, o peroxinitrito, capaz de oxidar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos provocando danos celulares (BECKMAN E KOPPENOL, 1996). Estudos mostram que o aumento do stress oxidativo, caracterizado pelo aumento do ânion superóxido, provoca resistência à insulina (HOUSTIS et al., 2006) e disfunção endotelial (FORTUÑO et al., 2005; ROBERTS et al., 2006). O exercício físico de intensidade moderada contribui de maneira positiva para a redução do stress oxidativo, e isso pode ocorrer pelo aumento da atividade antioxidante como também em alguns casos pela redução da atividade pró-oxidante (HIGASHI E YOSHIZUMI, 2004; KODJA E HAMBRECHT, 2005). Em nosso estudo, observamos aumento da expressão da superóxido dismutase em artérias aorta (em ambos os protocolos de exercício) e mesentérica (somente em 12 semanas). Além disso, a atividade da superóxido dismutase no soro está aumentada nos animais do grupo TR. Assim, a redução do stress oxidativo com o aumento da atividade do sistema de defesa antioxidante pode ter contribuído para a maior biodisponibilidade do NO e conseqüentemente promovido o aumento da resposta relaxante observada em artérias dos animais dos grupos treinados.

Como esperado, a resposta relaxante ao agente doador de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio, não foi modificada pela dieta hipercalórica e nem pelo

exercício físico. Nosso trabalho está em consonância com trabalhos anteriores que mostram que as respostas relaxantes independentes do endotélio não são afetadas pelo consumo da dieta hipercalórica e/ou exercício físico (DORNYEI et al., 2000; WOODMAN et al., 2003; HENDERSON et al., 2004; NADERALI et al., 2004; THOMPSON et al., 2004; WOODMAN et al., 2005).

Trabalhos prévios mostram que a resposta contrátil induzida por agonista α -adrenérgico fenilefrina em artérias aorta e mesentérica parece não ser influenciada pelo consumo de uma dieta rica em açúcar e gorduras (NADERALI et al., 2001) e nem pelo treinamento físico (CHIES et al., 2003; LAUGHLIN et al., 2001). Confirmando achados anteriores, nossos resultados mostram que tanto a dieta hipercalórica quanto o treinamento físico não afetaram a resposta contrátil em anéis de aorta e de mesentérica. Quanto à potência, redução em torno de 2 vezes foi observada em anéis de aorta provenientes de animais treinados por 12 semanas. Alguns estudos mostram que o exercício físico reduz a sensibilidade aos agonistas α -adrenérgicos noradrenalina e fenilefrina (DELP et al., 1993; SPIER et al., 1999; CHIES et al., 2004).

8. CONCLUSÃO

O exercício físico por 4 ou 12 semanas melhora a resposta relaxante dependente do endotélio e aumenta a expressão de Cu/Zn SOD nas artérias estudadas. Além disso, reduz a concentração dos triglicerídeos circulantes e da insulina de maneira tempo dependente.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACSM (American College Sports Medicine). **Manual do ACSM para teste de esforço e prescrição de exercício**. Tradução: Paula Chermont P. Estima. 5.ed. Rio de Janeiro: REVINTER, 2000. p.66.

BANZ WJ; MAHER MA; THOMPSON WG; BASSETT DR; MOORE W; ASHRAF M; KEEFER DJ; ZEMEL MB. Effects of resistance versus aerobic training on coronary artery disease risk factors. **Exp Biol Med**, v. 228, n. 4, p. 434- 440, 2003.

BARTER PJ; RYE K. A. High density lipoproteins and coronary heart disease. **Atherosclerosis**, v. 121, n. 1, p. 1- 12, 1996.

BECKMAN JS; KOPPENOL WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am J Physiol**, v. 271, n. 5 (Pt 1), p. C1424- C1437, 1996.

BITTENCOURT JÚNIOR PIH; SENNA SM. Ácidos Graxos e Aterosclerose. In: **Entendendo a Gordura: os ácidos graxos**. Org: CURI R; POMPÉIA C; MIYASAKA CK; PROCOPIO J. São Paulo: Manole, 2002. p. 539-554.

