
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LUANA MARTINS FERRAZ

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NOS
GRÂNULOS DE PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS
ATRIAIS EM RATAS *WISTAR* SUBMETIDAS A
MENOPAUSA EXPERIMENTAL**



Rio Claro
2018

LUANA MARTINS FERRAZ

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NOS GRÂNULOS DE
PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS ATRIAIS EM RATAS *WISTAR*
SUBMETIDAS A MENOPAUSA EXPERIMENTAL**

Orientador: Adriano Polican Ciena

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Campus de Rio Claro, para obtenção do grau
de bacharela em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2018

F381e Ferraz, Luana Martins
Efeitos Do Exercício Físico Nos Grânulos De Peptídeos
Natriuréticos Atriais Em Ratas Wistar Submetidas A
Menopausa Experimental / Luana Martins Ferraz. -- Rio Claro,
2018
32 p. : il., fotos

Trabalho de conclusão de curso (-) - Universidade Estadual
Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Adriano Polican Ciena

1. Peptídeos Natriuréticos Atriais. 2. Menopausa. 3.
Exercício Físico. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

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

Arthur Schopenhauer

AGRADECIMENTOS

Sou muito grata por ter tido a oportunidade de ter feito minha graduação na área que sonho desde criança e que sempre foi muito encorajada pela família e amigos que tanto amo. Sinto como uma grande conquista que isso tenha acontecido na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, já que não poderia pedir um lugar com que tivesse tanta compatibilidade.

Nesta jornada conheci pessoas que tiveram uma importância imensa para o meu crescimento, alegria, conhecimento e bem-estar. Levo em conta cada risada por besteiras, suporte, comilança e estudos até altas horas. Infelizmente nem sempre ficamos próximos por trilharmos caminhos diferentes, mas sou grata por cada momento. E espero que estejam em todos os momentos importantes da minha vida daqui para frente.

Também devo mencionar o LAMAF, laboratório em que passei a maior parte da minha graduação e onde fiz ótimos amigos e aprendi muito. Obrigada por todo o auxílio e conhecimento que toda a equipe me passou.

Agradeço também a todos os professores que, mesmo com poucos recursos, fizeram um ótimo trabalho e ensinaram muito e, em algumas vezes de um modo tão maravilhoso que tenho confiança que jamais esquecerei.

Por último, mas não menos importante. À minha família e velhos amigos, por todo o carinho, suporte, motivação e amor. Com vocês tudo fica melhor.

RESUMO

Os peptídeos natriuréticos atriais (PNA) compõe um hormônio produzido no coração, principalmente no átrio esquerdo, e armazenado em grânulos dispostos adjacente ao núcleo dos cardiomiócitos. É responsável pela regulação da pressão sanguínea por meio, principalmente, da natriurese e diurese, funcionando de modo antagonista ao sistema renina – angiotensina, a fim de impedir avarias no sistema circulatório e associados. Estudos apontam uma possível interação dos PNA'S com hormônios sexuais, que por sua vez passam por atenuação de produção e sensibilidade até sua cessação durante o envelhecimento, que culmina em menopausa. O objetivo deste estudo foi analisar morfoquantitativamente os grânulos de PNA frente ao modelo experimental de menopausa em ratas *Wistar* submetidas ao protocolo de treinamento de natação. Foram utilizadas 20 ratas *Wistar* organizadas em 4 Grupos: Sedentário (S): os animais não foram submetidos a nenhum protocolo; Treinado (T): animais submetidos ao treinamento de natação; Ovariectomia (O): animais submetidos apenas ao procedimento cirúrgico – ovariectomia e Ovariectomia/Treinado (OT): animais submetidos à ovariectomia e ao treinamento de natação. Amostras do átrio esquerdo foram dissecadas, processadas e analisadas ao microscópio eletrônico de transmissão. Com as imagens obtidas, realizaram-se as análises morfoquantitativas (ImageJ[®]) e análise estatística (GraphPad Prism[®]). Os resultados mostram que os animais submetidos ao exercício físico e a ovariectomia reduziram a área, diâmetro e densidade dos grânulos, mais acentuada com o procedimento cirúrgico. O grupo OT, que passou por ambos os protocolos, manteve-se com os parâmetros de área e diâmetro semelhante ao Grupo O, enquanto a densidade manteve-se semelhante ao grupo T. Concluiu-se que os protocolos adotados promovem diminuição dos grânulos, porém no modelo experimental de menopausa o treinamento físico aumentou a densidade de grânulos.

Palavras-chave: Peptídeos Natriuréticos Atriais, Menopausa, Exercício Físico.

ABSTRACT

The atrial natriuretic peptides (ANP) compose a hormone produced in the heart, mostly in the left atrium, and is stored within granules that are arranged adjacent to the cardiomyocyte nucleus. It is responsible for the regulation of the blood pressure through mainly natriuretic and diuresis, functioning as an antagonist of the renin-angiotensin system, in order to avoid issues in the circulatory system and associated. Researches point out a possible interaction between ANP and sexual hormones, which in turn undergo attenuation of production and sensibility until its cessation during aging, which culminates menopause. The objective of this research was to analyze morfoquantitatively the ANP granules due to the experimental model of menopause in *Wistar* mice submitted to the protocol of physical exercise. It was used 20 *Wistar* mice, organized in 4 groups: Sedentary (S): animals were not submitted to any protocol; Trained (T): animals submitted to swimming; Ovariectomized (O): animals submitted only to the chirurgic procedure (ovariectomy); Ovariectomized Trained (OT): animals submitted to the procedure of ovariectomy and swimming training. Samples of the left atrium were dissected, prepared and analyzed in a scanning transmission electronic microscopy. With the images obtained, morpho-quantitative analyzes (ImageJ®) and statistical analysis (GraphPad Prism®) were performed. The results show that the animals submitted to physical exercise or ovariectomy obtained a decrease in the area, diameter and density of the granules, being more accentuated with the surgical procedure. The OT group, which underwent both protocols, maintained the parameters of area and diameter similar to Group O, while the density remained similar to the T-group. It was concluded that the adopted protocols promote decrease of the granules, however in the experimental model of menopause physical training increased the density of granules.

Key-words: Atrial Natriuretic Peptides, Menopause, Training.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organograma de protocolos experimentais.....	14
Figura 2. Demonstração do Treinamento de Natação.	16
Figura 3. Diagrama de análise a partir do software Image J®.	18
Figura 4. Microscopia eletrônica de transmissão dos grânulos de PNA do átrio esquerdo dos Grupos.	20
Figura 5. Média e desvio padrão de densidade, diâmetro e área dos grânulos de PNA.....	22

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
:	Dividido, Por
<	Maior Ou Menor Que
±	Mais Ou Menos
°C	Graus Celsius
µm	Micrometros
CEUA	Comitê De Ética E Pesquisa Com Animais
cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido De Carbono
Kg	Quilogramas
mg	Miligramas
nm	Nanômetros
Nº	Número
O	Ovariectomia
OT	Ovariectomia/Treinado
PNA	Peptídeos Natriuréticos Atriais
S	Sedentário
T	Treinado
x	Vezes, Por

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1. Peptídeos Natriuréticos Atriais	8
1.2. Menopausa	10
1.3. Exercício Físico	11
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. Objetivos Específicos	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Animais.....	14
3.2. Processo Cirúrgico – Ovariectomia	15
3.3. Protocolo de Treinamento.....	15
3.4. Microscopia Eletrônica De Transmissão	16
3.5. Morfometria	17
4. RESULTADOS	19
5. DISCUSSÃO.....	23
6. CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS	26
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa com Animais.	29
ANEXO B – Certificado de Participação em Congresso (CIC).....	30
ANEXO C – Certificado de Seleção para 2º Fase CIC.....	31

