

FACULDADE DE MEDICINA DE MARÍLIA

JULIANA EDWIGES MARTINEZ

**ESTUDO DOS EFEITOS DO EXERCÍCIO CONTÍNUO E  
ACUMULADO SOBRE A FUNÇÃO ENDOTELIAL EM RATOS**

MARÍLIA

2015

Juliana Edwiges Martinez

Estudo dos efeitos do exercício contínuo e acumulado sobre a função endotelial em ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Acadêmico em “Saúde e Envelhecimento”, da Faculdade de Medicina de Marília, para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Saúde e Envelhecimento.

Orientador: Prof. Dr. Agnaldo Bruno Chies.

Marília

2015

Autorizo a reprodução parcial ou total deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Famema.

M385e    Martinez, Juliana Edwiges.  
Estudo dos efeitos do exercício contínuo e acumulado sobre a função endotelial em ratos/Juliana EdwigesMartinez. Marília, 2015.  
47 f.

Orientador: Prof. Dr. Agnaldo Bruno Chies.  
Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde e Envelhecimento) - Faculdade de Medicina de Marília.

1. Acetilcolina. 2.Endotélio. 3.Exercício. 4.Norepinefrina.

Estudo dos efeitos do exercício contínuo e acumulado sobre a função endotelial em ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Acadêmico em “Saúde e Envelhecimento”, da Faculdade de Medicina de Marília, para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Saúde e Envelhecimento.

Comissão Examinadora:

---

Professor: Dr. Agnaldo Bruno Chies

Instituição: Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA)

---

Professor: Paulo Henrique Waib

Instituição: Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA)

---

Professor: Robison José Quitério

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Marília/SP

Data de aprovação: 27 de Fevereiro de 2015.

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, por guiar minha vida e se mostrar presente em todas as situações de felicidade ou dificuldade.

Ao Orientador, Professor Dr. Agnaldo, pela imensa paciência, disponibilidade para esclarecimentos e, principalmente, por sua exigência e honestidade.

Finalmente, agradeço à minha família e todos aqueles que me ajudaram nesta jornada de momentos inesquecíveis!

## RESUMO

Atividade física promove benefícios ao organismo, porém realizá-la regularmente de modo contínuo e vigoroso nem sempre é possível para a maioria das pessoas. Acumular atividade física ao longo do dia pode ser uma possível solução, entretanto, os efeitos desta prática sobre a função endotelial não são conhecidos. Neste sentido, o presente estudo objetivou verificar se o treinamento por exercício físico acumulado, assim como ocorre com o treinamento por exercício contínuo, melhora a função endotelial em aorta de rato. Para isto, ratos Wistar ♂ (300-350g) foram divididos em 3 grupos: sedentários (SED), treinados por exercício contínuo (TEC; 1 hora em esteira, 5 dias/semana por 10 semanas) e treinados por exercício acumulado (TEA; 4 sessões de 15 minutos em esteira ao longo do dia, 5 dias/semana por 10 semanas). Durante o período de treinamento, o ganho de massa corporal foi registrado, assim como o desempenho em esteira. No dia do sacrifício, após a determinação da massa corporal e do coração, anéis (3 - 5 mm) da aorta foram obtidos destes animais e montados em banho de órgãos. Neste ambiente, estas preparações foram desafiadas com noradrenalina, acetilcolina, KCl e nitroprussiato de sódio (NPS), tanto na ausência quanto na presença de inibidor da síntese de óxido nítrico. Algumas preparações foram estudadas após a remoção mecânica do endotélio vascular. Os resultados obtidos mostraram que durante o período de treinamento, os animais TEC tiveram ganho de massa corporal significativamente menor em relação aos animais SED e que esta diferença foi suprimida pela remoção das vísceras destes animais. Contudo, este fenômeno não foi observado nos animais do grupo TEA. Além disso, tanto os animais do grupo TEC quanto os animais do grupo TEA apresentaram desempenho físico na esteira significativamente maior em comparação aos animais SED. No estudo da reatividade vascular, as aortas dos animais do grupo TEC apresentaram diminuição da magnitude das respostas contráteis da aorta à noradrenalina e aumento do relaxamento induzido pela acetilcolina, em comparação aos animais SED. Este fenômeno foi prevenido na presença do L-NAME e pela remoção endotelial. Por outro lado, nenhuma modificação de resposta da aorta para a noradrenalina ou a acetilcolina foi observada nos animais do grupo TEA. Por fim, nem TEC nem TEA modificaram as respostas da aorta ao KCl ou NPS. Concluiu-se, então, que tanto o TEC quanto o TEA melhoraram o condicionamento físico dos animais estudados. Contudo, apenas o TEC foi capaz de reduzir o ganho de massa corporal destes animais, bem como melhorar diretamente a função endotelial em suas aortas.

**Palavras-chave:** Acetilcolina. Endotélio. Exercício. Norepinefrina.

## ABSTRACT

Physical activity promotes benefits to the body, but do it regularly and in a continuous and vigorous fashion is not always possible for most people. Practicing physical activity in short sessions that are repeated throughout the day can be a possible solution, however, the effects of this practice on endothelial function are not yet known. In this sense, the present study aimed to verify whether training through cumulative exercise, as it occurs with training through continuous exercise, improves endothelial function in rat aorta. Thus, male wistar rats (300-350g) were divided into 3 groups: sedentary (SED), trained by continuous exercise (TEC; 1 hour on a treadmill, 5 days / week for 10 weeks) and trained by accumulated exercise (TEA ; 4 sessions of 15 minutes mat throughout the day, 5 days / week for 10 weeks). During the training period, the body weight gain as well as the performance gain in treadmill were registered. In the sacrifice day, after the determination of the body weight as well as the heart weight, rings (3 - 5 mm) of the aorta were obtained and mounted in organ bath. In this environment, these preparations were challenged with norepinephrine, acetylcholine, KCl and sodium nitroprusside (NPS), either in absence or presence of inhibitor of nitric oxide synthesis. Some preparations were studied after mechanical removal of the vascular endothelium. The results showed that during the training period, the TEC animals had significantly lower body mass gain compared to the SED animals and that this difference was abolished in the sacrifice day by removing the viscera of these animals. However, this phenomenon was not observed in TEA animals. Furthermore, both TEC and TEA animals showed significantly higher performance compared to the SED animals. In the study of vascular reactivity, the aortas taken from TEC animals have shown reduced contractile responses to norepinephrine as well as increased relaxation induced by acetylcholine, compared with SED animals. This phenomenon was nor observed in the presence of L-NAME or in preparations without endothelium. On the other hand, no modification of aorta responses to norepinephrine or acetylcholine were observed of TEA. Finally, neither TEC nor TEA have modified to aorta responses for KCl or NPS. In conclusion, both the TEC and the TEA improved the physical conditioning of the animals studied. However, only the TEC was able to reduce the gain of body weight of the animals and improve directly the endothelial function in their aortas.

**Keywords:** Acetylcholine. Endothelium. Exercise. Norepinephrine.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Porcentagem do ganho de massa corporal durante o período de treinamento (A), bem como massa da carcaça (B) e massa do coração (C) no dia da eutanásia, determinada nos animais pertencentes aos grupos sedentários (SED) e treinados por exercício contínuo (TEC) ou treinados por exercício acumulado (TEA). Barras indicam média  $\pm$  EPM de 10 determinações independentes. \* indica diferença significativa ( $P < 0,05$ : ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Dunn).....23
- Figura 2** – Porcentagem do ganho de desempenho na esteira apresentado pelos animais pertencentes aos grupos sedentários (SED), treinados por exercício contínuo (TEC) e treinados por exercício acumulado (TEA) durante o período de treinamento. Colunas representam média  $\pm$  EPM de 10 determinações independentes. \*\*\* indicam diferença significativa ( $P < 0,001$ : ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey) em relação ao desempenho no primeiro teste de esforço.....24
- Figura 3** – TBARS ( $\mu\text{mol/L}$ ) determinado nos animais sedentários (SED), treinados por exercício contínuo (TEC) e treinados por exercício acumulado (TEA). Colunas representam média  $\pm$  EPM de 7 determinações independentes.  $P > 0,05$ : ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey. ....25
- Figura 4** – Curvas concentração-resposta para noradrenalina determinadas em preparações de aorta torácica intacta na ausência (A) ou na presença de L-NAME  $10^{-4}$  M (B), bem como em preparações de aorta torácica deendotelizadas (C), obtidas de animais sedentários (SED), treinados por exercício contínuo (TEC) e treinados por exercício acumulado (TEA). Entre parênteses, o número de determinações independentes (n) seguido pelos valores de  $pEC_{50}$ . Pontos e dados numéricos representam média  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa ( $P < 0,05$ : ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey).....26
- Figura 5** – Relaxamento induzido por ACh  $10^{-4}$  M em preparações de aorta torácica pré-contraídas com Phe  $10^{-5}$  M, provenientes de animais sedentários (SED), treinados por exercício contínuo (TEC) e treinados por exercício acumulado (TEA). Barras indicam média  $\pm$  EPM de 8 determinações independentes. \* indica diferença significativa ( $P < 0,05$ : ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey).....27
- Figura 6** – Curvas concentração-resposta para KCl determinadas em preparações de aorta torácica provenientes de animais sedentários (SED), treinados por exercício contínuo (TEC) e treinados por exercício acumulado (TEA). Entre parênteses, o número de determinações independentes (n) seguido pelos valores de  $pEC_{50}$ . Pontos e dados numéricos representam média  $\pm$  EPM.  $P > 0,05$ : ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey. ....28
- Figura 7** – Curvas concentração-resposta para NPS determinadas em preparações de aorta torácica pré-contraídas com noradrenalina  $10^{-4}$  M, provenientes de animais sedentários (SED), treinados por exercício contínuo (TEC) e treinados por exercício acumulado (TEA). Entre parênteses, o número de determinações independentes (n) seguido pelos valores de  $pEC_{50}$ . Pontos e dados numéricos representam média  $\pm$  EPM.  $P > 0,05$ : ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey. ....29



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
ACSM	American college of sports medicine
BHT	Butylated hydroxytoluene
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiopterina
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
COX	Ciclooxigenase
EC <sub>50</sub>	Concentração que promove 50% do efeito máximo
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
E <sub>máx</sub>	Efeito desencadeado pela concentração supra-máxima do agonista
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
ERO's	Espécies reativas de oxigênio
ET	Endotelina
FAMEMA	Faculdade de medicina de Marília
GMPc	Guanosina cíclica monofosfato
GPx	Glutationa peroxidase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
KCl	Cloreto de potássio
L-NAME	Nitro-L-arginine methyl ester
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fostato
NO	Óxido nítrico
Nor	Noradrenalina
NPS	Nitroprussiato de sódio
pEC <sub>50</sub>	Negativo do logaritmo da EC <sub>50</sub>

Phe	Fenilefrina
SED	Sedentários
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TEA	Treinamento/treinados por exercício acumulado
TEC	Treinamento/treinados por exercício contínuo
TrXR2	Peroxidase dependente de tioredoxina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Benefícios do exercício físico para a saúde .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2 O desafio da prescrição adequada a cada indivíduo .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3 Ações cardiovasculares do exercício .....</b>	<b>14</b>
<b>1.4 Exercício acumulado e endotélio vascular .....</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Geral.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Específicos.....</b>	<b>17</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1 Animal.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2 Distribuição dos animais nos grupos experimentais.....</b>	<b>18</b>
<b>3.3 Protocolo de treinamento .....</b>	<b>19</b>
<b>3.4 Pesagens .....</b>	<b>20</b>
<b>3.5 Eutanásia .....</b>	<b>20</b>
<b>3.6 Coleta do plasma.....</b>	<b>20</b>
3.6.1 TBARS.....	20
<b>3.7 Estudo funcional da reatividade vascular .....</b>	<b>21</b>
<b>3.8 Análise estatística .....</b>	<b>22</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>
<b>4.1 Parâmetros de avaliação da efetividade do treinamento físico.....</b>	<b>23</b>
4.1.1 Variação da massa corporal e cardíaca .....	23
4.1.2 Desempenho no teste de esforço .....	24
<b>4.2 TBARS .....</b>	<b>25</b>
<b>4.3 Reatividade vascular.....</b>	<b>25</b>
4.3.1 Reatividade vascular à noradrenalina.....	25

4.3.2 Reatividade vascular à ACh .....	27
4.3.3 Reatividade vascular ao KCl e ao NPS .....	28
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>38</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>45</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Benefícios do exercício físico para a saúde

Pesquisas têm demonstrado que a prática da atividade física promove inúmeros ganhos ao organismo.<sup>1</sup> Adaptações fisiológicas provocadas por exercícios físicos diários associam-se, tanto às melhorias musculoesqueléticas quanto aos benefícios para o sistema cardiovascular, além de minimizar sequelas de doenças como Esclerose Múltipla, Mal de Alzheimer e Parkinson.<sup>2</sup> Neste sentido, inúmeros estudos propõem a utilização de terapias que incluem a prática regular de exercício físico também para redução dos fatores de risco cardiovascular.<sup>3</sup> Contudo, existe uma diferença conceitual entre atividade física e exercício físico. Neste sentido, atividade física refere-se a qualquer movimento corporal ativo acompanhado de queima calórica (atividades laborais, desportivas ou de lazer). Por outro lado, exercício ou treinamento físico se relacionam à prática da atividade física de modo planejado e sistemático, onde ocorre a articulação de variáveis como: intensidade, duração e frequência da atividade.<sup>4</sup> O *American College of Sports Medicine* (ACSM) no decorrer de suas edições, vem procurando ajustar suas recomendações acerca da quantidade ideal de exercício.