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 7, n. 72, p. 248-254, 1976.

BRUM PC; RONDON MUPB; SILVA GJJ; KRIEGER EM. Hipertensão arterial e exercício físico aeróbio. In: **Cardiologia do Exercício: do atleta ao cardiopata**. NEGRÃO CE e BARRETO ACP (Org). São Paulo: Manole, 2005. p. 167- 178.

BURNEIKO RC; DINIZ YS; GALHARDI CM; RODRIGUES HG; EBAID GM; FAINE LA; PADOVANI CR; CICOGNA AC; NOVELLI EL. Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. **Food Chem Toxicol**, v. 44, n. 7, p.1167- 1172, 2006.

CARR A; FREI B. The role of natural antioxidants in preserving the biological activity of endothelium-derived nitric oxide. **Free Radic Biol Med**, v. 28, n. 12, p. 1806- 1814, 2000.

CHEN HI; CHIANG IP; JEN CJ. Exercise training increases acetylcholine-stimulated endothelium-derived nitric oxide release in spontaneously hypertensive rats. **J Biomed Sci**, v. 3, p. 454- 460, 1996.

CHEN S; WU C; YEN M. Exercise training activates large-conductance calcium-activated K^+ channels and enhances nitric oxide production in rat mesenteric artery and thoracic aorta. **J Biomed Sci**, v. 8, n. 3, p. 248- 255, 2001.

CHEN Y; COLLINS HL; DICARLO SE. Daily exercise enhances acetylcholine-induced dilation in mesenteric and hindlimb vasculature of hypertensive rats. **Clin Exp Hypertens**, v. 21, p. 353- 376, 1999.

CHIES AB; CORREA FM; ANDRADE CR; ROSA-E-SILVA AA; PEREIRA FC; OLIVEIRA; AM. Vascular non-endothelial nitric oxide induced by swimming exercise stress in rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 30, n. 12, p. 951- 957, 2003.

CHOATE JK; KATO K; MOHAN RM. Exercise training enhances relaxation of the isolated guinea-pig saphenous artery in response to acetylcholine. **Exp Physiol**, v. 85, p. 103- 108, 2000.

CLAUDINO MA; PRIVIERO FB; TEIXEIRA CE; NUCCI G; ANTUNES E; ZANESCO A. Improvement in relaxation response in corpus cavernosum from trained rats. **Urology**, v. 63, n. 5, p. 1004- 1008, 2004.

CONSIDINE RV; SINHA MK; HEIMAN ML; KRIAUCIUNAS A; STEPHENS TW; NYCE MR; OHANNESIAN JP; MARCO CC; McKEE LI; BAUER TL; CARO JF. Serum immunoreactive leptin concentrations in normal-weight and obese humans. **New Engl J Med**, v. 334, n. 5, p. 292- 295, 1996.

COUILLARD C; DESPRES JP; LAMARCHE B; BERGERON J; GAGNON J; LEON AS; RAO DC; SKINNER JS; WILMORE JH; BOUCHARD C. Effects of endurance exercise training on plasma HDL cholesterol levels depend on levels of triglycerides: evidence from men of the Health, Risk Factors, Exercise Training and Genetics (HERITAGE) Family Study. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 21, n. 7, p. 1226-1232, 2001.

DELBIN MA; MORAES C; CAMARGO E; MUSSI RK; ANTUNES E; NUCCI G; ZANESCO A. Influence of physical preconditioning on the responsiveness of rat pulmonary artery after pulmonary ischemia/reperfusion. **Comp Biochem Physiol Part A**, *in press*, 2006.

DELP MD; LAUGHLIN MH. Time course of enhanced endothelium-mediated dilation in aorta of trained rats. **Med Sci Sports Exerc**, v. 29, p. 1454- 1461, 1997.

DELP MD; McALLISTER RM; LAUGHLIN MH: Exercise training alters endothelium-dependent vasoreactivity of rat abdominal aorta. **J Appl Physiol**, v. 75, n. 3, p. 1354- 1363, 1993.

DESPRÉS JP; LEMINEUX I. Abnormal obesity and metabolic syndrome. **Nature**, v. 444, n. 14, p.881- 887, 2006.