1. INTRODUÇÃO

Os peptídeos natriuréticos atriais (PNA) agem como hormônio capaz de exercer função protetora do sistema cardiovascular em situações de hipervolemia, que promove vasodilatação, natriurese e diurese. São armazenados em grânulos no coração, principalmente no átrio esquerdo e suas ações são mediadas por receptores membranosos, presentes em diversas partes do corpo (DANIELS; MAISEL, 2007)

Ademais, muitos estudos apontam uma possível relação de modulação entre os PNA's e hormônios ovarianos, em que já foi estabelecida a influência destes hormônios em humanos, ratos e camundongos devido a estimulação pelo estrogênio na produção e secreção dos PNA's, que é reduzida em animais submetidos a cirurgia de ovariectomia. No entanto, nenhum deles estudou profundamente a relação de todo o sistema dos peptídeos natriuréticos, hormônios ovarianos e exercícios físicos (SOUZA et al., 2014)

Doenças cardiovasculares são uma das maiores causas de doenças e morte em mulheres, principalmente após a menopausa, mas não são totalmente compreendidos por envolverem a regulação da pressão arterial pelos hormônios sexuais (FLUES et al., 2010). O exercício físico aeróbico e de moderada intensidade, como a natação, é amplamente recomendado como um meio profilático e de tratamento para patologias no sistema cardiovascular, já que leva a adaptações sistêmicas (PETRINI et al., 2015). Em decorrência destes aspectos, é notável a importância de compreender a interação dos aspectos fisiológicos ocasionados pelo treinamento de natação e modelo experimental de menopausa nos grânulos responsáveis pela síntese, estocagem e liberação dos PNA's.

1.1. Peptídeos Natriuréticos Atriais

Os peptídeos natriuréticos atriais são moléculas que agem como um hormônio e pertencem à família dos peptídeos natriuréticos, cuja semelhança é sua função biológica e estrutura molecular de um anel de 17 aminoácidos, estabilizado por uma ponte dissulfeto e caudas terminais de carbono e nitrogênio. Foi descoberto na década de 80, por Bold et al. (1981) a partir de imagens de microscopia eletrônica que mostravam grânulos nos cardiomiócitos. Estes são responsáveis por sua síntese, armazenamento e secreção, caracterizando o coração como órgão endócrino. No entanto, segundo Rubattu, Sciarretta e Volpe (2014), recentes estudos

mostram que não são encontrados em cardiomiócitos hipertrofiados. Até o momento foram descobertos cinco diferentes tipos de peptídeos natriuréticos, que diferem molecularmente em sua cauda terminal, locais de ação e produção, concentração circulante e receptores necessários para exercer sua ação (SOUZA et al., 2014; WOODARD; ROSADO, 2007). Devido a isso, supõe-se que possuam relação a fenômenos fisiológicos ainda não conhecidos. No entanto, ao considerar seus efeitos no cérebro, podem ter influência sobre a fome e sede, como um meio de controle sobre sua principal atividade, e também sobre o ciclo circadiano pela relação ao eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (OLIVEIRA et al., 1997)

Estes peptídeos têm a função de controlar a volemia e pressão sanguínea a partir do balanço de fluidos e sais do organismo. Para isso, ocorre a ligação de moléculas de PNA com receptores tipo A, que desencadeiam a ativação da enzima guanilato ciclase, elevando a concentração de GMPc. Este é um mensageiro secundário que leva o organismo à natriurese, diurese, aumento da filtração glomerular, diminuição das atividades do sistema simpático, alterações no volume de plasma, débito cardíaco, pressão sanguínea, inibição da mitose dos fibroblastos e hipertrofia cardiovascular (WONG; GUO; ZHANG, 2017). Além disso, muitos estudos têm mostrado que os PNA's são capazes de diminuir o tempo de condução e o período efetivo de refração em corações intactos de humanos e cães (RUBATTU; SCIARRETTA; VOLPE, 2014).

Os PNA's foram encontrados em diversos órgãos e tecidos extracardíacos, onde participam de regulações tanto autócrinas quanto parácrinas. Por exemplo, foram encontrados na glândula pituitária e no sistema reprodutivo feminino (ovários, útero e trompas). Apesar de serem raros os trabalhos que busquem a interação dos PNA's com hormônios ovarianos, cada vez mais uma modulação fica evidente (TSAI et al., 2005). Segundo estudos, estes hormônios teriam efeito cardioprotetor, corroborado pela baixa incidência de patologias cardíacas antes da menopausa, mas alto após este processo e diminuído com reposição hormonal. No entanto, existem estudos insuficientes para apontar quais são os efeitos diretos no sistema cardiovascular (MENDELSON, 2002).

Em pacientes com insuficiência cardíaca ocorre aumento de níveis circulantes de PNA e do peptídeo tipo-B correspondente ao tamanho do trauma, mas apesar da alta concentração, parece que não são capazes de exercer seu efeito hemodinâmico e renal devido à resistência periférica. Com isso, tem-se estudado amplamente a aplicação de exames de seus níveis de concentração como um meio de diagnóstico de patologias cardíacas. Atualmente, já são realizados exames clínicos do peptídeo tipo-B para diagnósticos de doenças coronarianas e doença renal crônica (SILVA; PINHEIRO; SANTOS, 2008)

Os PNA's são sintetizados e liberados de seus grânulos na corrente sanguínea ao menor sinal de distensão das paredes cardíacas. Portanto, atualmente tem sido altamente recomendada a prática de exercícios físicos, já que estes promovem melhoramento no mecanismo de elasticidade e pressão dos átrios. Ademais, recentes estudos demonstram aumento de concentração de PNA circulante no sangue em estudos envolvendo exercícios e problemas de saúde (DANIELS; MAISEL, 2007; SILVA; PINHEIRO; SANTOS, 2008; VARDAR et al., 2015).

1.2.Menopausa

O processo de envelhecimento pode ser definido como um declínio funcional irreversível que age sobre a maioria dos seres vivos devido ao tempo (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013). Pode ser considerado multifatorial, visto que sua evolução depende de vários fatores, tais como: estilo de vida, condições socioeconômicas, doenças crônicas e estado psíquico. O corpo envelhece como um todo, mas seus órgãos, tecidos, células e suas estruturas envelhecem em ritmos diferentes (FECHINE; TROMPIERI, 2015; CANCELA, 2007).

Ademais, compreende diversas alterações orgânicas e mentais do organismo, que geram dificuldade de manter seu equilíbrio homeostático, levando a um declínio fisiológico gradual. Fatores externos também são considerados, pois um corpo envelhecido pode funcionar normalmente, mas se submetido a situações de stress físico ou emocional, pode apresentar dificuldade em manter a homeostase, levando-o a uma sobrecarga funcional, que por sua vez pode culminar em patologias, visto que seus sistemas endócrino, nervoso e imunológico não têm o mesmo funcionamento de um jovem (CANCELA, 2007).

No caso das mulheres, um dos marcos do envelhecimento é a menopausa. Ela é caracterizada pelo processo natural de declínio da produção de hormônios ovarianos e cessação permanente da menstruação e ovulação. Além disso, vem acompanhada de outros sintomas, como: distúrbios do sono, instabilidade emocional, disfunções sexuais e patologias urogenitais (SORPRESO et al., 2015; LAVEN et al., 2016).

No sistema cardiovascular, são esperadas algumas alterações. Dentre elas, pode-se citar a diminuição da capacidade de o coração aumentar seus batimentos e força, quando submetido a um esforço; há também a redução da frequência cardíaca em repouso; aumento de colesterol e resistência vascular, com aumento da tensão arterial, além do depósito de lipofuscina, gordura, cálcio e colágeno em diferentes partes do órgão (FECHINE; TROMPIERI, 2015). No caso das mulheres que passaram pelo processo da menopausa, há relatos do surgimento de doenças

cardiovasculares, que, no entanto, não são comprovadamente relacionados. Acredita-se que tais eventos estejam relacionados com toda a alteração hormonal experienciada, já que é o fator mais marcante deste processo e a ocorrência de patologias cardíacas é muito maior após essa etapa (APPIAH et al., 2016).