## 1.2 O desafio da prescrição adequada a cada indivíduo

A prescrição de exercício físico, feita de forma adequada e de maneira individualizada, tem relação direta com a adesão à prática de atividade física e com ganhos desta prática à saúde. Já a alta prevalência de inatividade física pode estar relacionada, em parte, à percepção que existe entre alguns profissionais da saúde e da população em geral, de que somente os exercícios vigorosos e de longa duração exercem efeitos benéficos à saúde.<sup>5</sup> Em paralelo, pesquisas vêm demonstrando que a falta de tempo, além da ausência de ambiente propício para realização da prática do exercício físico, contribuem para o sedentarismo e, conseqüentemente, para o surgimento de doenças.<sup>6</sup>

Tem sido demonstrado também que indivíduos aderem melhor aos exercícios de moderada intensidade, e que a pouca adesão aos exercícios de alta intensidade, em parte, está relacionada à elevada incidência de lesões, particularmente perceptível em indivíduos com sobrepeso, sedentários de meia idade ou aqueles que não possuem condicionamento físico adequado.<sup>5</sup> Atualmente, as recomendações para adultos saudáveis procuram indicar

possibilidades diversas de se executar o exercício. A mesma estratégia deve ser utilizada para se fazer recomendações adaptadas àquelas pessoas que convivem com doenças crônicas ou limitações físicas.<sup>7</sup>

Por conseguinte, o exercício físico pode ser classificado de acordo com a forma como é realizado<sup>1</sup> em: exercício contínuo, ou seja, aquele realizado por no mínimo 30 minutos, de intensidade moderada, mantido de forma regular por três ou mais dias durante a semana.<sup>8</sup> Segundo estes autores, esta modalidade de exercício físico tem seus efeitos benéficos à saúde já comprovados, há muito tempo é utilizado como tratamento não farmacológico para doenças cardiovasculares. Outra forma de exercício é o intermitente, que se caracteriza por séries de no mínimo 10 minutos de exercício de alta intensidade realizado num período do dia. Tais séries, também referenciadas como “ataques”, são intercaladas por períodos de recuperação, ou seja, intervalos constituídos por exercícios leves ou simplesmente o repouso.<sup>9,10</sup> O exercício intermitente também deve ser executado em no mínimo três dias por semana e, mantido de forma regular.<sup>9</sup> Lucas et al.,<sup>11</sup> contudo, usam o termo treinamento intervalado para modalidades similares ao exercício intermitente, porém, sem tempos fixos de intervalos.

Em contrapartida, a concepção de "acumular atividade física" é relativamente recente e surgiu a partir de estudos que começaram a comparar os efeitos do exercício realizado de modo contínuo e/ou intermitente com os resultados do exercício praticado de forma fracionada, em várias sessões ao longo do dia.<sup>1,8,12,13</sup> Assim, surge o conceito de "exercício acumulado", ou seja, praticado em sessões breves, com pelo menos 10 minutos de atividade aeróbica moderada, de forma regular, em vários momentos do dia e, preferencialmente, todos os dias da semana.<sup>14-17</sup> Pela maior flexibilidade e possibilidade de compatibilização de horários, exercícios de curta duração podem encorajar a população a praticar regularmente exercícios físicos e, assim, desenvolver um estilo de vida mais ativo e saudável.<sup>13,18,19</sup> Vale destacar que algumas formas de exercício podem ser executadas no trabalho, no ambiente doméstico ou nos deslocamentos cotidianos, mediante uma escolha pessoal.<sup>20</sup> Deste modo, Park et al.<sup>21</sup> sugerem que ao invés de uma única sessão mais longa de exercício, caminhadas de 10 minutos podem adequar-se mais facilmente em uma agenda lotada. Neste sentido, Strath et al.<sup>22</sup> sugerem utilizar escadas ao invés do elevador e estacionar o carro um pouco mais longe do seu destino.

Ainda, em pesquisa com 13 adultos sedentários submetidos a três sessões de 10 minutos de caminhada rápida e acumulada ao longo do dia, Murphy et al.<sup>17</sup> observaram a permanência de todos os participantes neste programa de treinamento, ante a desistência de

quatro participantes de um grupo de oito pessoas que faziam parte do treinamento físico por meio de uma sessão contínua de 30 minutos de caminhada rápida. Estes autores também sugerem que, indivíduos sedentários poderiam adaptar-se mais facilmente às sessões de atividades físicas de longa duração se, antes, estivessem habituados às sessões de menor tempo. Além disso, o fracionamento do tempo de exercício ao longo do dia ainda pode ser uma estratégia eficaz no tratamento de indivíduos cardiopatas, ou aqueles cujo condicionamento físico é muito precário. Por este motivo, tem despertado o interesse dos profissionais que trabalham com esta clientela.<sup>12</sup>

Entender o potencial de cada modalidade de exercício é fundamental para elaboração de protocolos de treinamento físico, adaptados segundo as necessidades de cada indivíduo, para que sejam ferramentas terapêuticas úteis no tratamento de doenças como as do sistema cardiovascular.<sup>10</sup> Contudo, se por um lado muitos profissionais confiam nas vantagens de acumular atividades físicas ao longo do dia, para outros, permanece o conceito de que somente exercícios extenuantes e de longa duração são capazes de trazer benefícios à saúde.<sup>5,8,23,24</sup> Por tal motivo, diretrizes sobre atividade física procuram disseminar a compreensão de que o exercício pode ser praticado em sessões breves, distribuídas ao longo do dia, e que os benefícios à saúde decorrentes do acúmulo destas sessões seriam compatíveis aos benefícios do exercício praticado em sessão única de tempo equivalente.<sup>25</sup> Cabe ressaltar, no entanto, que “benefícios à saúde” é um conceito genérico, e pode traduzir ganhos de natureza muito diversa. De fato, sabe-se que o exercício físico influencia inúmeros mecanismos bioquímicos/fisiológicos que, isoladamente ou em conjunto, podem ser decisivos para a prevenção de determinadas doenças ou, para atenuar os agravos das mesmas. Neste sentido, é necessário conhecer em detalhes as repercussões do exercício acumulado sobre cada um destes mecanismos, a fim de saber se esta modalidade de exercício promove benefícios equivalentes ao exercício realizado de modo contínuo ou intermitente sobre os diferentes sistemas bioquímicos/fisiológicos.

No estudo de Miyashita et al.<sup>24</sup>, realizado em homens jovens saudáveis, o exercício acumulado foi tão eficaz quanto o exercício contínuo na redução da concentração plasmática pós-prandial de triglicérides, desde que o gasto energético final fosse equivalente. E mais, o exercício acumulado foi capaz de promover aumentos maiores nos níveis circulantes de lipoproteína de alta densidade (HDL), comparado ao exercício contínuo com gasto calórico semelhante.<sup>26</sup> Paralelamente, foi relatado um aumento dos níveis circulantes de HDL após um programa de subir escadas, com características de exercício acumulado, em mulheres jovens

previamente sedentárias.<sup>27</sup> A eficácia do exercício acumulado em reduzir os níveis da pressão arterial também foi demonstrada, tanto em indivíduos normotensos quanto nos indivíduos pré-hipertensos.<sup>19,21,23</sup> Neste sentido, Schmidt et al.<sup>14</sup> analisaram estudantes universitárias do gênero feminino que não tinham o hábito de realizar atividade física e observaram, após o treinamento por meio do acúmulo de duas ou três sessões de exercícios durante o dia, a melhora do condicionamento físico de forma similar ao grupo de estudantes que realizaram exercícios de modo contínuo. Outros estudos mostram ainda que, principalmente em adultos de meia-idade, o exercício acumulado aumenta a aptidão cardiorrespiratória, melhora o perfil lipídico, diminui a espessura de pregas cutâneas, reduz a circunferência da cintura e do quadril, além de diminuir a ansiedade e melhorar o estado de humor e bem-estar psicológico.<sup>12,17</sup>

### **1.3 Ações cardiovasculares do exercício**

O exercício físico promove importante aumento da demanda metabólica, sobretudo, na musculatura cardíaca e esquelética em atividade.<sup>28,29</sup> Em decorrência disto, o fluxo sanguíneo para os diversos territórios vasculares é redistribuído, com aumento deste fluxo para o coração, diafragma e musculatura esquelética em atividade, porém, às custas de diminuição para pele, estômago, intestinos, pâncreas, fígado, rins, baço e musculatura esquelética em repouso.<sup>30,31</sup> Tais modificações do fluxo sanguíneo observadas durante o exercício, são denominadas "redistribuição circulatória" e, podem influenciar mecanismos endoteliais e/ou subendoteliais que regulam as ações do sistema nervoso autônomo simpático sobre os vasos.<sup>32,33</sup>

Tem sido proposto que, durante o exercício, ocorre aumento do cisalhamento exercido pelo fluxo sanguíneo sobre a camada endotelial tanto de artérias<sup>32</sup> quanto de veias,<sup>33</sup> levando ao aumento da expressão de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e, conseqüentemente, maior produção de óxido nítrico (NO) pelo endotélio vascular.<sup>34-37</sup> Ainda, a produção endotelial de prostanóides pode ser aumentada nestas condições.<sup>38,39</sup> Assim, Spier et al.<sup>40</sup> observaram que o treinamento físico aumenta a participação de mecanismos endoteliais relacionados ao NO, que modulam as respostas vasocontráteis à noradrenalina (Nor), um dos principais neurotransmissores do sistema nervoso simpático e, diretamente envolvida na manutenção do tônus vasomotor.<sup>32,33</sup> Conjuntamente, estudos sugerem que a liberação de NO, possivelmente desencadeada pela ativação de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos presentes no



endotélio vascular, antagonizam as ações vasoconstritoras em aorta, mediadas por receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos presentes na musculatura lisa vascular.<sup>41</sup> Assim, tanto o exercício agudo<sup>42</sup> quanto o treinamento<sup>43-46</sup> parecem aumentar a liberação endotelial de substâncias vasodilatadoras que, por sua vez, antagonizam as ações do sistema nervoso simpático em diferentes vasos. Este fenômeno, também conhecido como simpatoplegia, aumenta o fluxo sanguíneo nos leitos vasculares mobilizados pelo exercício.<sup>28,47</sup> Desta forma, a ação coordenada destes diferentes mecanismos vasomotores pode controlar o fluxo sanguíneo, dirigindo-o para os leitos vasculares diretamente envolvidos com a musculatura esquelética e demais órgãos que estão em atividade durante o exercício físico.<sup>48,49</sup>

O exercício praticado de forma regular, também melhora as defesas antioxidantes do organismo, inclusive aquelas que atuam no endotélio vascular.<sup>50,51</sup> Deste modo, promovendo a liberação de NO e/ou controlando a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's), o exercício otimiza a função endotelial e, paralelamente, reduz os riscos de danos ao sistema cardiovascular. Tais adaptações endoteliais explicam, em grande parte, os benefícios do exercício para a saúde cardiovascular.<sup>28,32</sup> Já a inatividade física ou a presença de doenças relacionadas ao sistema cardiovascular podem reduzir a biodisponibilidade do NO que, associadas ao estresse oxidativo, levam à disfunção endotelial, que é o primeiro passo para o desenvolvimento de lesões ateromatosas assim como distúrbios da vasomotricidade.<sup>52</sup>

Em pacientes com insuficiência cardíaca estável, a realização de um programa adequado de atividade física diária pode aliviar os sintomas da doença, melhorar a tolerância ao exercício e minimizar o tempo de hospitalização, reduzindo as taxas de incapacidade e mortalidade.<sup>53</sup> Ainda, ao melhorar a tolerância de indivíduos à prática do exercício, o treinamento físico pode colaborar na redução da obesidade corporal e deposição de gordura visceral. Pelo mesmo motivo, o treinamento físico também previne o desenvolvimento de síndrome metabólica e arritmias ventriculares, tornando-o assim um aliado imprescindível na defesa contra problemas de saúde tais como: hipertensão arterial sistêmica, acidente vascular encefálico, diabetes mellitus, neoplasias, osteoartrite, osteoporose etc.<sup>5,8,13</sup> O exercício é capaz ainda de promover benefícios cognitivos e diminuição do risco da ocorrência de demência.