DOBRIAN AD; DAVIES MJ; PREWITT RL; LAUTERIO TJ. Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity. **Hypertension**, v. 35, n. 4, p. 1009-1015, 2000.

DORNYEI G; MONOS E; KALEY G; KOLLER A. Regular exercise enhances blood pressure lowering effect of acetylcholine by increased contribution of nitric oxide. **Acta Physiol Hung**, v. 87, n. 2, p.127- 138, 2000.

DURSTINE JL; GRANDJEAN PW; DAVIS PG; FERGUSON MA; ALDERSON NL; DUBOSE KD. Blood lipid and lipoprotein adaptations to exercise: a quantitative analysis. **Sports Med**, v. 31, n. 15, p. 1033- 1062, 2001.

ECKARDSTEIN A; NOFER JR; ASSMANN G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 21, n. 1, p. 13- 27, 2001.

ESTADELLA D; OYAMA LM; DÂMASO AR; RIBEIRO EB; NASCIMENTO CMO. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**, v. 20, n. 2, p. 218- 224, 2004.

FLEMING I; BUSSE R. NO: the primary EDRF. **J Mol Cell Cardiol**, v. 3, n. 1, p. 5- 14, 1999.

FORTUÑO A; JOSÉ GS; MORENO MU; DÍEZ J; ZALBA G. Oxidative stress and vascular remodeling. **Exp Physiol**, v. 90, n. 4, p. 457- 462, 2005.

FRIED SK; RAO SP. Sugars, hypertriglyceridemia, and cardiovascular disease. **Am J Clin Nutr**, v. 78, n. 4, p. 873S- 880S, 2003.

FRIEDMAN JM; HALAAS JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, v. 395, n. 22, p. 763- 770, 1998.

FURCHGOTT RF; ZAWADZKI JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 27, n. 288 (5789), p. 373- 376, 1980.

GRAHAN DA; RUSH JW. Exercise training improves aortic endothelium-dependent vasorelaxation and determinants of nitric oxide bioavailability in spontaneously hypertensive rats. **J Appl Physiol**, v. 96, p. 2088- 2096, 2004.

GRIENGLING KK; SORESCU D; USHIO-FUKAI M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **Circ Res**, v. 17, n. 86(5), p. 494- 501, 2000.

GUAL P; LE MARCHAND-BRUSTEL Y; TANTI JF. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. **Biochimie**, v. 87, n. 1, p. 99- 109, 2005.

GUYTON AC; HALL JE. **Textbook of Medical Physiology**. 9.ed. New York: Saunders Company, 1996. p. 98-105.

HENDERSON KK; TURK JR; RUSH JW; LAUGHLIN MH. Endothelial function in coronary arterioles from pigs with early-stage coronary disease induced by high-fat, high-cholesterol diet: effect of exercise. **J Appl Physiol**, v. 97, n. 3, p. 1159- 1168, 2004.

HIGASHI Y; YOSHIKAZUMI M. Exercise and endothelial function: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. **Pharmacol Ther**, v. 102, n. 1, p. 87- 96. 2004.

HIRATA MR; HIRATA RDC. Transporte de Ácidos Graxos no Plasma. In: **Entendendo a Gordura: os ácidos graxos**. Org: CURI R; POMPÉIA C; MIYASAKA CK; PROCOPIO J. São Paulo: Manole, 2002. p. 61- 72.

HOLLOSZY JO. Exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity. **J Appl Physiol**, v. 99, p. 338- 343, 2005.

HOUSTIS N; ROSEN ED; LANDER ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. **Nature**, v. 440, n. 13, 944- 948, 2006.

IGNARRO LJ. Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. **Biosci Rep**, v. 19, n. 2, p. 51- 71, 1999.

IMANISHI T; HANO T; SAWAMURA T; NISHIO I. Oxidized low-density lipoprotein induces endothelial progenitor cell senescence, leading to cellular dysfunction. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 31, n. 7, p. 407- 413, 2004.