Apesar de ser esperado que o processo de menopausa acometa mulheres com idade mais avançada, pode se desenvolver mais cedo, podendo ser de causa natural ou induzida, seja por meio medicamentoso (ex.: quimioterapia) ou cirúrgico. No entanto, independente da causa, a mulher que experimenta a deficiência de estrógeno em idade prematura fica sujeita a maiores riscos de mortalidade e morbidade. Caso a reposição hormonal não seja realizada, há também aumento nos riscos de acidentes vasculares cardíacos. Além disso, existem outros riscos que se apresentam a longo prazo, tais como: osteoporose, disfunção psicosssexual e doenças neurológicas (SHUSTER et al., 2010; WELLONS et al., 2012). As causas naturais para uma falência ovariana precoce são desconhecidas. Geralmente se mostra de modo idiopático, mas também pode derivar de causas genéticas, infecções, síndromes, desordens enzimáticas, hábitos fumantes e drogas (OKEKE; ANYAEHIE; EZENYEAKU, 2013).

A menopausa precoce pode apresentar sintomas a curto ou longo prazo. Em um primeiro momento, a mulher pode apresentar com sintomas vasomotores, como: ondas de calor, suores noturnos, palpitações e dores de cabeça, ganho de peso, problemas urogenitais e psicossomáticos. A longo prazo, os sintomas incluem infertilidade, osteoporose, morte precoce, doenças cardiovasculares e derrame. Apesar de o tratamento mais utilizado ser a reposição hormonal, ele não é sempre recomendado, como em casos de câncer (DANIELS; MAISEL, 2007; OKEKE; ANYAEHIE; EZENYEAKU, 2013).

1.3.Exercício Físico

O exercício físico se baseia na repetição sistemática de movimentos coordenados e tem a finalidade de manter ou aprimorar o condicionamento. A atividade leva a maior demanda muscular, que por sua vez gera maior consumo de oxigênio. Este quadro desencadeia reações fisiológicas a fim de manter a homeostase celular, frente a maior demanda corporal, gerando alterações sistêmicas no organismo (MONTEIRO; FILHO, 2004; PETRINI et al., 2015).

Atualmente, as atividades físicas têm sido utilizadas também como um método não farmacológico de combate a doenças, dentre elas, as cardiovasculares. É importante também ressaltar seus efeitos durante o envelhecimento, já que se realizado antes ou durante o processo, tem a capacidade de gerar modificações metabólicas e na mobilidade física geral, o que faz-se

presumir que sua prática regular possa amenizar o declínio funcional advindo do envelhecimento, atenuando seu processo degenerativo (PETRINI et al., 2015; WANG et al., 2015).

O efeito cardioprotetor dos exercícios não se resume apenas a redução dos fatores de risco cardiovasculares, mas também à melhora da capacidade antioxidante, viabilidade mitocondrial e crescimento cardíaco fisiológico ativo mediado por mecanismos celulares e moleculares distintos daqueles para hipertrofia patológica (WANG et al., 2015).

O impacto do exercício físico na vida do indivíduo depende diretamente de sua intensidade e duração. No caso do sistema cardiovascular, os que mais geram modificações são os exercícios aeróbicos, como exemplo a natação, sendo evidenciado pela diminuição da frequência cardíaca e pressão arterial. Além disso, os categorizados como de baixa intensidade têm efeitos na redução da resistência vascular periférica, demarcado pela atenuação da vasoconstrição, ampliação da função endotelial e das alterações estruturais da microcirculação (PETRINI et al., 2015).

Os exercícios aeróbicos têm sido recomendados para pacientes hipertensos devido a seu efeito hipotensor e cardioprotetor. Quando praticados em baixa ou moderada intensidade, são capazes de reduzir os valores pressóricos em uma única sessão, se comparados aos parâmetros pré-treino. A natação tem vantagens, pois o treinamento é realizado em imersão, capaz de diminuir o aumento da pressão sanguínea e frequência cardíaca, diferente de outros métodos praticados no solo, mesmo que para consumo de oxigênio equivalente. Além disso, ocorre aumento dos níveis de ANP circulantes no sangue e redução de renina e angiotensina. No entanto, é importante ressaltar que apenas a imersão não promove os mesmos efeitos (COSTA et al., 2017).

Ademais, o exercício físico pode ser utilizado como uma ferramenta para prevenir o stress oxidativo e o controle barorreflexo da circulação associado ao hipoestrogenismo, prevenindo o aparecimento de doenças crônicas nesta condição, mas é necessária maior investigação em modelos experimentais, frente a patologias como hipertensão, diabetes e infarto do miocárdio (IRIGOYEN et al., 2005)

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo consistiu em analisar e descrever os aspectos morfo-quantitativo ultraestruturais dos grânulos de peptídeos natriuréticos atriais (PNA) de ratas *Wistar* ovariectomizadas submetidas ao protocolo de treinamento aquático.

2.1.Objetivos Específicos

- Descrever os aspectos gerais dos cardiomiócitos do átrio esquerdo e a organização dos grânulos de PNA nos diferentes modelos experimentais;
- Realizar análise morfométrica do diâmetro dos grânulos de PNA;
- Realizar análise morfométrica da área dos grânulos de PNA;
- Mensurar a densidade (nº/área) dos grânulos de PNA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

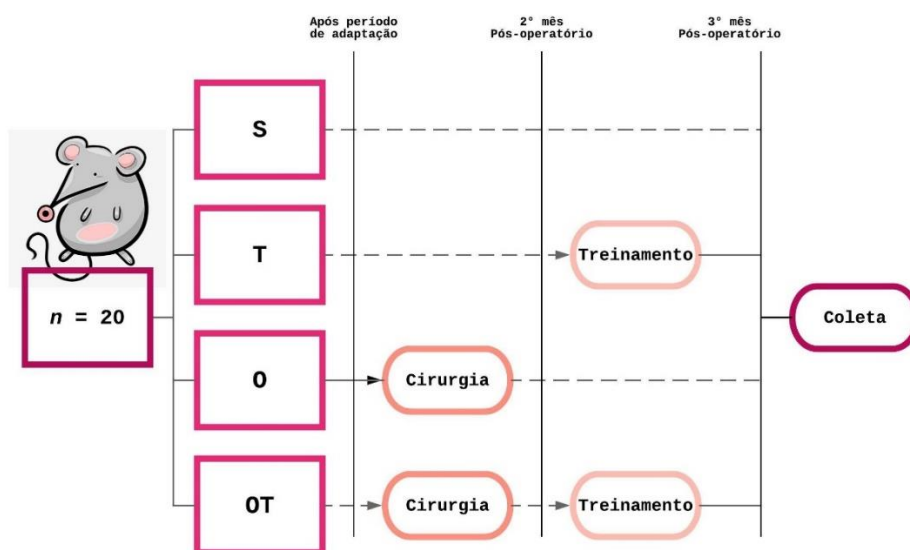
3.1. Animais

Foram utilizadas 20 ratas *Wistar* jovens (90 dias de idade) divididas aleatoriamente em 4 grupos (n=5):

- **Sedentário (S)**: grupo em que os animais não foram submetidos a nenhum protocolo;
- **Treinado (T)**: animais submetidos somente ao treinamento de natação;
- **Ovariectomia (O)**: animais submetidos apenas ao procedimento cirúrgico - ovariectomia;
- **Ovariectomia/Treinado (OT)**: animais submetidos ao treinamento de natação e a ovariectomia.