#### **1.4 Exercício acumulado e endotélio vascular**

As ações benéficas do exercício físico sobre a função endotelial já estão comprovadas e ocorrem, sobretudo, porque o exercício promove aumento do cisalhamento sobre a

superfície endotelial, estimulando assim a expressão da eNOS, ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e superóxido dismutase-1 (SOD-1).<sup>34-36,38-40,42-44,54</sup> Entretanto, pesquisas realizadas em culturas de células endoteliais sugerem que o tempo de exposição ao cisalhamento influencia o grau de expressão destas enzimas.<sup>50,54,55</sup> Particularmente em relação a eNOS, estudos também mostram que o tempo de exposição ao cisalhamento influencia o grau de fosforilação desta, regulando assim sua atividade enzimática.<sup>55</sup> Além disso, a exposição de células endoteliais ao cisalhamento, por curtos períodos de tempo, pode estimular a expressão de endotelina-1, que é uma substância vasoconstritora, enquanto que a exposição por períodos mais prolongados pode ter efeito oposto.<sup>56</sup> Mais recentemente Ishibazawa et al.<sup>57</sup> também observaram que a intensidade e o tempo de exposição ao cisalhamento influenciam tanto a expressão de eNOS quanto de endotelina-1. Assim é cabível supor que diferentes tempos de exposição ao exercício também podem ter repercussões distintas sobre a expressão destas enzimas. Neste sentido, observa-se que os estudos acerca dos efeitos do exercício sobre os mecanismos bioquímicos endoteliais relacionados ao NO, prostanóides e endotelina-1, utilizaram modelos de exercício contínuo ou intermitente.<sup>32,34-40,42-46,50,51,58</sup> De fato, na revisão de literatura realizada, não se encontrou nenhum estudo que avaliasse os efeitos do exercício acumulado diretamente sobre a função endotelial.

Se considerarmos que o tempo de exposição do endotélio vascular ao cisalhamento pode influenciar o grau de expressão de enzimas e peptídeos endoteliais, emerge naturalmente a questão: “as adaptações endoteliais promovidas pelo exercício acumulado são semelhantes às já observadas em relação ao exercício contínuo ou intermitente?” Esta, na verdade, é uma importante lacuna de conhecimento uma vez que pouco ainda se conhece acerca dos impactos do exercício acumulado sobre os mecanismos fisiológicos/bioquímicos que determinam a função endotelial.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Verificar se o treinamento por exercício acumulado (TEA), assim como ocorre com o treinamento por exercício contínuo (TEC), melhora a função endotelial em aorta de rato.

### **2.2 Específicos**

- Avaliar os efeitos do TEC e do TEA sobre o ganho de massa corporal e cardíaca.
  
- Avaliar os efeitos do TEC e do TEA sobre o balanço redox destes animais
  
- Investigar se eventual melhora da função endotelial em aorta de rato, decorrente do TEC e do TEA, atenua as respostas deste vaso à noradrenalina e, paralelamente, acentua o relaxamento endotélio-dependente induzido por acetilcolina (ACh).
  
- Identificar os mecanismos endoteliais envolvidos nestas eventuais modificações de reatividade de aortas de ratos à noradrenalina e à ACh, induzidas pelo TEC e pelo TEA.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animal

Foram utilizados 33 ratos *Wistar* machos (oito semanas de vida), provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA). Durante todo o tempo de adaptação à esteira e treinamento físico, os animais permaneceram no biotério de apoio, ligado ao laboratório de farmacologia com alimentação e hidratação *ad libitum*. Deste modo, foram mantidos em gaiolas coletivas (cada uma com capacidade para cinco animais), ambiente com temperatura controlada (23-25 °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas. Em relação ao crescimento dos animais, o mesmo foi programado no sentido de evitar a discrepância de peso no dia do estudo funcional das respostas da aorta.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA da FAMEMA, no dia 28/06/2013 (protocolo nº 627/13).

#### 3.2 Distribuição dos animais nos grupos experimentais

A distribuição dos animais nos grupos experimentais foi realizada utilizando a estratégia proposta por Melo et al.,<sup>59</sup> que considera a capacidade física inata de cada animal para a realização do exercício. Assim, em um primeiro momento, todos os animais foram postos diariamente para andar (sessões de 2 a 12 minutos) na esteira (*Movement Technology LX 170*) com capacidade para oito animais, em velocidade de 0,2 a 0,7 Km/h, sem inclinação, por duas semanas. Este período não foi caracterizado como parte do treinamento, mas apenas uma etapa para que os animais se adaptassem à esteira.

Finalizada esta fase, todos os animais foram submetidos ao primeiro teste de esforço físico, para avaliar a capacidade individual de corrida na esteira. Neste teste, os animais foram colocados na esteira com velocidade inicial de 0,3 Km/h. Em seguida, a velocidade da esteira foi sendo aumentada em 0,3 Km/h a cada 3 minutos, conforme escala de acréscimo de velocidade (APÊNDICE A), até que o animal apresentasse sinais de exaustão. A exaustão dos animais foi caracterizada pela interrupção da corrida, mesmo após estimulação através de uma leve pressão na cauda. Para cada animal, foi registrado o tempo em que permaneceu na esteira até a exaustão (capacidade máxima de exercício).

Terminado o primeiro teste de esforço, os animais foram distribuídos em ordem decrescente, de acordo com o tempo em que estes permaneceram em corrida na esteira. Assim, os três animais mais capazes foram colocados em grupos distintos: SED, TEC e TEA, seguindo a mesma sequência até os menos capazes.

Neste estudo, em momento algum houve inclinação da esteira. Também não foi utilizado estímulo elétrico como forma de induzir os animais a permanecerem em atividade na esteira.

### **3.3 Protocolo de treinamento**

Os animais pertencentes aos grupos TEC e TEA iniciaram o programa de treinamento com velocidade da esteira correspondente a 50 - 60% da média de velocidade máxima obtida por estes grupos no primeiro teste de esforço. Após seis semanas de treinados, todos os animais foram submetidos ao segundo teste de esforço, realizado nos mesmos moldes do primeiro, para averiguar o condicionamento físico adquirido neste período. O aumento de tempo (em porcentagem) que os animais permaneceram correndo na esteira, observado entre a primeira e a sexta semana de treinamento, foi considerado como ganho de desempenho físico. Mediante os resultados obtidos neste segundo teste de esforço, ajustou-se também a velocidade da esteira.

Para garantir a aplicabilidade dos resultados obtidos no presente estudo, era necessário que o protocolo de exercício utilizado fosse o menos estressogênico possível. Isto porque o estresse promove modificações de resposta vascular compatíveis com o exercício físico.<sup>60,61</sup> Além disto, o exercício (contínuo e acumulado) foi praticado com intensidade moderada, a fim de evitar o elevado estresse oxidativo inerente ao exercício de alta intensidade.<sup>31</sup> Neste sentido, a metodologia de treinamento descrita em Melo et al.<sup>59</sup> atende a estes quesitos e, por este motivo, foi utilizada.

O programa de treinamento dos animais obedeceu ao horário de funcionamento do laboratório de farmacologia. Foi realizado em 5 dias/semana com duração de 8-10 semanas. Assim, o grupo TEC realizou sessões contínuas de 1 hora/dia de treinamento, enquanto que, o grupo TEA, realizou quatro sessões de 15 minutos regularmente distribuídas ao longo do dia (APÊNDICE B). Os animais pertencentes ao grupo SED também tiveram contato com a esteira, porém por apenas 5 minutos, uma vez ao dia, 5 dias/semana e durante 8-10 semanas, para que passassem pela mesma experiência ambiental que os ratos TEC e TEA.

### 3.4 Pesagens

A massa corporal de cada animal foi registrada semanalmente, a partir do primeiro até o último dia do período de treinamento. Já a massa do coração e a massa da carcaça (após remoção das vísceras) foram registradas logo após a eutanásia do animal, no dia do experimento de reatividade vascular.

### 3.5 Eutanásia

Ao final do período de treinamento, imediatamente antes da montagem das preparações nas cubas de órgãos isolados, os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> e exsanguinados. Cabe ressaltar que, todos os animais TEC e TEA foram submetidos ao protocolo de eutanásia 24 horas após a última exposição ao exercício.

### 3.6 Coleta do plasma

Logo após a eutanásia dos animais, o sangue foi coletado através de punção da veia cava. Em seguida, este sangue foi transferido para tubos de ensaio e centrifugado a 3500 rotações por minuto (rpm) durante 15 minutos à temperatura de 4° C. O sobrenadante (plasma) foi coletado, transferido em tubo de *ependorf*<sup>®</sup> e estocado em -20 °C para posterior determinação das *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (TBARS).

#### 3.6.1 TBARS

As espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), utilizadas como biomarcadores de peroxidação lipídica, foram determinadas pelo método adaptado de Yagi<sup>62</sup> e de Okawa et al.<sup>63</sup> O princípio deste método consiste na reação do malondialdeído (MDA) com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando como produto um cromógeno de cor rosa, capaz de ser detectado através de leitura espectrofotométrica e, cuja absorção ocorre em  $\lambda$  de 532 nm. A uma parte de plasma (100  $\mu$ L) foi pipetado 10  $\mu$ L de *butylated hydroxytoluene* (BHT) 29,5 mM e, em seguida pipetou-se 1,9 mL do reagente de trabalho (SDS 8%; ácido acético 20% e ácido tiobarbitúrico-TBA 0,8%). A mistura foi aquecida a 100° C por 60 minutos e o

sobrenadante lido a 532 nm. A concentração total de TBARS foi determinada pela comparação de absorvância entre as amostras e uma curva padrão de MDA (0 a 100  $\mu\text{M}$ ).

### 3.7 Estudo funcional da reatividade vascular

Após eutanásia dos animais, segmentos de aorta torácica foram removidos e transferidos para placas de Petri recobertas por parafina. Nestas placas, as aortas foram separadas dos tecidos adjacentes, com auxílio de lupa, e seccionados em anéis de 3-5 mm. Em seguida, estes anéis foram montados entre dois ganchos de metal, dispostos no lúmen e, transferidos para cubas de órgãos isolados com capacidade de 2,5 ml, contendo solução nutritiva de *Krebs-Henseleit* (APÊNDICE C) aquecida a 37 °C, com pH 7,4 e gaseificada com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>). Neste ambiente, um dos ganchos foi fixado ao fundo da cuba e o outro a um transdutor isométrico de força para detecção de modificações do tônus vascular. As modificações de tônus foram registradas através de sistema *Powerlab 8/30 Data Acquisition System (Australia AD Instruments)*.