IRIGOYEN MC; DE ANGELIS K; CHAAN BAS; FIORINO P; MICHELINI LC. Exercício físico no diabetes melito associado à hipertensão arterial sistêmica. **Rev Bras Hipertens**, v. 10, n. 2, p.109- 116, 2003.

JASPERSE JL; LAUGHLIN MH. Vasomotor responses of soleus feed arteries from sedentary and exercise-trained rats. **J Appl Physiol**, v. 86, n. 2, p.441- 449, 1999.

KIM CH; YOUN JH; PARK JY; HONG SK; PARK KS; PARK SW; SUH KI; LEE KU. Effects of high-fat diet and exercise training on intracellular glucose metabolism in rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 278, n. 6, p. E977- E984, 2000.

KINGWELL BA. Nitric oxide-mediated regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease. **FASEB**, v.14, n. 12, p. 1685- 1696, 2000.

KIRWAN JP; DEL AGUILA LF. Insulin signalling, exercise and cellular integrity. **Biochem Soc Trans**, v. 31, n. Pt 6, p. 1281- 1285, 2003.

KOJDA G; HAMBRECHT R. Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? **Cardiovasc Res**, v. 1, n. 67 (2), p. 187- 197, 2005.

KUSTERER K; POHL T; FORTMEYER HP; MARZ W; SCHARNAGL H; OLDENBURG A; ANGERMULLER S; FLEMING I; USADEL KH; BUSSE R. Chonic selective hypertriglyceridemia impairs endothelium-dependent vasodilatation in rats. **Cardiovasc Res**, v. 42, n. 3, p. 783- 793, 1999.

LAUGHLIN HM; SCHRAGE WG; MCALLISTER RM; GARVERICK HA; JONES AW. Interaction of gender and exercise training: vasomotor reactivity of porcine skeletal muscle arteries. **J Appl Physiol**, v. 90, p. 216- 227, 2001.

LAUGHLIN MH; RUBIN LJ; RUSH JW; PRICE EM; SCHRAGE WG; WOODMAN CR. Short-term training enhances endothelium-dependent dilation of coronary arteries, not arterioles. **J Appl Physiol**, v. 94, n. 1, p. 234- 244, 2002.

LEE DM; LEINUNG MC; ROZHAVSKAYA-ARENA M; GRASSO P. Leptin and the treatment of obesity: its current status. **Eur J Pharmacol**, v. 440, n. 2-3, p. 129- 39, 2002.

LEWIS GF; UFFELMAN KD; SZETO LW; STEINER G. Effects of acute hyperinsulinemia on VLDL triglyceride and VLDL apoB production in normal weight and obese individuals. **Diabetes**, v. 42, n. 6, p. 833- 842, 1993.

LIMA, J. C. C. As dislipidemias e suas avaliações laboratoriais. **Hiperativo**, v. 6, n. 2, p. 133- 143, 1999.

LUSIS AJ; MAR R; PAJUKANTA P. Genetics of atherosclerosis. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v. 5, p. 189- 218, 2004.

MAEDA S; MIYAUCH T; KAKIYAMA T; SUGAWARA J; IEMITSU M; IRUKAYAMA-TOMOBE Y; MURAKAMI H; KUMAGAI Y; KUNO S; MATSUDA M. Effects of exercise training of 8 weeks and detraining on plasma levels of endothelium-derived factors, endothelin-1 and nitric oxide, in healthy young humans. **Life Sci**, v. 69, n. 9, p.1005- 1016, 2001.

MALMSTROM R; PACKARD CJ; WATSON TD; RANNIKKO S; CASLAKE M; BEDFORD D; STEWART P; YKI-JARVINEN H; SHEPHERD J; TASKINEN MR. Metabolic basis of hypotriglyceridemic effects of insulin in normal men. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 17, n. 7, p. 1454- 1464, 1997.

MATTHEWS DR; HOSKER JP; RUDENSKI AS; NAYLOR BA; TREACHER DF; TURNER RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, n. 7, p. 412- 419, 1985.

McALLISTER RM; KIMANI JK; WEBSTER JL; PARKER JL; LAUGHLIN MH. Effects of exercise training on responses of peripheral and visceral arteries in swine. **J Appl Physiol**, v. 80, n. 1, p. 216- 225, 1996.