Os animais foram obtidos do Biotério Central da UNESP – Campus de Botucatu e alocados em 5 ratas por gaiola, no Biotério do Laboratório de Morfologia e Atividade Física do Departamento de Educação Física do Instituto de Biociências da UNESP – Campus Rio Claro. A temperatura era controlada à 23 ± 2 °C em períodos claros/escuro de 12 horas e todas alimentadas com ração e água a vontade (“*ad libitum*”). Todos os procedimentos descritos neste trabalho foram aprovados ao CEUA do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – Campus Rio Claro - SP N° 4259.

Figura 1. Organograma de protocolos experimentais.



Fonte: Elaborado pelo autor.

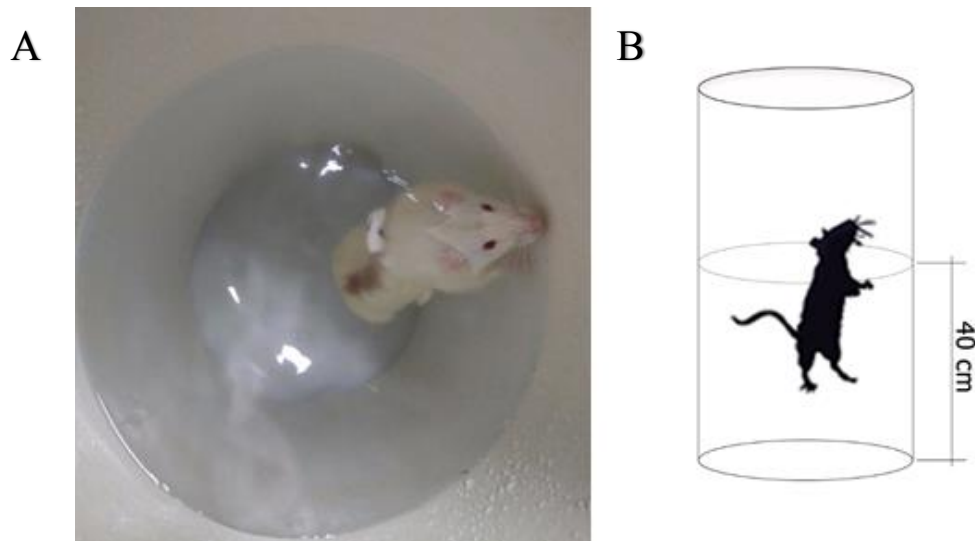
3.2.Processo Cirúrgico – Ovariectomia

Os animais dos grupos OT e O foram anestesiados com Ketamina (50mg/Kg) e Xilazina (10mg/Kg) e posteriormente submetidos a técnica de tricotomia e assepsia da região ventral do abdômen. Com o uso de um bisturi, a parede abdominal foi seccionada através de uma incisura longitudinal expondo os ovários para serem dissecados. A seguir, suturou-se desde a parede muscular até o cutâneo com linha de sutura de nylon nº 6.0, e fez-se assepsia local 3 vezes ao dia por 7 dias. Após o procedimento operatório os animais foram medicados por 4 dias com Paracetamol (300mg/Kg) e alocados em gaiolas limpas (FERRETTI et al., 2014).

3.3.Protocolo de Treinamento

Após a chegada dos animais, estes foram submetidos a um período de adaptação de 10 dias a fim de que se adaptassem ao novo ambiente, rotina e acomodações. A seguir os grupos O e OT passaram pelo procedimento de ovariectomia e foram sujeitos a 1 mês de recuperação pós – cirúrgica, a qual foi acompanhada pelos demais grupos, para que todos iniciassem o protocolo de treinamento ao mesmo tempo. Posteriormente, os grupos T e OT, iniciaram o treinamento aquático (natação) em tanques retangulares. As ratas foram individualmente separadas por tubos de PVC (cloreto de polivinila), com dimensões 24x50 cm, para que não ocorresse aglomeração e dispersão, imersas à 40 cm de água aquecida a 31°C (PESTANA et al., 2012). Os animais foram pesados semanalmente em uma balança semi-analítica ao longo de todo o experimento para a avaliação da massa corporal, o que também auxiliou na manutenção das sobrecargas que foram presas a eles. Estas eram pesos de chumbo, fixados ao tórax, equivalentes a 5% da massa corporal, os quais eram aferidos e corrigidos semanalmente. Foram realizadas 5 sessões semanais com duração de 60 minutos cada, por um período de 4 semanas, em um total de 20 sessões (CIABATTARI; DAL PAI; DAL PAI, 2005).

Figura 2. Demonstração do Treinamento de Natação.



Legenda: A – Treinamento individual de natação (tubo de PVC). B – Diagrama demonstrativo para posicionamento das ratas durante o protocolo de exercício físico.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.4. Microscopia Eletrônica De Transmissão

Foram utilizados cinco animais de cada grupo. Estes foram eutanasiados em câmara de dióxido de carbono (CO_2 durante 5 minutos) e então dissecavam-se as amostras do átrio esquerdo. Estas foram imersas em solução de Cacodilato de sódio a 0.1M, pH 7.4), durante 48 horas à 4°C. Em seguida, as amostras foram pós-fixadas com solução de tetróxido de ósmio a 1% durante 2 horas, à 4°C (CIENA et al., 2010), lavadas com solução salina 0,9% por três vezes e fixadas com a solução de Acetato de Uranila à 0.5% durante 12 horas, à temperatura ambiente e na ausência de luminosidade. Depois, foram submetidas a desidratação em série crescente de álcoois a partir do 70%, 80%, 90% e 95% (1x), álcool etílico absoluto (4x) com banhos de 15 minutos cada, e em Óxido de Propileno (2x) por 15 minutos. Após a desidratação as amostras permaneceram 1 hora em uma mistura de resina (Low Viscosity Embedding Media Spurr's Kit Electron Microscopy Sciences, USA) e Óxido de Propileno na proporção de 1:1, sob agitação, em temperatura ambiente. Posteriormente, a resina novamente foi trocada para proporção de 3:1 durante 1 hora e 30 minutos, depois em resina pura durante 12 horas em temperatura ambiente com ausência de luminosidade. Após essa etapa as amostras foram aquecidas por 1 hora em estufa a 37°C, com frasco aberto para total evaporação de líquidos das amostras.

Na inclusão das amostras em moldes retangulares de silicone, estes eram preenchidos por resina pura e mantidos por 3 dias em estufa a 60°C para concretizar-se a polimerização do

bloco. Os blocos foram trimados para a realização de cortes semifinos de 10µm em ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT, Germany), e corados com o método de azul de toluidina 1%. As imagens foram obtidas por meio do fotomicroscópio Carl Zeiss Microimaging (Axiokop 40, Göttingen, Alemanha). Após selecionada a área de interesse, foram realizados cortes ultrafinos de 60 nanômetros em ultramicrotomo, que eram coletados em telas de cobre de 200 “mesh” (Sigma-Aldrich, USA) e, contrastados com a solução de acetato de uralina à 4%, por 3 minutos, lavados em água destilada, contrastados em solução aquosa de citrato de chumbo à 0.4% por 3 minutos e lavados em seguida com água destilada (CIENA et al., 2012). As telas foram examinadas através do microscópio eletrônico de transmissão Philips CM 100, laboratório de microscopia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista-UNESP, campus de Rio Claro - SP.