Antes de serem desafiados, os anéis foram mantidos por 60 minutos sob tensão basal de 1,5 grama força ( $g_f$ ), a fim de permitir a adaptação das preparações ao meio artificial. Neste período, bem como durante todo o experimento, a solução nutritiva foi renovada regularmente. Em seguida, a integridade endotelial foi avaliada funcionalmente. Para isso, estas preparações foram pré-contráidas com fenilefrina (Phe)  $10^{-5}$  M e, no platô da resposta, estas preparações foram desafiadas com ACh  $10^{-4}$  M. O relaxamento igual ou superior a 80% da contração inicial, foi considerado indicativo de integridade endotelial. Algumas preparações foram deendotelizadas, ou seja, tiveram seus endotélios removidos manualmente por meio do atrito, rolando-se a preparação em torno de uma das hastes de uma pinça cirúrgica. Neste caso, a ausência de relaxamento induzido por ACh foi indicativo da efetividade da remoção endotelial.

A reatividade vascular foi estudada a partir da obtenção de curvas concentração-resposta cumulativas para noradrenalina ( $10^{-10}$  –  $10^{-4}$  M), solução despolarizante (KCl  $10^{-2}$  –  $1,2 \times 10^{-1}$  M – compensado pela redução do sódio em solução) e NPS ( $10^{-9}$  –  $10^{-4}$  M). Avaliou-se também o relaxamento induzido por concentração única de ACh ( $10^{-4}$  M) em preparações pré-contráidas com Phe  $10^{-5}$  M. Algumas destas preparações foram estudadas na presença de *nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride* (L-NAME)  $10^{-4}$  M, um inibidor não seletivo de

NOS. Este inibidor foi administrado na cuba, 20 minutos antes do início do registro das curvas concentração-resposta.

Os registros das respostas vasomotoras das preparações foram expressos graficamente como curvas concentração-resposta. A partir destas curvas, foram obtidos o pEC<sub>50</sub>, que consiste no negativo do logaritmo da concentração molar do agonista responsável por 50% do efeito máximo (EC<sub>50</sub>) e, o efeito desencadeado pela concentração supra-máxima do agonista (E<sub>máx</sub>). Os valores de pEC<sub>50</sub> foram calculados por regressão não linear através do programa Prism (*GraphPad Software Corporation*).

### **3.8 Análise estatística**

Os dados obtidos foram expressos pela média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de 10-6 animais e comparados por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukeyou Dunn, quando necessário, para comparar a variância entre grupos e intragrupos. Diferenças nos valores de  $P < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas.

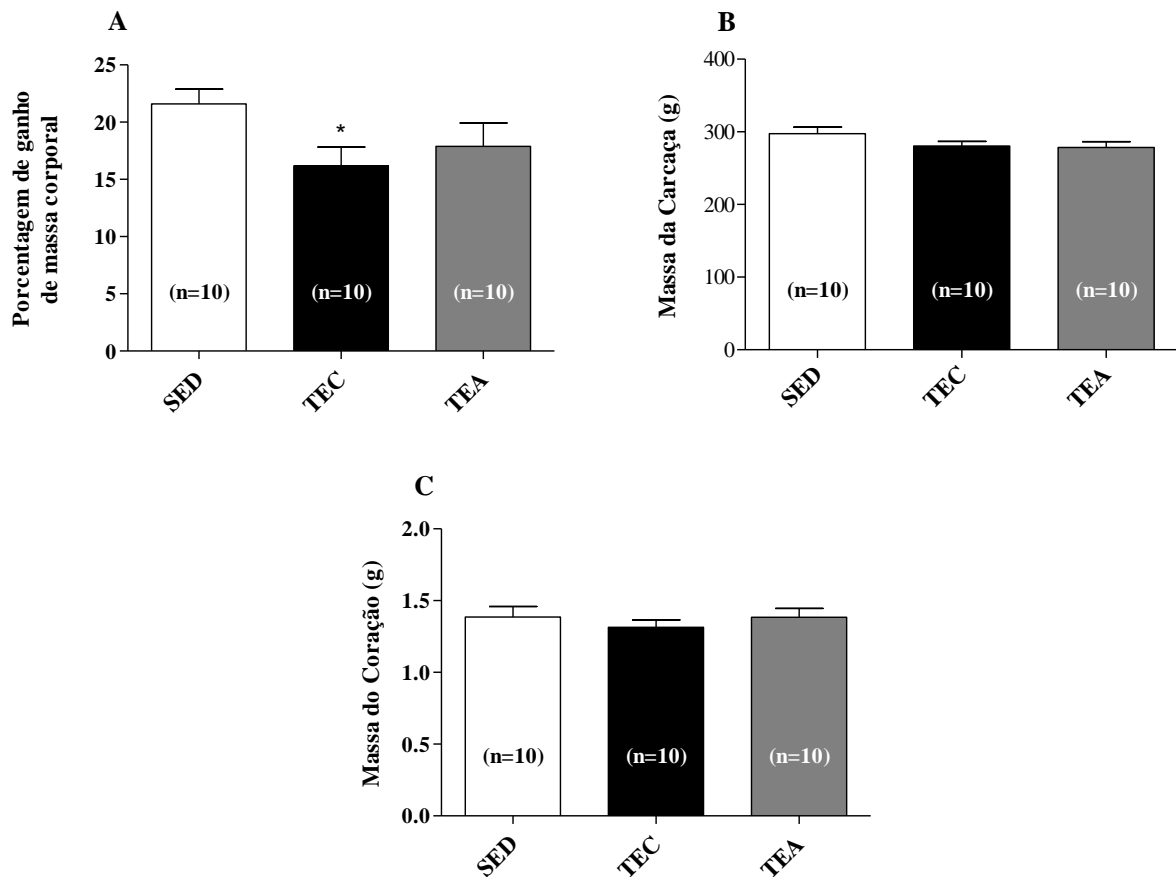


## 4 RESULTADOS

### 4.1 Parâmetros de avaliação da efetividade do treinamento físico

#### 4.1.1 Variação da massa corporal e cardíaca

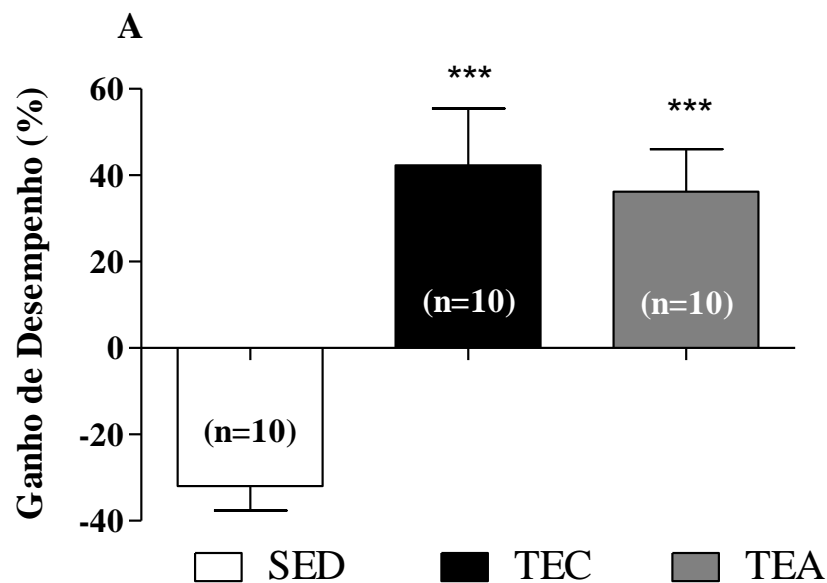
Durante o período em que se deu o treinamento físico, os animais do grupo TEC tiveram ganho de massa corporal total significativamente menor em comparação aos animais SED e TEA (Figura 1A). Por outro lado, nem os animais do grupo TEC, tampouco aqueles pertencentes ao grupo TEA, exibiram diferenças significativas de massa da carcaça (Figura 1B) ou do coração (Figura 1C) em relação aos animais do grupo SED.



**Figura 1** – Porcentagem do ganho de massa corporal durante o período de treinamento (A), bem como massa da carcaça (B) e massa do coração (C) no dia da eutanásia, determinada nos animais pertencentes aos grupos sedentários (SED) e treinados por exercício contínuo (TEC) ou treinados por exercício acumulado (TEA). Barras indicam média  $\pm$  EPM de 10 determinações independentes. \* indica diferença significativa ( $P < 0,05$ : ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Dunn).

#### 4.1.2 Desempenho no teste de esforço

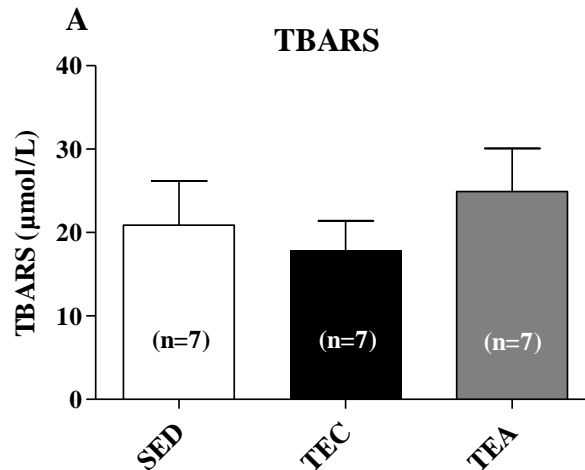
No período em que se deu o treinamento físico, observou-se que tanto os animais pertencentes ao grupo TEC quanto os animais TEA, tiveram significativa melhora do desempenho na esteira em relação aos animais SED. Vale destacar que, neste período, os animais do grupo SED tiveram redução de desempenho na esteira ao invés de melhora (Figura 2A).



**Figura 2** – Porcentagem do ganho de desempenho na esteira apresentado pelos animais pertencentes aos grupos sedentários (SED), treinados por exercício contínuo (TEC) e treinados por exercício acumulado (TEA) durante o período de treinamento. Colunas representam média  $\pm$  EPM de 10 determinações independentes. \*\*\* indicam diferença significativa ( $P < 0,001$ : ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey) em relação ao desempenho no primeiro teste de esforço.

## 4.2 TBARS

Não se observou diferença significativa nas determinações plasmáticas do TBARS entre os grupos de animais SED, TEC e TEA (Figura 3A).



**Figura 3** – TBARS ( $\mu\text{mol/L}$ ) determinado nos animais sedentários (SED), treinados por exercício contínuo (TEC) e treinados por exercício acumulado (TEA). Colunas representam média  $\pm$  EPM de 7 determinações independentes.  $P > 0,05$ : ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey.