McALLISTER RM; LAUGHLIN MH. Short-term exercise training alters responses of porcine femoral and brachial arteries. **J Appl Physiol**, v. 82, p. 1438- 1444, 1997.

McCARTY MF. An elevation of triglycerides reflecting decreased triglyceride clearance may not be pathogenic - relevance to high-carbohydrate diets. **Med Hypotheses**, v. 63, n. 6, p. 1065- 1073, 2004.

McLAUGHLIN T; ABBASI F; LAMENDOLA C; YENI-KOMSHIAN H; REAVEN G. Carbohydrate-induced hypertriglyceridemia: an insight into the link between plasma insulin and triglyceride concentrations. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 85, n. 9, p. 3085- 3088, 2000.

MONCADA S; PALMER RM; HIGGS E. A: Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, n. 2, p. 109- 142, 1991.

MONCADA S; PALMER RM; HIGGS EA. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. **Hypertension**, v. 12, n. 4, p. 365- 372, 1988.

NADERALI EK; FATANI S; WILLIAMS G. Chronic withdrawal of a high-palatable obesity-inducing diet completely reverses metabolic and vascular abnormalities associated with dietary-obesity in the rat. **Atherosclerosis**, v. 172, n. 1, p. 63- 69, 2004.

NADERALI EK; WILLIAMS G. Prolonged endothelial-dependent and -independent arterial dysfunction induced in the rat by short-term feeding with a high-fat, high-sucrose diet. **Atherosclerosis**, v. 166, n. 2, p. 253- 259, 2003.

NADERALI EK; BROWN MJ; PICKAVANCE LC; WILDING JPH; DOYLE PJ; WILLIAMS G. Dietary obesity in the rat induces endothelial dysfunction without cause insulin resistance: a possible role for triacylglycerols. **Clin Sci**, v. 101, n. 5, p. 499-506, 2001.

OBERBACH A; TONJES A; KLOTING N; FASSHAUER M; KRATZSCH J; BUSSE MW; PASCHKE R; STUMVOLL M; BLUHER M. Effect of a 4 week physical training program on plasma concentrations of inflammatory markers in patients with abnormal glucose tolerance. **Eur J Endocrinol**, v. 154, n. 4, p. 577- 585, 2006.

OLTMAN CL; PARKER JL; ADAMS HR; LAUGHLIN MH. Effects of exercise training on vasomotor reactivity of porcine coronary arteries. **Am J Physiol**, v.263, p. H372- H382, 1992.

PALMER RM; REES DD; ASHTON DS; MONCADA S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. **Bioch Biophys Res Commun**, v. 30, n. 153 (3), p. 1251- 1256, 1988.

PEREIRA LO; FRANCHISSHI RP; LANCHA AH Jr. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 47, n. 2, p. 111-127, 2003.

PETRY CJ; OZANNE SE; WANG CL; HALES CN. Effects of early protein restriction and adult obesity on rat pancreatic hormone content and glucose tolerance. **Horm Metab Res**, v. 32, n. 6, p. 233- 239, 2000.

PLOUG T; GALBO H; RICHTER EA. Increased muscle glucose uptake during contractions: no need for insulin. **Am J Physiol**, v. 247, n. 6 (Pt 1):E726- E731, 1984.

ROBERTS CK; BARNARD RJ; SINDHU RK; JURCZAK M; EHDAIE A; VAZIRI ND. Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. **Metab Clin Exp**, v. 55, p. 928- 934, 2006.

RUSH JW; TURK JR; LAUGHLIN MH. Exercise training regulates SOD-1 and oxidative stress in porcine aortic endothelium. **Am J Physiol Heart Circ. Physiol**, v. 284, p. H1378- H1387, 2003.

SALTIEL AR; KAHN CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v.13, n. 414(6865), p. 799- 806 2001.

SESSA WC; PRITCHARD K; SEYEDI N; WANG J; HINTZE TH. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. **Circ Res**, v. 74, n. 2, p. 349- 353, 1994.