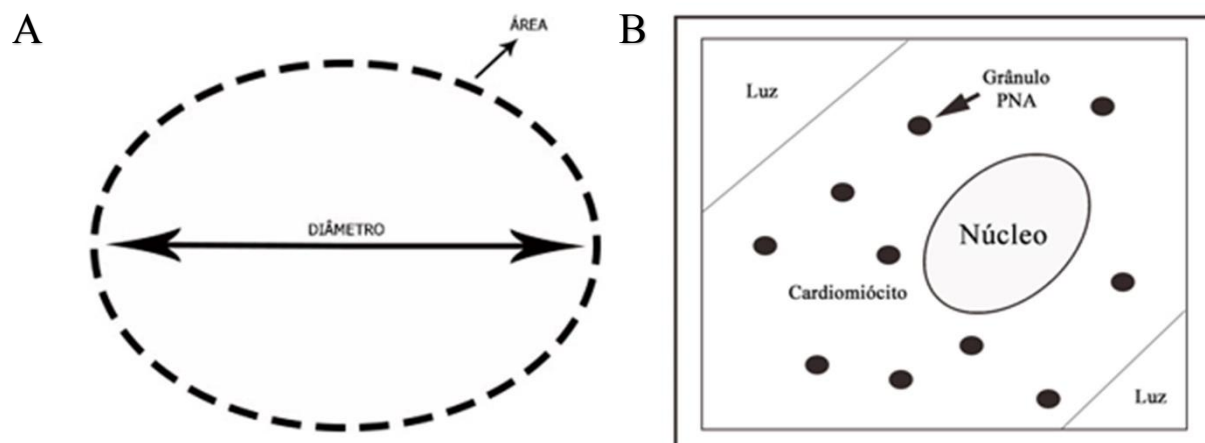
3.5.Morfometria

A análise morfométrica consistiu em quantificação da densidade de grânulos de PNA por área da imagem e a mensuração de sua área e diâmetro, de modo que foi obtida uma média destes dados em todas as microscopias analisadas por grupo. Isso ocorreu com o auxílio dos softwares de morfometria e análise estatística.

Na ferramenta ImageJ®, foi utilizado $n = 10$ de microscopias selecionadas aleatoriamente para a realização da morfometria, que consistia na mensuração da área e diâmetro dos grânulos de PNA, com as ferramentas “Polygon” e “Straight”, respectivamente, e a quantificação de grânulos por área, em que os grânulos eram enumerados em imagens com área aproximada de $2,8 \times 10^{-8} \text{ nm}^2$, com a ferramenta “Multi-point”. Em seguida estes dados eram então transferidos para uma planilha, de onde obtinha-se média aritmética e desvio padrão. Para os cálculos referentes a área e diâmetro, $n = 100$, e para densidade $n = 10$.

Com estes elementos (n, desvio padrão e média), foi realizado o teste ANOVA one-way e pós-teste de Tukey no software GraphPad Prism®. O nível adotado de significância adotado $p < 0,05$.

Figura 3. Diagrama de análise a partir do software Image J®.



Legenda: A – Imagem demonstrando parâmetros medidos: seta maior representa diâmetro e seta menor a área. B – Representação de microscopia de cardiomiócito, evidenciando os grânulos de PNA que foram enumerados e mensurados.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4. RESULTADOS

A partir das imagens obtidas com o método de microscopia eletrônica de transmissão, foi possível realizar análises quantitativas e qualitativas referentes a área, diâmetro e densidade por área dos grânulos de PNA. Estas mostraram que tanto o protocolo de treinamento, quanto o de ovariectomia, causam a diminuição em área e diâmetro dos grânulos. No entanto, o treinamento é capaz de diminuir a quantidade de grânulos por área, mas quando realizado em conjunto a ovariectomia, pode gerar um aumento neste fator.

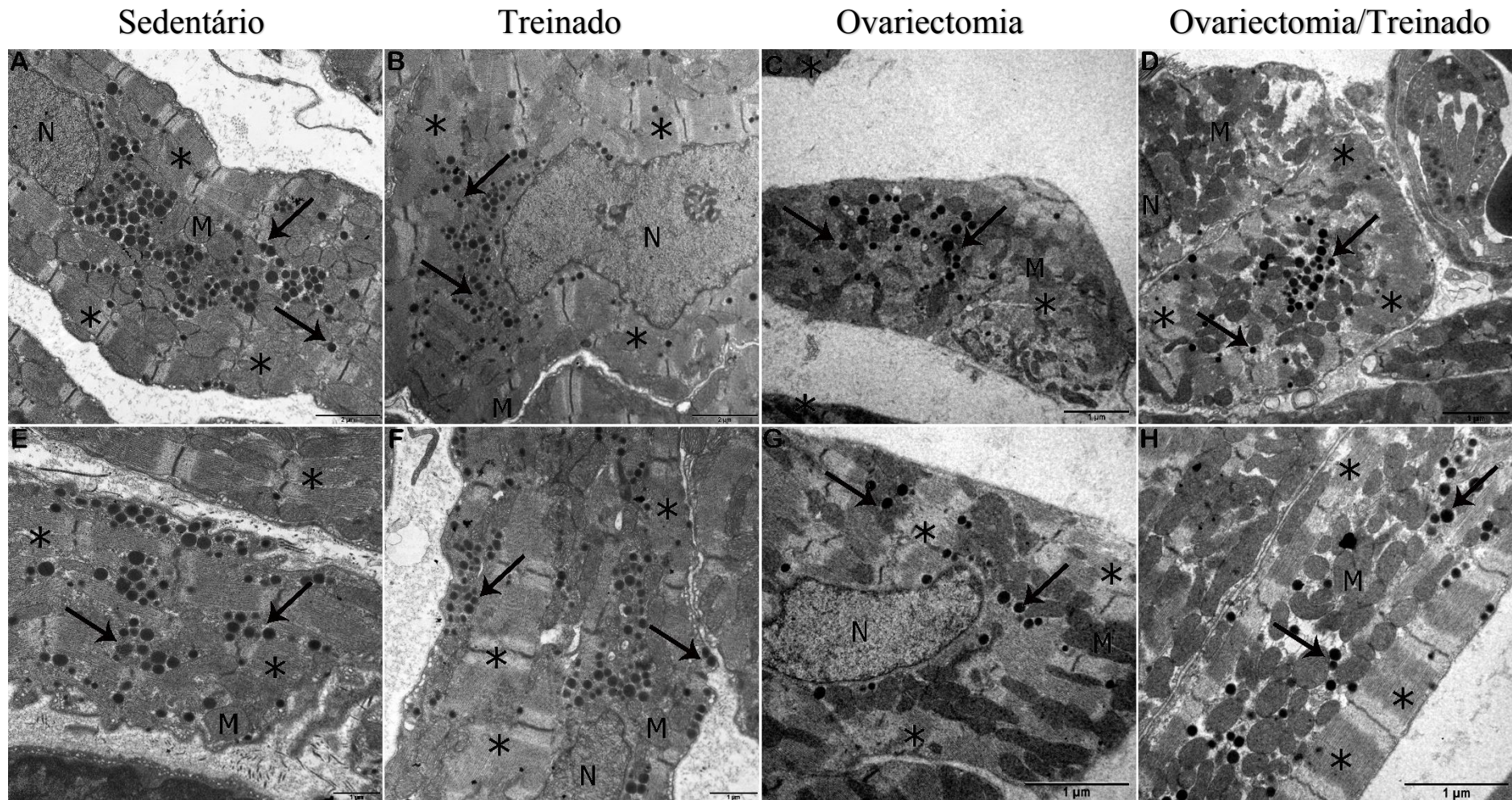
No grupo S os aspectos ultraestruturais dos cardiomiócitos mostraram que os grânulos de peptídeos natriuréticos atriais (PNA) possuem aspecto ovalar, com variações relativas em sua área e estão distribuídos de maneira aleatória entre grupamentos mitocondriais, que apresentam amplas variações em diâmetro, mas seguem o mesmo padrão arredondado. No entanto, não foi possível notar um modelo de disposição, já que se mostram em sua maioria ligeiramente agrupados ou, com menor frequência, totalmente dispersos. (figs. A, E)

No grupo T, os mesmos aspectos são visualizados, não sendo observada maiores diferenças em sua forma ovalar, exceto pela leve diminuição em valores de diâmetro. Foi possível notar que os grânulos estão dispostos de maneira adjacente ao núcleo, localizado centralmente no cardiomiócito, obedecendo a mesma distribuição descrita anteriormente (figs. A, E). No entanto, nota-se que os grupamentos são compostos por um maior número de grânulos e poucos se encontram dispersos (figs. B, F). Ademais, as mitocôndrias referentes a este grupo mantêm seu aspecto arredondado e despadronização em tamanho.