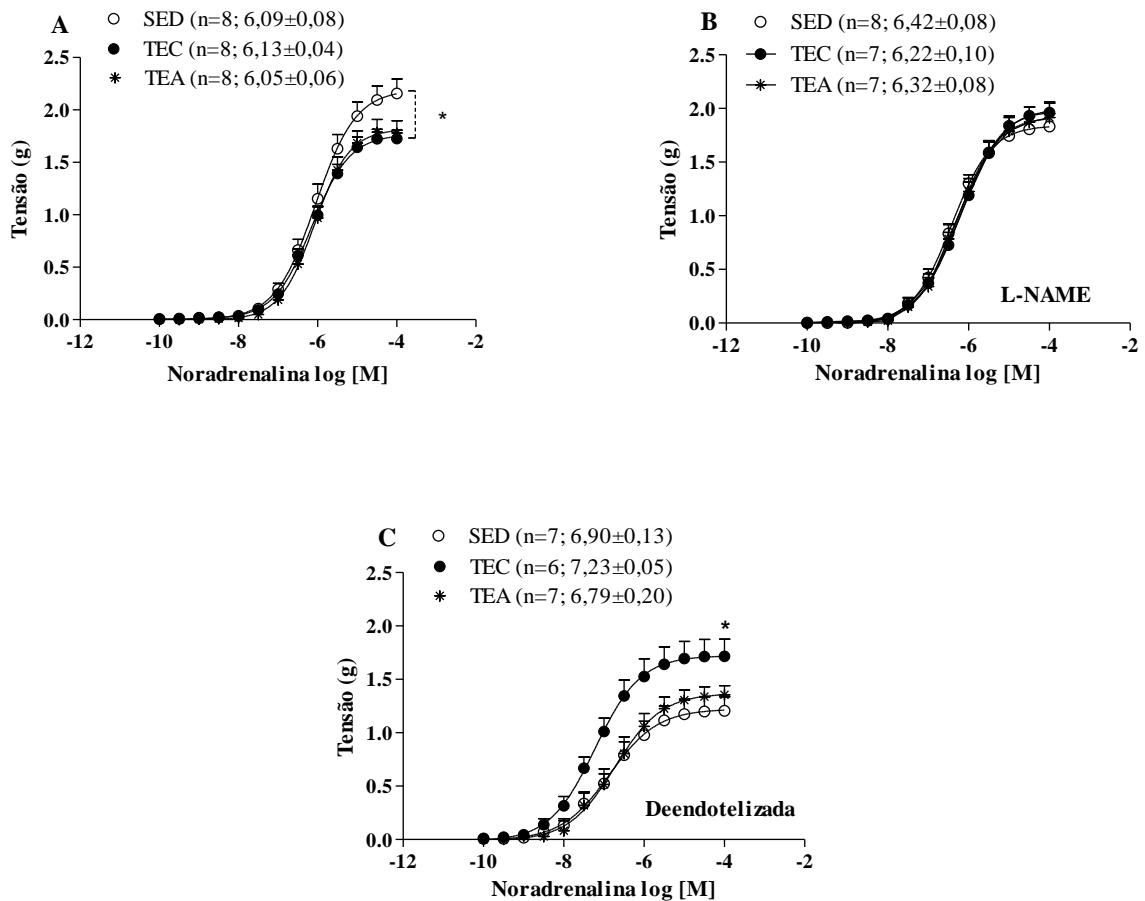
## 4.3 Reatividade vascular

Em relação aos resultados de reatividade vascular, cabe ressaltar primeiramente que o número amostral é menor em relação aos dados da avaliação de massa corporal e cardíaca, desempenho no teste de esforço e TBARS, não obstante todos estes dados terem sido obtidos dos mesmos animais, devido algumas perdas no processo de isolamento e montagem das preparações nas cubas de órgãos isolados. Como estes parâmetros foram analisados de forma independente, não foi necessária a exclusão dos dados de massa corporal e cardíaca, desempenho no teste de esforço e TBARS obtidos dos animais que tiveram suas aortas danificadas no processo de montagem nas cubas.

### 4.3.1 Reatividade vascular à noradrenalina

Os dados obtidos mostraram que o TEC promoveu diminuição da magnitude das respostas contráteis da aorta à noradrenalina, caracterizada por redução estatisticamente significativa dos valores de  $E_{\text{máx}}$  em comparação aos animais SED, porém sem modificações

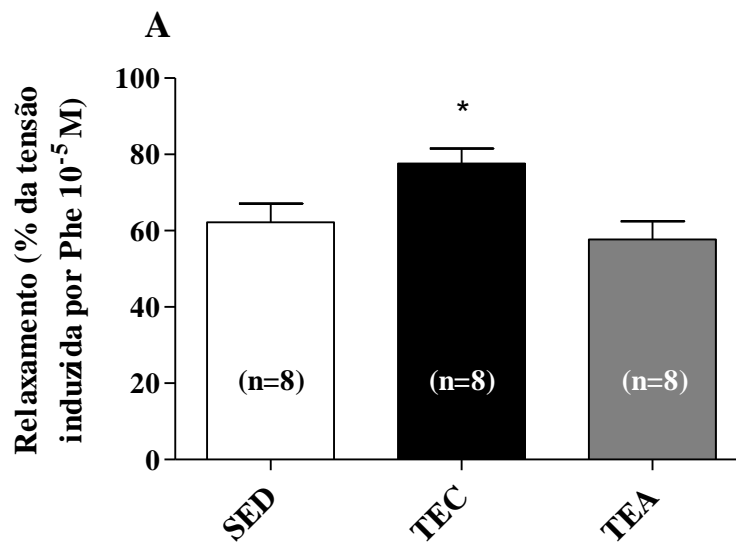
significativas de  $pEC_{50}$ . Todavia, observou-se redução não significativa nas respostas contráteis induzidas por noradrenalina nas aortas obtidas dos animais TEA, sem nenhuma modificação evidente de  $pEC_{50}$  (Figura 4A). Por outro lado, na presença do L-NAME, as respostas à noradrenalina obtidas em aortas provenientes dos animais pertencentes aos grupos TEC não diferiram em relação às obtidas dos animais SED ou TEA (Figura 4B). Em contrapartida, após a remoção do endotélio, as aortas provenientes dos animais TEC apresentaram respostas à noradrenalina maiores em relação àquelas obtidas em preparações de animais SED, o que se traduziu em aumentos significativos de  $E_{máx}$  porém, sem modificação significativa de  $pEC_{50}$ . Este fenômeno não foi observado em aortas provenientes de animais TEA (Figura 4C).



**Figura 4** – Curvas concentração-resposta para noradrenalina determinadas em preparações de aorta torácica intacta na ausência (A) ou na presença de L-NAME  $10^{-4}$  M (B), bem como em preparações de aorta torácica deendothelializadas (C), obtidas de animais sedentários (SED), treinados por exercício contínuo (TEC) e treinados por exercício acumulado (TEA). Entre parênteses, o número de determinações independentes (n) seguido pelos valores de  $pEC_{50}$ . Pontos e dados numéricos representam média  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ; ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey).

#### 4.3.2 Reatividade vascular à ACh

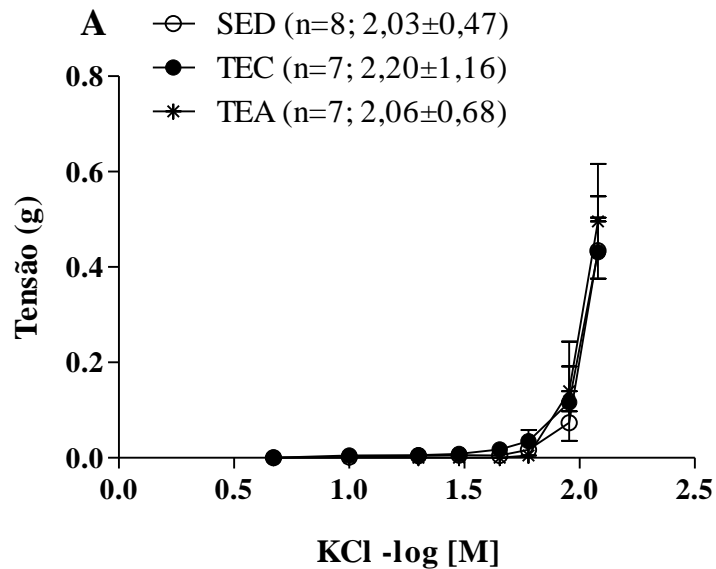
Os dados obtidos mostraram que a ACh  $10^{-4}$  M promoveu relaxamento significativamente maior em aortas provenientes de animais TEC pré-contraídas com Phe  $10^{-5}$  M, comparado ao observado em aortas de animais TEA submetidas às mesmas condições. Embora o relaxamento induzido por ACh observado em aortas de animais TEC também tenha sido maior em relação àquele observado em aortas de animais SED, esta diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 5A).



**Figura 5** – Relaxamento induzido por ACh  $10^{-4}$  M em preparações de aorta torácica pré-contraídas com Phe  $10^{-5}$  M, provenientes de animais sedentários (SED), treinados por exercício contínuo (TEC) e treinados por exercício acumulado (TEA). Barras indicam média  $\pm$  EPM de 8 determinações independentes. \* indica diferença significativa ( $P < 0,05$ : ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey).

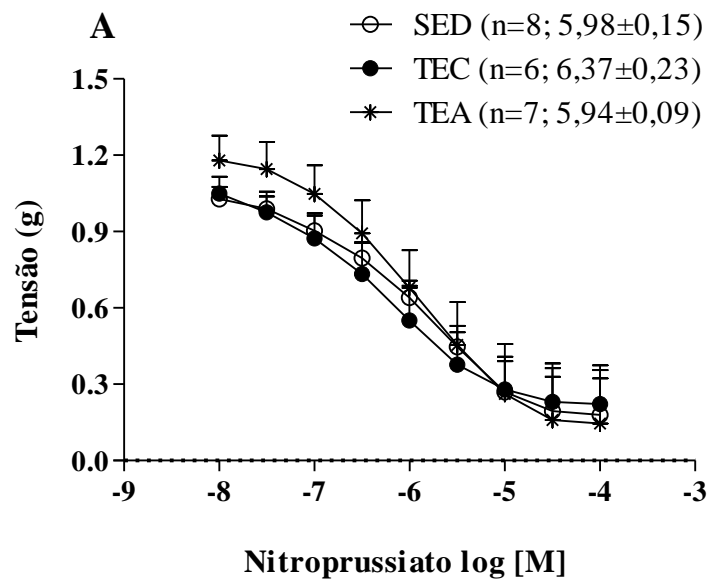
### 4.3.3 Reatividade vascular ao KCl e ao NPS

O padrão das curvas concentração-resposta para KCl determinadas em preparações de aorta torácica não foi modificado pelos protocolos de treinamento físico empregados no presente estudo. Por conta disto, não foram observadas modificações de  $pEC_{50}$  ou  $E_{máx}$  entre os grupos SED, TEC ou TEA (Figura 6A).



**Figura 6** – Curvas concentração-resposta para KCl determinadas em preparações de aorta torácica provenientes de animais sedentários (SED), treinados por exercício contínuo (TEC) e treinados por exercício acumulado (TEA). Entre parênteses, o número de determinações independentes (n) seguido pelos valores de  $pEC_{50}$ . Pontos e dados numéricos representam média  $\pm$  EPM.  $P > 0,05$ : ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey.

O padrão das curvas concentração-resposta para NPS determinadas em preparações de aorta torácica pré-contraídas com noradrenalina  $10^{-4}$  M, também não foi modificado pelos protocolos de treinamento físico empregados no presente estudo. Por conta disso, também não foram observadas modificações de  $pEC_{50}$  ou  $E_{máx}$  entre os grupos SED, TEC ou TEA (Figura 7A).



**Figura 7** – Curvas concentração-resposta para NPS determinadas em preparações de aorta torácica pré-contraídas com noradrenalina  $10^{-4}$  M, provenientes de animais sedentários (SED), treinados por exercício contínuo (TEC) e treinados por exercício acumulado (TEA). Entre parênteses, o número de determinações independentes (n) seguido pelos valores de  $pEC_{50}$ . Pontos e dados numéricos representam média  $\pm$  EPM.  $P > 0,05$ : ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey.

## 5 DISCUSSÃO

O endotélio vascular desempenha importante papel como sensor biológico, sendo responsável por detectar modificações de pressão e fluxo sanguíneo, além de alterações químicas e metabólicas que ocorram no organismo.<sup>64</sup> Também é capaz de liberar substâncias reguladoras do tônus e crescimento vascular, assim como de modular o estado oxidativo, a coagulação e a inflamação.<sup>65</sup> Um dos principais mecanismos vasodilatadores que determinam a função endotelial envolve a eNOS, que converte L-arginina em L-citrulina e NO<sup>66</sup> na presença de co-fatores como tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) e nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fostato (NADPH).<sup>67</sup> O NO, por sua vez, leva ao relaxamento do músculo liso vascular por aumentar os níveis intracelulares da guanosina monofosfato cíclica (GMPc) através da ativação da enzima guanilato ciclase.<sup>68,69</sup> Outras substâncias atuam em paralelo ao NO na mediação das funções do endotélio vascular, dentre estas destacam-se os prostanóides, que são produtos da família de enzimas denominadas cicloxigenas (COX).<sup>70</sup> Também, mecanismos hiperpolarizantes locais podem atuar em paralelo ao NO na modulação do tônus vascular.<sup>71</sup>

A participação dos diferentes mediadores endoteliais na modulação do tônus vascular pode variar dependendo do leito em questão. A literatura aponta o NO como o principal mediador do relaxamento endotélio-dependente induzido por ACh em vasos calibrosos que exercem papel de condutância, como a aorta.<sup>72</sup> Outras substâncias vasodilatadoras de origem endotelial, tais como o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e a prostaciclina, também estão envolvidos na fisiologia endotelial e, aparentemente, atuam em paralelo ao NO na modulação de tônus dos vasos, mas sobretudo os de resistência.<sup>73</sup> Assim, pelo fato de terem sido utilizadas preparações de aorta no presente estudo, focou-se a participação do NO na modulação do tônus vascular.