SHEN W; LUNDBORG M; WANG J; STEWART JM; XU X; OCHOA M; HINTZE TH. Role of EDRF in the regulation of regional blood flow and vascular resistance at rest and during exercise in conscious dogs. **J Appl Physiol**, v. 77, n. 1, p. 165- 172, 1994.

SHIMOMURA I; HAMMER RE; IKEMOTO S; BROWN MS; GOLDSTEIN JL. Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. **Nature**, v. 2, n. 401(6748), p. 73- 76, 1999.

SHINOZAKI K; KASHIWAGI A; NISHIO Y; OKAMURA T; YOSHIDA Y; MASADA M; TODA N; KIKKAWA R. Abnormal biopterin metabolism is a major cause of impaired endothelium-dependent relaxation through nitric oxide/O₂⁻ imbalance in insulin-resistant rat aorta. **Diabetes**, v. 48, p. 2437- 2445, 1999.

SIGAL RJ; KENNY GP; WASSERMAN DH; CASTANEDA-SCEPPA C. Physical activity/exercise and type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, n. 10, 2518- 2539, 2004.

SPIER SA, LAUGHLIN MH, DELP MD. Effects of acute and chronic exercise on vasoconstrictor responsiveness of rat abdominal aorta. **J Appl Physiol**, v. 87, n. 5, 1752- 1757, 1999.

SUN D; HUANG H; KOLLER A; KALEY G. Short-term daily exercise activity enhances endothelial NO synthesis in skeletal muscle arterioles of rats. **J Appl Physiol**, v. 76, p. 2241- 2247, 1994.

THOMAS TR; PELLECHIA J; RECTOR RS; SUN GY; STUREK MS; LAUGHLIN MH. Exercise training does not reduce hyperlipidemia in pigs fed a high-fat diet. **Metabolism**, v. 51, n. 12, p.1587- 1595, 2002.

THOMPSON MA; HENDERSON KK; WOODMAN CR; TURK JR; RUSH JW; PRICE E; LAUGHLIN MH. Exercise preserves endothelium-dependent relaxation in coronary arteries of hypercholesterolemic male pigs. **J Appl Physiol**, v. 96, n. 3, p. 1114- 1126, 2004.

TSCHÖP M; HEIMAN ML. Rodent obesity models: an overview. **Exp Clin Endocrinol & Diabetes**, v. 109, n. 6, p. 307- 319, 2001.

VAN ROSSUM JM. Cumulative dose-response curves. II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. **Arch Intern Pharmacodynamics Ther**, v. 143, p. 299- 330, 1963.

VASCONCELOS LABA; CARVALHO HF. Célula muscular lisa. In: **Células: uma abordagem multidisciplinar**. Org: Carvalho HF e Collares-Buzato CB. São Paulo: Manole, 2005. p.68- 82.

WANG J; WOLIN MS; HINTZE TH: Chronic exercise enhances endothelium-mediated dilation of epicardial coronary artery in conscious dogs. **Circ Res**, v. 73, n. 5, 829- 838, 1993.

WANG JS; LIN CC; CHEN JK; WONG MK. Role of chronic exercise in decreasing oxidized LDL-potentiated platelet activation by enhancing platelet-derived NO release and bioactivity in rats. **Life Sci**, v. 7, n. 66(20), p. 1937- 1948, 2000.

WEBB RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ*, v. 27, n. 1-4, p. 201- 206, 2003.

WEST DB; YORK B. Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. **Am J Clin Nutr**, v. 67, p.505S- 512S, 1998.

WILDING JPH. Leptin and the control of obesity. **Curr Opinion Pharmacol**, v. 1, n. 6, p. 656- 61, 2001.

WILLOUGHBY S; HOLMES A; LOSCALZO J. Platelets and cardiovascular disease. **Eur J Cardiovasc Nurs**, n. 1, v. 4, p. 273- 288, 2002.

WITZTUM JL; STEINBERG D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. **J Clin Invest**, v. 88, n. 6, p.1785- 1792, 1991.

WOODMAN CR; THOMPSON MA; TURK JR; LAUGHLIN MH. Endurance exercise training improves endothelium-dependent relaxation in brachial arteries from hypercholesterolemic male pigs. **J Appl Physiol**, v. 99, n. 4, p. 1412- 1421, 2005.