No grupo O (figs. C, G), foi notado diminuição acentuada nos grânulos de PNA, quando comparado aos grupos S e T. Não há mudança em seu aspecto ovalar, mas foi possível observar que existe uma quantidade inferior de grânulos dispostos próximos ao núcleo, quando comparado aos demais grupos, e não é clara a formação de grupamentos. As mitocôndrias, dispostas em todo o cardiomiócito, evidenciam um aspecto maior e mais alongado, além de maior quantidade, se comparado a S e T.

No Grupo OT (figs. D, H), notou-se que o diâmetro geral dos grânulos diminui pouco em relação ao grupo O, mas preservam seu aspecto ovalar e distribuição não uniforme, com grupamentos, mas também com grânulos solitários. Além disso, nota-se um aumento no número das mitocôndrias, mas estas evidenciam tamanho inferior e um formato mais arredondado em relação ao grupo descrito anteriormente.

Figura 4. Microscopia eletrônica de transmissão dos grânulos de PNA do átrio esquerdo dos Grupos.



Legenda: (*) cardiomiócitos, (setas) grânulos de PNA, (N) núcleo, (M) mitocôndria. Barras: 2 μm (A, B) e 1 μm (C, D, E, F, G, H).

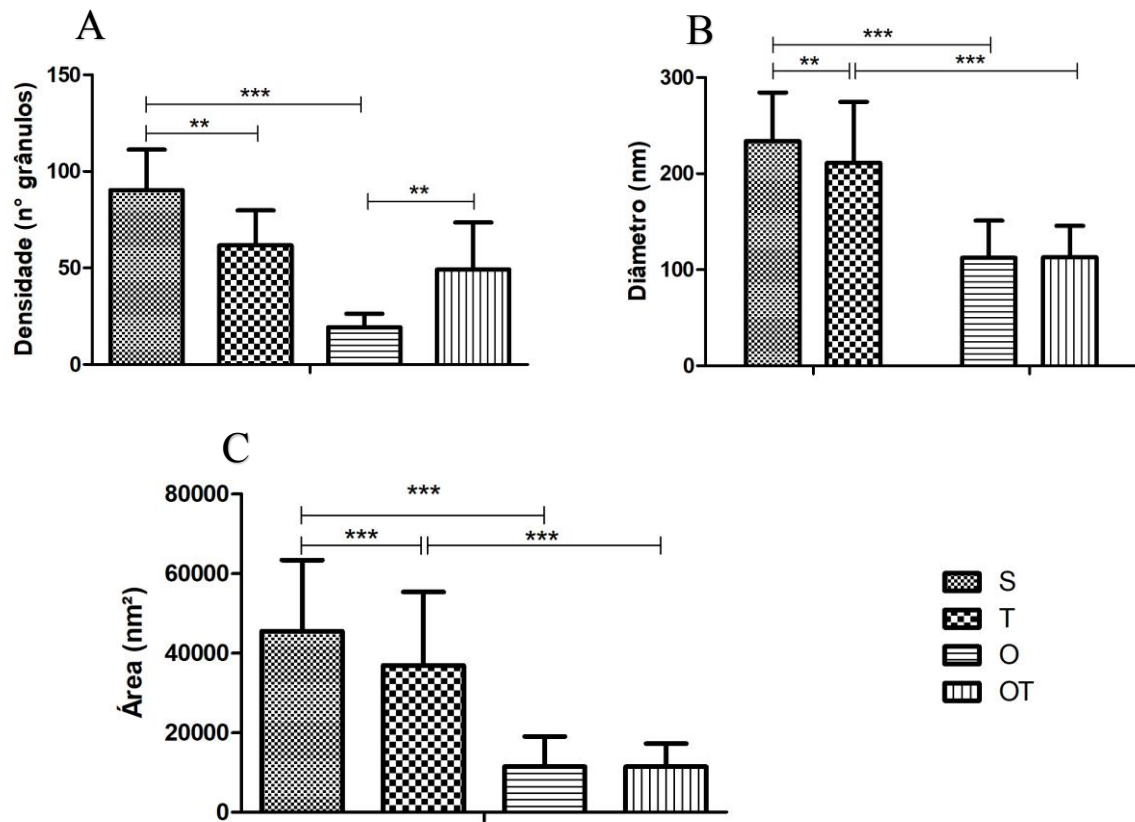
Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise quantitativa, realizada a partir da comparação estatística dos dados de morfometria, corroboram o que fora observado na análise qualitativa, e é possível observar o mesmo padrão de alterações para ambas as medidas. O grupo S apresentou os maiores valores morfométricos de área e diâmetro, seguido do grupo T, grupo O e grupo OT, apesar da diferença entre os dois últimos grupos não ser significativa ($p>0,05$). Também em relação a quantidade de grânulos por área, o grupo S apresentou os maiores valores, seguido do grupo T, OT e O.

O grupo S, sendo o controle, demonstra os dados de um sistema sem interferências. Seus valores, tanto para área quanto diâmetro, foram os mais altos. Ao comparar com o grupo T, que passou somente pelo treinamento aquático, é possível notar diminuição significativa para área de 18,8% ($p<0,001$) e para diâmetro de 9,7% ($p<0,01$). Também houve diminuição na densidade dos grânulos, que tiveram uma queda de 31,7% ($p<0,01$). No entanto, seus dados não apresentaram significância estatística em relação ao grupo OT.

O grupo O, comparado ao grupo S, reduziu área em 74,8% ($p<0,001$) e diâmetro em 51,9% ($p<0,001$). No entanto, quando comparado ao grupo OT, não houve significância estatística ($p>0,05$), como também observado ao comparar com grupo S, ao revelar diminuição da área em 74,8% e 51,7% do diâmetro. No entanto, o grupo OT teve aumento da densidade em 54,9% ($p<0,01$) em relação a grupo O.

Figura 5. Média e desvio padrão de densidade, diâmetro e área dos grânulos de PNA.



Legenda: Médias e desvio-padrões da densidade (A), diâmetro (B) e área (C) dos grânulos de PNA dos Grupos Sedentário (S), Treinado (T), Ovariectomia (O) e Ovariectomia/Treinado (OT). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo permitiram analisar e descrever os efeitos morfoquantitativos e ultraestruturais dos grânulos de PNA, frente aos protocolos de treinamento aquático e modelo experimental de menopausa.