Como já foi mencionado, o exercício físico praticado de modo regular tem se mostrado eficaz na redução do risco cardiovascular.<sup>28</sup> Conforme exposto, a literatura sugere que o aumento do fluxo sanguíneo laminar, promovido pelo exercício, incrementa o cisalhamento sobre o endotélio vascular, causando modulação da produção local de diversas substâncias que participam da função endotelial, o que redundará na melhora da função endotelial tanto em humanos<sup>74</sup> quanto em animais.<sup>75</sup> Ainda assim, para que os ganhos esperados sejam alcançados é fundamental relacionar o exercício físico às particularidades do indivíduo que o pratica, tais como: idade, gênero, ambiente em que se encontra, além de identificar e/ou indicar o local adequado para praticá-lo.<sup>76</sup> Outras condições individuais como



etnia, situação sócio-educacional, sedentarismo e obesidade, assim como variáveis relacionadas à prescrição do exercício físico, dentre elas intensidade e duração, modo e frequência, também devem ser levadas em consideração.<sup>5</sup> Com isso, a prática do exercício físico não necessariamente precisa ser realizada em uma única longa sessão e, esta maior flexibilidade tem sido recomendada pelo ACMS.<sup>8,25</sup>

A pesquisa de Eguchi et al.<sup>77</sup> com trabalhadoras japonesas, demonstrou que incorporar sessões fracionadas de exercício físico ao estilo de vida, pode ser uma alternativa para pessoas ocupadas com o trabalho e que não teriam tempo para desenvolverem sessões longas de exercício durante seu dia. Em concordância, Sedgwick et al.<sup>78</sup> relatam que acumular sessões curtas de exercício durante o dia pode ser uma modalidade atraente à grande parte da população de jovens. Entretanto, ainda predomina a ideia de que somente exercícios de duração prolongada seriam capazes de promover efeitos benéficos ao organismo. Provavelmente este seja um dos motivos pelo qual o exercício acumulado é pouco explorado. Porém, muitos autores já relatam benefícios da prática da acumular sessões de exercício físico ao longo do dia, com destaque para a redução da concentração plasmática pós-prandial de triglicérides, aumento nos níveis circulantes de HDL e melhora do perfil lipídico, redução nos níveis da pressão arterial tanto em indivíduos normotensos quanto pré-hipertensos, aumento da aptidão cardiorrespiratória, redução da espessura de pregas cutâneas, diminuição da circunferência da cintura e do quadril, além de minimizar a ansiedade e melhorar o estado de humor e bem-estar psicológico.<sup>8,13,18,21-27</sup> Murphy et al.<sup>17</sup> sugerem ainda que acumular curtos períodos de exercício físico durante o dia é tão eficaz na ampliação do condicionamento e capacidade aeróbica em adultos sedentários de meia-idade quanto o exercício realizado do modo contínuo.

Entretanto, como já mencionado anteriormente, as ações benéficas do exercício físico sobre a função endotelial foram descritas apenas em modelos experimentais que utilizavam exercício contínuo ou intermitente. Contudo, diversos estudos realizados em cultura de células têm sugerido que os efeitos do cisalhamento sobre a produção local de diversos mediadores endoteliais podem variar dependendo do tempo em que estas células ficam expostas a este estímulo físico.<sup>50,54-57</sup> Neste sentido, é possível inferir que exposições a breves sessões de exercício de corrida em esteira, que se repetem ao longo do dia, podem influenciar de maneira distinta a função endotelial, se comparadas ao mesmo tipo de exercício praticado em uma sessão diária de 1 hora. Assim, o presente estudo objetivou verificar se o treinamento por exercício físico acumulado também é capaz de melhorar a função endotelial.

Para esta investigação utilizou-se o modelo de preparações isoladas de aortas de ratos. Esta opção deu-se pelo fato deste modelo experimental ser utilizado com muita frequência na investigação das adaptações vasculares induzidas pelo exercício físico praticado de modo contínuo (sessões diárias de aproximadamente 1 hora). Com efeito, existe um significativo corpo de dados na literatura<sup>40,43-46</sup> mostrando que o exercício praticado de forma contínua promove melhora da função endotelial, bem como descrevendo os mecanismos pelos quais isto se dá. Além disso, por ser um modelo animal, pode-se ter maior controle da regularidade com que este treinamento é realizado.

Todavia, para que se pudesse estabelecer qualquer comparação com o treinamento praticado de forma contínua, foram necessários indicadores da efetividade do treinamento praticado de forma acumulada. Por este motivo, todos os animais foram pesados tanto no início quanto no final do período de treinamento. Estas pesagens mostraram que o ganho de massa corporal total foi menor nos animais do grupo TEC em comparação aos animais do grupo SED e TEA. Embora os animais do grupo TEA tenham apresentado ganho de massa corporal menor em relação aos animais do grupo SED, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Quando as vísceras dos animais foram removidas, após o sacrifício dos mesmos, não se observou diferença na massa das carcaças entre os grupos. Isto sugere fortemente que o menor ganho de massa corporal observado no grupo TEC deveu-se ao menor acúmulo de gordura abdominal/visceral nestes animais.

Estes dados sugerem que o protocolo de TEA utilizado neste estudo não foi tão efetivo quanto o protocolo de TEC na redução do ganho de massa corporal. Estes dados conflitam o estudo prévio realizado com mulheres com sobrepeso e idade média de 42 anos, no qual foi demonstrado que após 8 semanas de treinamento físico, tanto o exercício aeróbico moderado realizado de modo contínuo, quanto realizado de modo acumulado, promoveram redução do peso e da porcentagem de gordura corporal, além de diminuir a circunferência da cintura e manutenção da massa magra.<sup>79</sup> Cabe ressaltar, no entanto, que estes autores consideraram 2 sessões semanais com duração de 80 a 100 minutos como sendo exercício contínuo e 5 sessões semanais com duração de 35 a 40 minutos, com gasto energético equivalente, como sendo exercício acumulado. Ainda, em pesquisa com mulheres jovens universitárias, o exercício físico acumulado foi capaz de exercer efeito equivalente ao exercício físico contínuo em relação à perda de peso.<sup>14</sup> Com efeito, o presente estudo não descarta em definitivo a efetividade do TEA no controle do ganho de massa corporal. Provavelmente, pequenos ajustes no protocolo experimental, como o menor fracionamento do tempo ou o aumento da

intensidade do exercício, possam evidenciar esta propriedade do TEA. Vale ressaltar também que esta análise ainda é superficial e carece ser complementada por metodologias mais específicas de avaliação da composição corporal.

Por outro lado, a efetividade do TEA foi constatada através da análise do desempenho físico dos animais na esteira, seis semanas após o início do protocolo de treinamento. Isto porque, a exemplo dos animais do grupo TEC, os animais do grupo TEA apresentaram melhora significativa de desempenho físico em esteira. Vale ressaltar também que, diferentemente dos animais TEC e TEA, os animais SED apresentaram piora de desempenho físico neste período. Aliás, o ganho de desempenho dos animais TEA na esteira foi comparável aos animais TEC, que corriam com menor massa corporal. Com efeito, é possível inferir que a performance dos animais TEA na esteira chegou a ser melhor em comparação aos animais TEC. Assim, a melhora de desempenho observada nos animais pertencentes aos grupos TEC e TEA não deixa de ser um indicativo de melhora do condicionamento físico. Estes dados estão de acordo com estudo prévio no qual se demonstrou que o exercício físico acumulado foi tão efetivo quanto o exercício praticado de forma contínua na melhora da capacidade aeróbica de jovens universitárias.<sup>14</sup>

Já está bem estabelecido que as ações biológicas do NO dependem de sua biodisponibilidade, que se caracteriza pelo balanço entre a sua produção e sua inativação pelas ERO's.<sup>80</sup> Além disso, estímulos que causam variações hemodinâmicas capazes de influenciar o cisalhamento que o sangue exerce sobre a parede vascular, podem influenciar a biodisponibilidade do NO.<sup>81</sup> De fato, o fluxo sanguíneo laminar pulsátil é protetor ao endotélio vascular por promover a expressão e/ou ativação de eNOS, bem como de enzimas endoteliais envolvidas na remoção de radicais livres, como a SOD, glutathione peroxidase (GPx) e peroxidase dependente de tioredoxina (TrXR2).<sup>82</sup> Ainda, segundo os estudos acima relacionados, o fluxo sanguíneo laminar pulsátil também atenua a expressão de enzimas pró-oxidantes, como as subunidades da nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato oxidase (NADPH oxidase). Além disso, ressaltam que o fluxo sanguíneo oscilatório, como ocorre nas bifurcações do leito cardiovascular, promove ações opostas sobre a expressão destas enzimas. Desta forma, em última instância, pode-se dizer que o cisalhamento decorrente do fluxo sanguíneo laminar pode levar ao aumento da produção e/ou da biodisponibilidade de NO e, consequentemente, da função endotelial.<sup>81,83</sup>

Os dados obtidos no presente estudo, contudo, mostram que a melhora do condicionamento físico, observada tanto nos animais TEC quanto TEA, aparentemente não

foi acompanhada por modificações significativas do grau de peroxidação lipídica. Isto porque os valores de TBARS determinados no plasma dos animais TEC e TEA não diferiram significativamente em relação aos animais SED. Com base nestes dados, infere-se que os protocolos de treinamento utilizados, se por um lado não melhoraram os mecanismos antioxidantes destes animais, por outro não levaram ao aumento da geração de radicais livres. Possivelmente, isto se deva ao fato dos animais pertencentes tanto aos grupos TEC quanto TEA terem sido expostos a exercícios de moderada intensidade no presente estudo.

Em seguida, passou-se então ao estudo funcional da reatividade vascular de aorta torácica. Nesta pesquisa, as preparações foram desafiadas com noradrenalina, cujas ações vasoconstritoras na aorta são mediadas principalmente por receptores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ -adrenérgicos, presentes na musculatura lisa destas preparações. Esta ação vasoconstritora, contudo, é contrabalanceada por mediadores de origem endotelial (com destaque para o NO) liberados mediante a estimulação, sobretudo dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, presentes no endotélio de preparações de aorta.<sup>84</sup> De tal forma, reduções de  $E_{m\acute{a}x}$  e/ou de  $pEC_{50}$  são evidências indiretas, porém consistentes, de melhora da função endotelial. Cabe resaltar que o oposto também é verdadeiro.

Deste modo, no presente estudo, as respostas das aortas à noradrenalina mostraram-se atenuadas nos animais TEC, fenômeno este caracterizado pela redução do  $E_{m\acute{a}x}$ . Ainda, esta redução de  $E_{m\acute{a}x}$  foi suprimida na presença de L-NAME e não foi observada na ausência do endotélio vascular. Com base nestes dados pode-se inferir que os animais submetidos ao exercício contínuo tiveram melhora da função endotelial em suas aortas. Além disso, com base em informações da literatura, também se pode inferir que esta melhora ocorreu pela maior eficiência de mecanismos endoteliais relacionados ao NO, possivelmente pelo aumento da expressão endotelial de NOS.<sup>32,40,42-46</sup> Corrobora esta inferência, o fato ter sido observado um incremento das respostas vasodilatadoras induzidas pela ACh nas aortas obtidas dos animais TEC. Com efeito, diversos autores relatam que o relaxamento da aorta de rato induzido pela ACh é quase totalmente dependente da liberação de NO decorrente da estimulação de receptores muscarínicos presentes no endotélio destes vasos.<sup>72</sup> Esta inferência é reforçada pelo fato da ACh não relaxar preparações de aortas deendotelizadas, ou seja, que tiveram seu endotélio removido. Assim, estudou-se também as respostas à noradrenalina em preparações de aortas deendotelizadas obtidas de ratos TEC. Chama a atenção o fato destas preparações deendotelizadas apresentarem valores aumentados de  $pEC_{50}$  e  $E_{m\acute{a}x}$  para noradrenalina. Curiosamente, este fenômeno parece estar ligado a mecanismos relacionados

aos receptores adrenérgicos, uma vez que as respostas ao KCl não estavam modificadas nos animais TEC. Este fenômeno não é relatado na literatura, mas reforça ainda mais o papel modulador do endotélio nestas preparações. O fato de não ter havido modificações perceptíveis nas respostas das preparações dos animais TEC ao KCl, permite afirmar que a capacidade contrátil da musculatura lisa destas preparações não foi modificada. Ainda, preparações de aorta do grupo TEC, pré-contraídas com Phe  $10^{-5}$  M, também foram estimuladas com NPS, uma substância capaz de fornecer NO a estas preparações, mesmo na ausência de endotélio vascular. O fato de o exercício contínuo ter reduzido as respostas das aortas à noradrenalina, mas não ao NPS, sugere que este protocolo de exercício aumenta a biodisponibilidade do NO nestas preparações, ao invés de aumentar as respostas da musculatura lisa a este mediador.