WOODMAN CR; TURK JR; WILLIAMS DP; LAUGHLIN MH. Exercise training preserves endothelium-dependent relaxation in brachial arteries from hyperlipidemic pigs. **J Appl Physiol**, v. 94, n. 5, p.2017- 2026, 2003.

WOODMAN CR; MULLER JM; LAUGHLIN MH; PRICE EM. Induction of nitric oxide synthase mRNA in coronary resistance arteries isolated from exercise-trained pigs. **Am J Physiol**, v. 273, n. 6 (pt 2), p. H2575- H2579, 1997.

YAMAUCHI T; KAMON J; WAKI H; TERAUCHI Y; KUBOTA N; HARA K; MORI Y; IDE T; MURAKAMI K; TSUBOYAMA-KASAOKA N; EZAKI O; AKANUMA Y; GAVRILOVA O; VINSON C; REITMAN ML; KAGECHIKA H; SHUDO K; YODA M; NAKANO Y; TOBE K; NAGAI R; KIMURA S; TOMITA M; FROGUEL P; KADOWAKI T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. **Nat Med**, v. 7, n. 8, p. 941-946, 2001.

YEN MH; YANG JH; SHEU JR; LEE YM; AN DING Y. Chronic exercise enhances endothelium-mediated dilation in spontaneously hypertensive rats. **Life Sci**, v. 24, p. 2205- 2213, 1995.

YOKOZAWA T; NAKAGAWA T; KITANI K. Antioxidative activity of green tea polyphenol in cholesterol- fed rats. **J Agric Food Chem**, v. 50, n. 12, p. 3549- 3552, 2002.

ZANESCO A; ANTUNES E. Células Endoteliais. In: **Células**: uma abordagem multidisciplinar. Org: Carvalho HF e Collares-Buzato CB. São Paulo: Manole, 2005. p.184- 191.

ZATZ R. A low cost tail-cuff method for the estimation of mean arterial pressure in conscious rats. **Lab Animal Sci**, v. 40, n. 2, p. 198- 201, 1990.

10. ABSTRACT

Overweight and obesity are rising around the world as well as cardiovascular and metabolic diseases incidence. Regular physical exercise has been used as a non pharmacological tool to prevent and/or treat cardiovascular and metabolic diseases. For this reason, this study aimed to evaluate the influence of regular physical exercise on the vascular reactivity of aorta and mesenteric arteries from obese rats. The obesity was induced by hyper caloric diet consumption during 8 weeks. The animals were divided in four groups (SD: sedentary; TR: trained; SDD: diet sedentary; TRD: diet trained) and underwent different experimental protocols (therapeutic: 4 weeks after start high caloric diet consumption and preventive: 4 weeks before the start of high caloric diet consumption). The total duration of exercise training program was also different between protocols, 4 and 12 weeks of training for therapeutic and preventive groups, respectively. Vascular reactivity of aorta and mesenteric arteries, lipid profile (total cholesterol, triglyceride and HDL cholesterol), blood glucose, insulin, nitrite/nitrate plasma levels, serum SOD activity, arterial expression of eNOS, nNOS and Cu/Zn SOD were measured. The consumption of hyper caloric diet per 8 weeks, in therapeutic and preventive protocols, induced body weight gain, increase in glucose, insulin and triglycerides levels. In addition, endothelium-dependent relaxation and the expression of Cu/Zn SOD in mesenteric artery were reduced. Exercise training for 4 or 12 weeks reduced triglycerides concentration, increased endothelium-dependent relaxation in aorta and mesenteric arteries and increased serum SOD activity. Significant reduction in insulin concentration was seen only after 12 weeks of training. The aortic Cu/Zn SOD expression increased in both 4 and 12 weeks of exercise training. However, in mesenteric artery, a significant increase was verified only after 12 weeks of exercise training. In conclusion, exercise training for 4 and 12 weeks was

efficient to increase endothelium-dependent relaxation in aorta and mesenteric arteries. This improvement was associated with an increase in antioxidant enzyme Cu/Zn SOD expression in both preparations. No alterations in plasma concentration of nitric oxide metabolites and/or in the expression of eNOS were found in all studied groups.