O treinamento de natação desencadeou a diminuição das medidas dos grânulos de PNA. O exercício físico promove muitos efeitos benéficos ao corpo, tais como regulação da homeostase e controle e prevenção de doenças e no caso do sistema cardiovascular, o mais recomendado são exercícios aeróbicos regulares, como a natação, devido a redução da resistência vascular periférica (PETRINI et al., 2015). No entanto, os exercícios físicos de alta intensidade ou realizados por adolescentes e mulheres de modo recreacional, podem levar a sintomas como a amenorreia, distúrbios alimentares e osteoporose, que caracterizam a tríade da mulher atleta. Há hipóteses de que os níveis de endorfinas liberados durante o exercício desenvolvem a inibição do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo, o que leva a inibição de todo o eixo hipotálamo-hipófise-ovários- útero, desregulando a produção de hormônios sexuais. A dopamina possui efeito inibitório da prolactina e devido a atividade física, teria seus níveis aumentados, também afetando o hormônio GnRH (PARDINI, 2001; LEITÃO et al., 2000). Ademais, a revisão de Pearson, King e Smart (2018), também mostram que diferentes protocolos de exercício físico promoveram a diminuição de MR-proANP, um precursor deste hormônio. Esses fatos podem justificar os dados observados neste estudo, em que o grupo T apresenta os valores de área, diâmetro e densidade inferiores ao grupo S, ou seja, a atividade física levou a um nível inibição dos hormônios sexuais responsável por afetar a produção de PNA.

Outra possibilidade é que o treinamento de natação possa ter influenciado na homeostase do sistema cardiovascular, o que levou a maior liberação dos PNA'S e causou a diminuição dos grânulos. Por estar em um sistema de equilíbrio, não houve necessidade de uma maior demanda de grânulos para que existisse grande quantidade disponível deste hormônio. Segundo o trabalho de Vardar et al. (2015), o exercício físico aumenta os níveis circulantes de PNA no sangue. É importante ressaltar que o protocolo adotado foi diferente, pois o modelo experimental foi submetido a atividades aeróbicas em esteira com administração intravenosa de PNA.

Após o procedimento de ovariectomia foi desencadeada a diminuição da área, diâmetro e densidade de grânulos. Tais achados corroboram as descrições de Souza et al. (2014), em que se utilizaram de metodologia similar para analisar o efeito da ovariectomia em camundongos

jovens. Ao notar que este procedimento gera a diminuição do tamanho dos grânulos, associou este cenário à ausência de estrógeno, um hormônio que age como um possível modulador e, que em sua ausência, leva ao declínio de PNA circulante. No entanto, ressalta que as alterações encontradas com os grânulos de peptídeos natriuréticos podem explicar o porquê de apesar de haverem tratamentos de reposição hormonal, a pressão sanguínea de mulheres após a menopausa se mantêm altas. Isso supostamente se deve à associação a outros hormônios sexuais não inclusos ao tratamento, tais como o estradiol, que também teria efeito sobre os PNA's e o sistema renina-angiotensina, o que perpetua o quadro de hipertensão. O estudo de Komukai, Mochizuki e Yoshimura (2010) também aponta que a ovariectomia é responsável por diminuir a quantidade de PNA circulante no plasma sanguíneo, mas que podem ser normalizados com a terapia de reposição hormonal.

É importante ressaltar que o treinamento em animais ovariectomizados gerou um leve aumento na área e diâmetro dos grânulos em relação ao grupo ovariectomizado. Ademais, na análise de densidade de grânulos por área entre os grupos T e OT, é possível que o treinamento físico tende a normalizar a quantidade de grânulos frente ao procedimento de ovariectomia

Em análises de mRNA de PNA, foram observadas semelhanças quanto aos dados de grupos sedentários e ovariectomizados, ou seja, a ovariectomia provoca diminuição significativa na produção de PNA's, o que sua modulação com os hormônios ovarianos. No entanto, os gráficos mostram dados divergentes: um camundongo não ovariectomizado submetido ao protocolo de treinamento obtém valores de produção de mRNA mais baixos que um ovariectomizado submetido ao treinamento (GUTKOWSKA et al., 2007). Apesar disto, em suma ambos mostram que o treinamento físico exerce um efeito de recuperação frente a ovariectomia e supõe-se que isso possa ter ocorrido devido a diferença de treinamento utilizado.

Segundo a revisão de Costa et al. (2017), o treinamento aquático promove o aumento da natriurese e diurese, assim como os níveis circulantes de PNA, proporcionado pela hipervolemia central, retorno venoso, distensão e débito cardíaco. Já os hormônios ADH, aldosterona e renina têm suas concentrações reduzidas e este quadro poderia variar com a profundidade de imersão, modalidade de exercício, posturas adotadas e temperatura da água. Essas informações corroboram que o protocolo de natação exerceu efeito benéfico sobre os animais do grupo OT, levando ao aumento da densidade dos grânulos, apesar destes não terem alcançado aumento em área e diâmetro, que pode indicar maior liberação deste hormônio no sangue.

6. CONCLUSÃO

Concluiu-se que o modelo experimental de menopausa resulta em drásticas alterações nos grânulos de peptídeos natriuréticos atriais e, após a intervenção do treinamento de natação foi promovido o aumento da densidade dos grânulos nos cardiomiócitos.

REFERÊNCIAS

- APPIAH, D. et al. Association of Age at Menopause with Incident Heart Failure: A Propective Cohort Study ant Meta-Analysis. **Journal of the American Heart Association**, v. 5, n. 8, 2016.
- CANCELA, D. M. G. **O processo de envelhecimento**. Universidade Lusiada do Porto. [S.l.]. 2007.
- CIABATTARI, O.; DAL PAI, A.; DAL PAI, V. Efeito da natação associado a diferentes dietas sobre o músculo tibial anterior do rato: estudo morfológico e histoquímico. **Revista Brasileira Medicina do Esporte**, v. 11, n. 12, 2005.
- CIENA, A. P. et al. Ultrastructure of the myotendinous junction of the medial pterygoid muscle of adult and aged Wistar rats. **Micron**, v. 41, n. 8, p. 1011-1014, 2010.
- CIENA, A. P. et al. Ultrastructural Features of the Myotendinous Junctions of the Sternomastoid Muscle in Wistar Rats: From Newborn to aging. **Microscopy Research Technique**, v. 75, p. 1292-1296, 2012.
- COSTA, J. A. et al. Efeito dos exercícios aquáticos na pressão arterial em hipertensas: uma revisão sistemática. **ConScientiae Saúde**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 145-152, 2017. ISSN DOI:10.5585.
- DANIELS, L. B.; MAISEL, A.. Natriuretic Peptides. **American College of Cardiology**, San Diego, California, v. 50, n. 25, p. 2357-68, dezembro 2007. ISSN DOI:10.1016/j.jacc.2007.09.021.
- FECHINE, B. R. A.; TROMPIERI, N. O processo de envelhecimento: as principais alterações que acontecem com o idoso com o passar dos anos. **InterSciencePlace**, v. 1, n. 20, 2015.
- FERRETTI, M. et al. Ferutinin dose-dependent effects on uterus and mammary gland in ovariectomized rats. **Histology and Histopathology**, v. 29, p. 1027-1037, 2014.
- FLUES, K. et al. Exercise training associated with estrogen therapy induced cardiovascular benefits after ovarian hormones deprivation. **Elsevier**, v. 65, p. 267-271, 2010. ISSN DOI:10.1016/j.maturitas.2009.11.007.
- GUTKOWSKA et al. Effect of exercise training on cardiac oxytocin and natriuretic peptide systems in ovariectomized rats. **american journal of physiology**, v. 293, p. 267-275, May 2 2007. ISSN DOI:10.1152/ajpregu.00071.2007.
- IRIGOYEN, M.-C. et al. Exercise Training Improves Baroreflex Sensitivity Associated With Oxidative Stress Reduction in Ovariectomized Rats. **American Heart Association**, v. 46, n. 2, p. 998-1003, 2005. ISSN DOI: 10.1161/01.HYP.0000176238.90688.6b.

KOMUKAI, K.; MOCHIZUKI, S; YOSHIMURA, M. Gender and the renin–angiotensin–aldosterone system. **Fundaments & Clinical Pharmacology**, Tokyo, v. 24, p. 687-698, 2010. ISSN DOI: 10.1111/j.1472-8206.2010.00854.x.