Por outro lado, os dados obtidos mostram que o TEA, diferentemente daquilo que se observou em relação ao TEC, não promove modificações significativas nas respostas da aorta tanto à noradrenalina quanto à ACh. O TEA também não modificou as respostas destas preparações ao KCl e ao NPS. Estes dados reforçam o entendimento de que o exercício, para que tenha efeitos benéficos sobre a função endotelial, precisa ser praticado com duração suficientemente longa de tempo. No entanto, o problema que persiste é saber qual o tempo necessário para que estas ações tidas como benéficas se instalem. Neste sentido, ao se observar atentamente o perfil das curvas concentração-resposta obtidas com noradrenalina nas aortas provenientes de animais TEA, pode-se notar ligeira redução de  $E_{máx}$ , porém, não estatisticamente significativa em comparação às obtidas em animais SED. Com base nesta observação, não está descartada a hipótese de que os efeitos do exercício sobre as aortas de ratos possam se acumular. Contudo, a intensidade do exercício acumulado imposto aos animais ou a duração das sessões (15 minutos) utilizadas no presente estudo pode não ter favorecido a detecção deste fenômeno. Reforça esta hipótese o fato de, tanto o L-NAME quanto a deendotelização das preparações, terem sido capazes de prevenir esta "tendência de redução" de resposta da aorta à noradrenalina, promovida pelo TEA. Na verdade, isto pode sugerir a participação de mecanismos endoteliais relacionados ao NO na modulação das respostas de preparações provenientes dos animais TEA à noradrenalina, a exemplo do que ocorre em relação aos animais TEC.

Com base no exposto, é possível inferir que sessões de exercício acumulado um pouco mais longas, ou mais intensas, sejam necessárias para modificar a função endotelial. Outra possibilidade é que, os efeitos do exercício acumulado possam ser evidenciados com mais

clareza em aortas de animais cuja função endotelial esteja patologicamente comprometida, como animais envelhecidos,<sup>46,51</sup> hipertensos<sup>85</sup> ou diabéticos.<sup>86,87</sup> Talvez, o exercício acumulado seja mais eficaz em reverter a disfunção endotelial, do que em melhorar a função endotelial em animais saudáveis.

Por fim, mesmo não tendo sido comprovado que o TEA tenha efeitos benéficos diretos sobre a função endotelial em aortas de ratos, o presente estudo não descarta a importância desta modalidade de exercício para a manutenção da saúde. Isto porque, além dos indícios de que alguma melhoria da função endotelial pode estar em curso, foram detectadas evidências de acentuada melhora do condicionamento físico destes animais comparável à melhora promovida pelo TEC. Com efeito, esta melhora do condicionamento físico promovida pelo TEA, faz com que esta modalidade de exercício possa ser utilizada como um “trampolim” para que as pessoas iniciem a prática de exercício físico.

## 6 CONCLUSÃO

Tanto o treinamento realizado pelo exercício contínuo quanto aquele realizado pelo exercício acumulado melhorou o condicionamento físico dos animais estudados, o que justificaria a utilização do exercício acumulado como incentivo para que as pessoas iniciem um programa de treinamento físico. No entanto, apenas o TEC foi capaz de reduzir o ganho de peso corporal dos animais, e melhorar diretamente a função endotelial em suas aortas. Com efeito, o presente estudo reforça o entendimento de que o exercício, para que tenha efeitos benéficos diretos sobre a função endotelial, precisa ser praticado com duração suficientemente longa de tempo.

## REFERÊNCIAS

1. Hardman AE. Accumulation of physical activity for health gains: what is the evidence? *Br J Sports Med.* 1999;33(2):87-92.
2. Nóbrega ACL, Freitas EV, Oliveira MAB, Leitão MB, Lazzoli JK, Nahas RM, Baptista CAS, Drummond FA, Rezende L, Pereira J, Pinto M, Radominski RB, Leite N, Thiele ES, Hernandez AJ, Araújo CGS, Teixeira JAC, Carvalho T, Borges SF, Rose EH. Posicionamento oficial da Sociedade Brasileira de Medicina do Esporte e da Sociedade Brasileira de Geriatria e Gerontologia: atividade física e saúde no idoso. *Rev Bras Med Esporte.* 1999;5(6):207-11.
3. Wisløff U, Støylen A, Loennechen JP, Bruvold M, Rognmo Ø, Haram PM, Tjønnå AE, Helgerud J, Slørdahl SA, Lee SJ, Videm V, Bye A, Smith GL, Najjar SM, Ellingsen Ø, Skjaerpe T. Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients: a randomized study. *Circulation.* 2007;115(24):3086-94.
4. Caspersen CJ, Powell KE, Christenson GM. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep.* 1985;100(2):126-31.
5. Perri MG, Anton SD, Durning PE, Ketterson TU, Sydeman SJ, Berlant NE, Kanasky WF Jr, Newton RL Jr, Limacher MC, Martin AD. Adherence to exercise prescriptions: effects of prescribing moderate versus higher levels of intensity and frequency. *Health Psychol.* 2002;21(5):452-8.
6. Hallal PC, Victora CG, Wells JC, Lima RC. Physical inactivity: prevalence and associated variables in Brazilian adults. *Med Sci Sports Exerc.* 2003;35(11):1894-900.
7. Larson EB, Wang L, Bowen JD, McCormick WC, Teri L, Crane P, Kukull W. Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older. *Ann Intern Med.* 2006;144(2):73-81
8. Haskell WL, Lee IM, Pate RR, Powell KE, Blair SN, Franklin BA, Macera CA, Heath GW, Thompson PD, Bauman A. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Med Sci Sports Exerc.* 2007;39(8):1423-34.
9. Rognmo Ø, Hetland E, Helgerud J, Hoff J, Slørdahl SA. High intensity aerobic interval exercise is superior to moderate intensity exercise for increasing aerobic capacity in patients with coronary artery disease. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2004;11(3):216-22.
10. Tordi N, Mourot L, Colin E, Regnard J. Intermittent versus constant aerobic exercise: effects on arterial stiffness. *Eur J Appl Physiol.* 2010;108(4):801-9.
11. Lucas RD, Denadai BS, Greco CC. Respostas fisiológicas durante o exercício contínuo e intermitente: Implicações para a avaliação e a prescrição do treinamento aeróbio. *Motriz rev educ fís.* 2009;15(4):810-20.



12. Murphy MH, Blair SN, Murtagh EM. Accumulated versus continuous exercise for health benefit: a review of empirical studies. *Sports Med.* 2009;39(1):29-43.
13. Blair SN, Kohl HW, Gordon NF, Paffenbarger RS Jr. How much physical activity is good for health? *Annu Rev Public Health.* 1992;13:99-126.
14. Schmidt WD, Biwer CJ, Kalscheuer LK. Effects of long versus short bout exercise on fitness and weight loss in overweight females. *J Am Coll Nutr.* 2001;20(5):494-501.
15. Asikainen TM, Miilunpalo S, Oja P, Rinne M, Pasanen M, Uusi-Rasi K, Vuori I. Randomised, controlled walking trials in postmenopausal women: the minimum dose to improve aerobic fitness? *Br J Sports Med.* 2002;36(3):189-94.
16. Miyashita M, Burns SF, Stensel DJ. Accumulating short bouts of running reduces resting blood pressure in young normotensive/pre-hypertensive men. *J Sports Sci.* 2011;29(14):1473-82.
17. Murphy M, Nevill A, Neville C, Biddle S, Hardman A. Accumulating brisk walking for fitness, cardiovascular risk, and psychological health. *Med Sci Sports Exerc.* 2002;34(9):1468-74.
18. Trost SG, Owen N, Bauman AE, Sallis JF, Brown W. Correlates of adults participation in physical activity: review and update. *Med Sci Sports Exerc.* 2002;34(12):1996-2001.
19. Padilla J, Wallace JP, Park S. Accumulation of physical activity reduces blood pressure in pre- and hypertension. *Med Sci Sports Exerc.* 2005;37(8):1264-75.
20. Dias-da-Costa JS, Hallal PC, Wells JC, Daltoé T, Fuchs SC, Menezes AM, Olinto MT. Epidemiology of leisure-time physical activity: a population-based study in southern Brazil. *Cad Saude Publica.* 2005;21(1):275-82.
21. Park S, Rink LD, Wallace JP. Accumulation of physical activity leads to a greater blood pressure reduction than a single continuous session, in prehypertension. *J Hypertens.* 2006;24(9):1761-70.
22. Strath SJ, Holleman RG, Ronis DL, Swartz AM, Richardson CR. Objective physical activity accumulation in bouts and nonbouts and relation to markers of obesity in US adults. *Prev Chronic Dis.* 2008;5(4):A131.
23. von Känel R. Accumulation of 30 min of moderately intense physical activity is a clinically meaningful treatment to reduce systolic blood pressure in prehypertension. *J Hum Hypertens.* 2008;22(7):444-6.
24. Miyashita M, Burns SF, Stensel DJ. Accumulating short bouts of brisk walking reduces postprandial plasma triacylglycerol concentrations and resting blood pressure in healthy young men. *Am J Clin Nutr.* 2008;88(5):1225-31.
25. Pate RR, Pratt M, Blair SN, Haskell WL, Macera CA, Bouchard C, Buchner D, Ettinger W, Heath GW, King AC, et al. Physical activity and public health. A recommendation from the

Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports Medicine. *JAMA*. 1995;273(5):402-7.

26. Mestek ML, Garner JC, Plaisance EP, Taylor JK, Alhassan S, Grandjean PW. Blood lipid responses after continuous and accumulated aerobic exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2006;16(3):245-54.

27. Boreham CA, Wallace WF, Nevill A. Training effects of accumulated daily stair-climbing exercise in previously sedentary young women. *Prev Med*. 2000;30(4):277-81.

28. Delp MD, O'Leary DS. Integrative control of the skeletal muscle microcirculation in the maintenance of arterial pressure during exercise. *J Appl Physiol*. 2004;97(3):1112-8.

29. Duncker DJ, Bache RJ. Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiol Rev*. 2008;88(3):1009-86.

30. Musch TI, Friedman DB, Pitetti KH, Haidet GC, Stray-Gundersen J, Mitchell JH, Ordway GA. Regional distribution of blood flow of dogs during graded dynamic exercise. *J Appl Physiol*. 1987;63(6):2269-77.

31. Musch TI, Haidet GC, Ordway GA, Longhurst JC, Mitchell JH. Training effects on regional blood flow response to maximal exercise in foxhounds. *J Appl Physiol*. 1987;62(4):1724-32.

32. Laughlin MH, Roseguini B. Mechanisms for exercise training-induced increases in skeletal muscle blood flow capacity: differences with interval sprint training versus aerobic endurance training. *J Physiol Pharmacol*. 2008;59 (Suppl 7):71-88.

33. Cheng CP, Herfkens RJ, Taylor CA. Inferior vena caval hemodynamics quantified in vivo at rest and during cycling exercise using magnetic resonance imaging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284(4):1161-7.

34. Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, Nishida K, Murphy TJ, Alexander RW, Nerem RM, Harrison DG. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol*. 1995;269(6 Pt 1):C1371-8.

35. Xiao Z, Zhang Z, Ranjan V, Diamond SL. Shear stress induction of the endothelial nitric oxide synthase gene is calcium-dependent but not calcium-activated. *J Cell Physiol*. 1997;171(2):205-11. Erratum in: *J Cell Physiol* 1998;174(1):144.

36. Cattaruzza M, Guzik TJ, Słodowski W, Pelvan A, Becker J, Halle M, Buchwald AB, Channon KM, Hecker M. Shear stress insensitivity of endothelial nitric oxide synthase expression as a genetic risk factor for coronary heart disease. *Circ Res*. 2004;95(8):841-7.