11. ANEXOS

ANEXO I

Composição das dietas normoproteica (utilizada na preparação da dieta hipercalórica) e da dieta hipercalórica utilizada neste estudo.

DIETA HIPERCALÓRICA

Componentes e quantidade para 1 kg	
AIG-93 G	330 g
Leite condensado Moça	330 g
Caseína 84%	91,9 g
Mistura de vitaminas	6,70 g
Mistura de minerais	23,45 g
Óleo de soja	62 g
Sacarose	115,95 g

DIETA NORMOPROTEICA 17% - AIN-93

Componentes e quantidade para 1 kg	
Amido de milho	397 g
Caseína 84%	202 g
Dextrina	130,5 g
Sacarose	100 g
Fibra	50 g
Mistura vitaminas	10 g
Mistura de sais	35 g
L-Cistina	3 g
Óleo de soja	70 g
Colina	2,5 g

ANEXO II

Composição da mistura de vitaminas e da mistura de sais minerais utilizados na dietas AIN- 93G e na dieta hipercalórica.

Mistura de vitaminas

Componentes e quantidade para 1 kg	
Ácido nicotínico	3,0 g
Pantotenato de cálcio	1,6 g
Piridoxina HCL	0,7 g
Tiamina HCL	0,6 g
Riboflavina	0,6 g
Ácido fólico	0,2 g
D-Biotina	0,02 g
Vit B12 (cianocobalamina) 0,1% em manitol	2,5 g
Vit E (tocoferol) 500 UI/g	15,0 g
Vit A (500.000 UI/g)	0,8 g
Vit D3 (400.000 UI/g)	0,25 g
Vit K (menadiona)	0,075 g
Sacarose	974 g

Mistura de minerais

Componentes e quantidade para 1 kg	
Carbonato de cálcio anidro	357,0 g
Fosfato de potássio monobásico	196,0 g
Citrato de potássio tripotássio.H ₂ O	70,78 g
Cloreto de sódio	74,0 g
Sulfato de potássio	46,60 g
Óxido de magnésio	24,0 g
Citrato férrico	6,06 g
Carbonato de zinco	1,65 g
Carbonato manganoso	0,63 g
Carbonato cúprico	0,30 g
Iodeto de potássio	0,01 g
Selenato de sódio anidro	0,01025 g
Para-molibdato de amônia 4. H ₂ O	0,00795 g
Metasilicato de sódio 9. H ₂ O	1,45 g
Sulfato de cromo e potássio 12 H ₂ O	0,275 g
Cloreto de lítio	0,0174 g
Ácido bórico	0,0815 g
Fluoreto de sódio	0,0635 g
Carbonato de níquel	0,0318
Vanadato de amônio	0,0066
Sacarose	221,026

ANEXO III**PROTOCOLO TERAPÊUTICO**

Consumo alimentar semanal dos animais dos grupos sedentário (SD), treinado (TR), sedentário dieta (SDD) e treinado dieta (TRD)

semana	SD	TR	SDD	TRD
1	135	125	101	109
2	91	91	84	82
3	96	88	89	82
4	92	92	88	84
5	73	80	72	70
6	81	75	88	78
7	90	80	88	72
8	92	78	90	78

Valores em gramas representam a média do consumo de ração Purina (SD e TR) ou dieta hipercalórica (SDD e TRD) por caixa com quatro animais.

PROTOCOLO PREVENTIVO

Consumo alimentar semanal dos animais dos grupos sedentário (SD), treinado (TR), sedentário dieta (SDD) e treinado dieta (TRD)

semana	SD	TR	SDD	TRD
1	80	70	82	71
2	84	75	88	78
3	90	80	88	72
4	92	78	90	78
5	93	75	101	82
6	92	79	96	80
7	87	75	96	85
8	85	77	90	76
9	87	80	91	82
10	88	82	89	87
11	90	78	94	85
12	85	80	90	82

Valores em gramas representam a média do consumo de ração Purina (SD e TR) ou dieta hipercalórica (SDD e TRD) por caixa com quatro animais.