LAVEN, J. S. et al. Menopause: Genome stability as new paradigm. **Maturitas**, v. 92, p. 15-23, 2016.

LEITÃO, B. et al. Posicionamento Oficial da Sociedade Brasileira de Medicina do Esporte: Atividade Física e Saúde na Mulher. **Revista Brasileira Medicina do Esporte**, v. 6, n. 6, nov/dez 2000.

LÓPEZ-OTÍN, C. et al. The hallmarks of aging. **Cell**, 2013. ISSN 153:1194-1217.

MENDELSON, M. E. Protective effects of estrogen on the cardiovascular system. **American Journal of Cardiology**, v. 89, n. 12, p. 12-17, 2002.

MONTEIRO, M. D. F.; FILHO, D. C. S. Exercício Físico e o controle da pressão arterial. **Revista Brasileira Medicina do Esporte**, p. 513-519, 2004.

OKEKE, T. C.; ANYAEHIE, U. B.; EZENYEAKU, C. C. Premature menopause. **annals of medical and health sciences research**, v. 3, n. 1, janeiro-março 2013. ISSN DOI: 10.4103/141-9248.109458.

OLIVEIRA, M. H. A. et al. Atrial natriuretic peptide and feeding activity patterns in rats. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 30, n. 4, p. 465-469, 1997. ISSN 0100-879X.

PARDINI, D. P. Alterações Hormonais da Mulher Atleta. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, n. 4, p. 343-351, 2001.

PEARSON, M. J.; KING, N.; SMART, N. A. Effect of exercise therapy on established and emerging circulating biomarkers in patients with heart failure: a systematic review and meta-analysis. **Open Heart**, v. 819, n. 5, 2018. ISSN DOI:10.1136.

PESTANA, P. R. D. et al. Efeito da natação na expressã de fatores regulatórios miogênicos durante o reparo do músculo esquelético de rato. **Revista Brasileira Medicina do Esporte**, v. 18, n. 6, 2012.

PETRINI, A. C. et al. Treinamento aquático em longo prazo desencadeia alterações elétricas positivas e outros parâmetros em ratas adultas. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 22, n. 4, p. 370-377, 2015.

RUBATTU, S.; SCIARRETTA, S.; VOLPE, M. Atrial natriuretic peptide gene variants and circulating levels: implications in cardiovascular diseases. **Clinical Science**, v. 127, p. 1-13, 2014. ISSN DOI: 10.1042/CS20130427.

SHUSTER, L. T. et al. Premature menopause or early menopause: Long-term health consequences. **Elsevier**, Ireland, 2010. 161–166.

SILVA, A. C. S.; PINHEIRO, V. B.; SANTOS, R. A. S. Peptídeos e interação coração-rim. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 15, n. 3, p. 134-143, 2008.

SORPRESO, I. C. E. et al. Female aging. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 61, n. 6, p. 553-556, 2015.

SOUSA, C. M. **Receptores de membrana para peptídeos natriuréticos em corpos cavernosos humanos: aspectos moleculares e funcionais**. Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza. 2008.

SOUZA, R. et al. Effects of ovariectomy on the secretory apparatus in the right atrial cardiomyocytes of middle-aged mice. **Clinics**, v. 69, n. 8, p. 554-558, 2014.

TSAI, E.-M. et al. Atrial natriuretic peptide inhibits ovarian functions in female mice. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 119, n. 2, p. 215-218, 2005.

VARDAR, S. A. et al. Hemodynamic effects of atrial natriuretic peptide in ischemia-reperfusion injury that occurs after exercise. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 45, p. 298-305, 2015. ISSN DOI:10.3906.

WANG, H. et al. Exercise prevents cardiac injury and improves mitochondrial biogenesis in advanced diabetic cardiomyopathy with PCG-1 α and Akt activation. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 6, p. 2159-2168, 2015.

WELLONS, M. et al. Early Menopause Predicts Future Coronary Heart Disease and. **Menopause**, New York, v. 19, n. 10, p. 1081–1087, october 2012. ISSN DOI: 10.1097/gme.0b013e3182517bd0.

WONG, P. C. Y.; GUO, J.; ZHANG, A. The renal and cardiovascular effects of natriuretic peptides. **Advances in physiology education**, v. 41, n. 2, p. 179-185, 2017.

WOODARD, G. E.; ROSADO, J. A. Recente advances in natriuretic peptide research. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 11, n. 6, p. 1263-1271, 2007.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa com Animais



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Rio Claro

COMISSÃO DE ÉTICA
NO USO DE ANIMAL
CEUA – IB – UNESP - CRC

DECISÃO CEUA Nº 10/2015

Instituição: UNESP – IB – CRC	Departamento: Educação Física
Data de Registro CEUA: 14.05.15	
CERTIFICADO	
Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Características morfológicas cardíacas de ratas ovariectomizadas submetidas ao treinamento físico", protocolo nº 4259, sob responsabilidade de Adriano Polican Ciena (Pesquisador Responsável) e Mariana Garcia Ferreira Silva (Orientanda) , que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 1676.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).	
Subprojeto(s) vinculado(s): ==.==	

Colaboradores:

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Rio Claro, em sua **24ª reunião ordinária**, realizada em **17/06/15**.

☒ (X)	Aprovou o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
☐ ()	Desde que atendidas as pendências apontadas na reunião (vide anexo), aprova o Projeto de Pesquisa acima citado (prazo máximo de 30 dias).
☐ ()	Referendou o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
☐ ()	Aprovou retornar ao interessado para atendimento das pendências encontradas (prazo máximo de 30 dias).
☐ ()	Não Aprovou .
☐ ()	Retirou , devido à permanência das pendências.

Vigência do Projeto: 13/07/15 a 12/02/2016
Espécie/linhagem: Rattus Norvegicus (ratos wistar) Número de animais: 40
Peso: 220 gramas Idade: 90 dias Sexo: fêmea
Origem dos animais (Informações sobre o fornecedor): Biotério de Botucatu- UNESP

Objetivo Acadêmico:	☐ () TCC ☐ () Mestrado ☐ () Doutorado ☒ (X) Outros – (Iniciação Científica)
---------------------	--

Rio Claro, 18/06/2015

Prof. Dr. José Paulo Leite Guadanucci
Coordenador

Mariana G. F. Silva

ANEXO B – Certificado de Participação em Congresso (CIC)



Certificamos que o trabalho intitulado "Análise ultraestrutural dos peptídeos natriuréticos atriais em ratas Wistar idosas ovariectomizadas submetidas ao treinamento de natação" foi apresentado na 1ª fase do XXIX Congresso de Iniciação Científica da Unesp, na cidade de Rio Claro - SP, no período de 27 e 28 de setembro de 2017, por Luana Martins Ferraz, na forma Oral, orientada pelo Prof. Adriano Polican Ciena.

Rio Claro, 28 de setembro de 2017

Prof. Dr. Carlos Frederico de Oliveira Graeff
Pró-Reitor de Pesquisa

Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo
Coordenadora Executiva do CIC

unesp

ANEXO C – Certificado de Seleção para 2º Fase CIC

XXIX Congresso de Iniciação
Científica da Unesp

CERTIFICADO

O trabalho do(a) acadêmico(a) **LUANA MARTINS FERRAZ** sob orientação do(a) Prof(a). Dr(a). **ADRIANO POLICAN CIENA** foi selecionado na 1ª fase do XXIX CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, na cidade de Rio Claro, realizada no período de 27 a 28 de setembro de 2017 para participar da 2ª fase do Congresso que será realizada em Bauru, nos dias 22 e 23 de novembro de 2017.

Rio Claro, setembro de 2017.

Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo
Coordenadora Executiva do CIC

Luana Martins Ferraz
Graduanda

Profº Adriano Polican Ciena
Orientador