37. Golbidi S, Laher I. Exercise and the cardiovascular system. *Cardiol Res Pract*. 2012;2012:210852.

38. Inoue H, Taba Y, Miwa Y, Yokota C, Miyagi M, Sasaguri T. Transcriptional and posttranscriptional regulation of cyclooxygenase-2 expression by fluid shear stress in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(9):1415-20.

39. Di Francesco L, Totani L, Dovizio M, Piccoli A, Di Francesco A, Salvatore T, Pandolfi A, Evangelista V, Dercho RA, Seta F, Patrignani P. Induction of prostacyclin by steady laminar shear stress suppresses tumor necrosis factor- $\alpha$  biosynthesis via heme oxygenase-1 in human endothelial cells. *Circ Res.* 2009;104(4):506-13.
40. Spier SA, Laughlin MH, Delp MD. Effects of acute and chronic exercise on vasoconstrictor responsiveness of rat abdominal aorta. *J Appl Physiol.* 1999;87(5):1752-7.
41. Bruck H, Gössl M, Spitthöver R, Schäfers RF, Kohnle M, Philipp T, Wenzel RR. The nitric oxide synthase inhibitor L-NMMA potentiates noradrenaline-induced vasoconstriction: effects of the  $\alpha_2$ -receptor antagonist yohimbine. *J Hypertens.* 2001;19(5):907-11.
42. Howard MG, DiCarlo SE, Stallone JN. Acute exercise attenuates phenylephrine-induced contraction of rabbit isolated aortic rings. *Med Sci Sports Exerc.* 1992;24(10):1102-7.
43. Delp MD, McAllister RM, Laughlin MH. Exercise training alters endothelium-dependent vasoreactivity of rat abdominal aorta. *J Appl Physiol.* 1993;75(3):1354-63.
44. Jansakul C. Effect of swimming on vascular reactivity to phenylephrine and KC1 in male rats. *Br J Pharmacol.* 1995;115(4):587-94.
45. Chen HI, Chiang IP. Chronic exercise decreases adrenergic agonist-induced vasoconstriction in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol.* 1996;271(3Pt 2):977-83.
46. Donato AJ, Lesniewski LA, Delp MD. Ageing and exercise training alter adrenergic vasomotor responses of rat skeletal muscle arterioles. *J Physiol.* 2007;579(Pt 1):115-25.
47. Casey DP, Joyner MJ. Local control of skeletal muscle blood flow during exercise: influence of available oxygen. *J Appl Physiol (1985).* 2011;111(6):1527-38.
48. Mcallister, R.M., Jasperse, J.L., Laughlin, M.H. Nonuniform effects of endurance exercise training on vasodilation in rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 2005;98(2):753-761.
49. Mcallister, R.M., Newcomer, S.C., Laughlin, M.H. Vascular nitric oxide: effects of exercise training in animals. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2008;33(1):173-178.
50. Topper JN, Cai J, Falb D, Gimbrone MA Jr. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(19):10417-22.
51. Trott DW, Gunduz F, Laughlin MH, Woodman CR. Exercise training reverses age-related decrements in endothelium-dependent dilation in skeletal muscle feed arteries. *J Appl Physiol.* 2009;106(6):1925-34.
52. Linke A, Erbs S, Hambrecht R. Effects of exercise training upon endothelial function in patients with cardiovascular disease. *Front Biosci.* 2008;13:424-32.

553. Piepoli MF, Davos C, Francis DP, Coats AJ; ExTraMATCH Collaborative. Exercise training meta-analysis of trials in patients with chronic heart failure (ExTraMATCH). *BMJ*. 2004;328(7433):189.
54. Malek AM, Izumo S, Alper SL. Modulation by pathophysiological stimuli of the shear stress-induced up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Neurosurgery*. 1999;45(2):334-44; discussion 344-5.
55. Boo YC, Sorescu G, Boyd N, Shiojima I, Walsh K, Du J, Jo H. Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A. *J Biol Chem*. 2002;277(5):3388-96.
56. Morawietz H, Talanow R, Szibor M, Rueckschloss U, Schubert A, Bartling B, Darmer D, Holtz J. Regulation of the endothelin system by shear stress in human endothelial cells. *J Physiol*. 2000;525 Pt 3:761-70.
57. Ishibazawa A, Nagaoka T, Takahashi T, Yamamoto K, Kamiya A, Ando J, Yoshida A. Effects of shear stress on the gene expressions of endothelial nitric oxide synthase, endothelin-1, and thrombomodulin in human retinal microvascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(11):8496-504.
58. Nanjo H, Sho E, Komatsu M, Sho M, Zarins CK, Masuda H. Intermittent short-duration exposure to low wall shear stress induces intimal thickening in arteries exposed to chronic high shear stress. *Exp Mol Pathol*. 2006;80(1):38-45.
59. Melo RM, Martinho E Jr, Michelini LC. Training-induced, pressure-lowering effect in SHR: wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. *Hypertension*. 2003;42(4):851-7.
60. Chies AB, Corrêa FM, de Andrade CR, Rosa-e-Silva AA, Pereira FC, de Oliveira AM. Vascular non-endothelial nitric oxide induced by swimming exercise stress in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003;30(12):951-7.
61. Chies AB, de Oliveira AM, Pereira FC, de Andrade CR, Corrêa FM. Phenylephrine-induced vasoconstriction of the rat superior mesenteric artery is decreased after repeated swimming. *J Smooth Muscle Res*. 2004;40(6):249-58.
62. Yagi K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol*. 1998;108:101-6.
63. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95(2):351-8.
64. Chagas ACP, Laurindo FRM, Da Luz PL. (Org.) *Endotélio & Doenças Cardiovasculares*. 1a ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
65. Michel CC. Capillaries, caveolae, calcium and cyclic nucleotides: a new look at microvascular permeability. *J Mol Cell Cardiol*. 1998;30(12):2541-6.

66. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988;333(6174):664-6.
67. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993;329(27):2002-12.
68. Rapoport RM, Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res*. 1983;52(3):352-7.
69. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1989;83(5):1774-7.
70. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1998;38:97-120.
71. Hellsten Y, Nyberg M, Jensen LG, Mortensen SP. Vasodilator interactions in skeletal muscle blood flow regulation. *J Physiol*. 2012;590(Pt24):6297-305.
72. Vizioli EO, Spadin MD, Corrêa FM, Viaro F, Evora PR, Chies AB. Acetylcholine-induced aortic relaxation studied in salbutamol treated rats. *J Smooth Muscle Res*. 2005;41(5):271-81.
73. Garland CJ, Hiley CR, Dora KA. EDHF: spreading the influence of the endothelium. *Br J Pharmacol*. 2011;164(3):839-52.
74. Hambrecht R, Fiehn E, Weigl C, Gielen S, Hamann C, Kaiser R, Yu J, Adams V, Niebauer J, Schuler G. Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 1998;98(24):2709-15.
75. Varin R, Mulder P, Richard V, Tamion F, Devaux C, Henry JP, Lallemand F, Lerebours G, Thuillez C. Exercise improves flow-mediated vasodilatation of skeletal muscle arteries in rats with chronic heart failure. Role of nitric oxide, prostanoids, and oxidant stress. *Circulation*. 1999;99(22):2951-7.
76. Bauman AE, Reis RS, Sallis JF, Wells JC, Loos RJ, Martin BW; Lancet Physical Activity Series Working Group. Correlates of physical activity: why are some people physically active and others not? *Lancet*. 2012;380(9838):258-71.
77. Eguchi M, Ohta M, Yamato H. The effects of single long and accumulated short bouts of exercise on cardiovascular risks in male Japanese workers: a randomized controlled study. *Ind Health*. 2013;51(6):563-71.
78. Sedgwick MJ, Morris JG, Nevill ME, Barrett LA. The accumulation of exercise and postprandial endothelial function in boys. *Scand J Med Sci Sports*. 2014;24(1):11-9.
79. Sykes K, Choo LL, Cotterrell M. Accumulating aerobic exercise for effective weight control. *J R Soc Promot Health*. 2004;124(1):24-8.

80. Zanchi NE, Bechara LRG, Tanaka LY, Debbas V, Bartholomeu T, Ramires PR. Efeitos do treinamento físico aeróbico sobre a bioatividade do óxido nítrico e a vasodilatação aórtica. *Ver. bras. Educ. Fís. Esp.* 2006;20(4):239-47.
81. Kinlay S, Libby P, Ganz P. Endothelial function and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol.* 2001;12(4):383-9.
82. Marin T, Gongol B, Chen Z, Woo B, Subramaniam S, Chien S, Shyy JY. Mechanosensitive microRNAs-role in endothelial responses to shear stress and redox state. *Free Radic Biol Med.* 2013;64:61-8.
83. Gimbrone MA Jr, Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardena G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;902:230-9; discussion 239-40.
84. Bruck H, Gössl M, Spitthöver R, Schäfers RF, Kohnle M, Philipp T, Wenzel RR. The nitric oxide synthase inhibitor L-NMMA potentiates noradrenaline-induced vasoconstriction: effects of the alpha2-receptor antagonist yohimbine. *J Hypertens.* 2001;19(5):907-11.
85. Gu Q, Wang B, Zhang XF, Ma YP, Liu JD, Wang XZ. Contribution of renin-angiotensin system to exercise-induced attenuation of aortic remodeling and improvement of endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Pathol.* 2014;23(5):298-305.
86. Mota MM, da Silva TL, Fontes MT, Barreto AS, Araújo JE, de Oliveira AC, Wichi RB, Santos MR. Resistance exercise restores endothelial function and reduces blood pressure in type 1 diabetic rats. *Arq Bras Cardiol.* 2014;103(1):25-32.
87. Murias JM, Dey A, Campos OA, Estaki M, Hall KE, Melling CW, Noble EG. High-intensity endurance training results in faster vessel-specific rate of vasorelaxation in type 1 diabetic rats. *PLoS One.* 2013;8(3):e59678.

**APÊNDICES****APÊNDICE A – Escala de acréscimo de velocidade (Teste de esforço físico)**

<b>Velocidade (Km/h)</b>	<b>Tempo (min)</b>
0,3	3
0,6	3
0,9	3
1,2	3
1,5	3
1,8	3

## APÊNDICE B – Programa de treinamento dos grupos TEC e TEA

Pelo motivo da esteira ter capacidade máxima para 8 ratos, é necessária a divisão:

- TEC / TEA subgrupo 1 (5 ratos);
- TEC / TEA subgrupo 2 (6 ratos).

<b>TEC</b>	
<b>PERÍODO</b>	<b>GRUPO</b>
08h:30min às 09h:30min	TEC subgrupo 1
11h às 12h	TEC subgrupo 2

<b>TEA</b>	
<b>PERÍODO</b>	<b>GRUPO</b>
07h:45min às 08h	TEA subgrupo 1
08h às 08h:15min	TEA subgrupo 2
INTERVALO de 2h10min	
10h:25min às 10h:40min	TEA subgrupo 1
10h:40min às 10h:55min	TEA subgrupo 2
INTERVALO de 2h10min	
13h:05min às 13h:20min	TEA subgrupo 1
13h:20min às 13h:35min	TEA subgrupo 2
INTERVALO de 2h10min	
13h:40min às 14h:40min	TEC subgrupo 1
14h:40min às 15h:40min	TEC subgrupo 2
INTERVALO de 2h10min	
15h:45min às 16h	TEA subgrupo 1
16h às 16h:15min	TEA subgrupo 2



**APÊNDICE C – Solução nutritiva Krebs-Hanseleit (modificado)**

Para preparo de 1L de solução nutritiva de Krebs-Hanseleit (modificado):

<b>Sais</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Molaridade (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
NaCl	7,61	130
KCl	0,35	4,7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,16	1,18
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,25	1,17
NaHCO <sub>3</sub>	1,25	14,9
Glicose	2,00	11,1
CaCl <sub>2</sub>	0,18	1,6

- a) Pesar todos os sais, exceto a Glicose
- b) Colocar todos os sais (previamente pesados) em balão volumétrico de 1L
- c) Completar o volume com água deionizada
- d) Homogeneizar em agitador magnético
- e) Adicionar a Glicose e homogeneizar novamente
- f) Verificar o pH (ideal 7,4)