



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Beatriz Costa da Silva Boa

Efeitos de modificação dietética associada ou não a uma rotina de exercícios aeróbicos na microcirculação em modelo animal de obesidade exógena

Rio de Janeiro

2012

Beatriz Costa da Silva Boa

**Efeitos de modificação dietética associada ou não a uma rotina de exercícios aeróbicos
na microcirculação em modelo animal de obesidade exógena**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof^{ta}. Dra. Eliete Bouskela

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

B662 Boa, Beatriz Costa da Silva.

Efeitos de modificação dietética associada ou não a uma rotina de exercícios aeróbicos na microcirculação em modelo animal de obesidade exógena / Beatriz Costa da Silva Boa. – 2012.
75 f.

Orientadora: Eliete Bouskela.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Microcirculação - Teses. 2. Exercícios aeróbicos - Teses. 3. Obesidade - Teses. 4. Dieta hiperlipídica. 5. Doenças cardiovasculares - Teses. I. Bouskela, Eliete. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III Título.

CDU 613.25

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Beatriz Costa da Silva Boa

**Efeitos de modificação dietética associada ou não a uma rotina de exercícios aeróbicos
na microcirculação em modelo animal de obesidade exógena**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2012.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Eliete Bouskela (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Nivaldo Ribeiro Villela
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Paulo de Tarso Vera Farinatti
Instituto de Educação Física e Desportos - UERJ

Prof. Dr. Nils Erik Svensjö
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2012

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Maria Emilia e ao meu pai Alfredo que em todos os momentos de angústia sempre me acalmaram e estimularam a me superar todos os dias.

Às minhas companheiras e amigas de trabalho Ingrid, Priscila e Eliza por todos momentos difíceis que se tornaram engraçados devido à simpatia e carinho, sempre dispostas a me ajudar em todos os momentos.

À Maria das Graças companheira de trabalho e anjo que sempre esteve com um sorriso e calma para me ajudar nas minhas dúvidas e dificuldades.

A todos os meus amigos e companheiros de jornada que foram meus alicerces nesta nova e difícil etapa da minha vida.

À minha orientadora, Eliete Bouskela, cujo estímulo me levou a ultrapassar barreiras todos os dias desde o início de carreira.

Fé inabalável é somente aquela que pode encarar a razão face a face, em todas as épocas da humanidade.

Allan Kardec

RESUMO

BOA, Beatriz Costa da Silva. *Efeitos de modificação dietética associada ou não a uma rotina de exercícios aeróbicos na microcirculação em modelo animal de obesidade exógena*. 2012. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Alcântara Gomes. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

A obesidade atinge proporções epidêmicas em países industrializados e está relacionada a uma série de doenças metabólicas e circulatórias. Nesse contexto, a atividade física, tratamento não farmacológico da obesidade, acessível a diversas populações e está relacionada com a redução do risco cardiovascular mesmo. O objetivo deste trabalho foi avaliar, após mudança ou não da dieta, associação ou não a um programa de treinamento aeróbico (PTA) durante 8 semanas, a possível reversibilidade dos danos causados por uma dieta hiperlipídica por 12 semanas. Para tal, 120 hamsters machos da espécie *Mesocricetus auratus*, com massa corporal de 60 g, foram distribuídos em quatro grupos, cada um subdividido em três subgrupos, com dez animais para diferentes análises. Os grupos Obeso Controle (OBC) e Obeso Exercitado (OBEX) receberam a ração hiperlipídica por 20 semanas, com adição do PTA ao grupo OBEX nas últimas 8 semanas. Os Obeso Ração Padrão (OBRP) e Obeso Ração Padrão/Exercício (OBRP/EX) tiveram a ração modificada para comercial padrão e adição do PTA ao grupo OBRP/EX após as 12 semanas iniciais. Para as análises microcirculatórias, a bolsa da bochecha foi usada para determinação do número máximo de extravasamentos induzidos por 30 min de isquemia seguida de reperfusão e da reatividade microvascular após a aplicação tópica de acetilcolina e nitroprussiato de sódio. No sangue coletado foi avaliado o perfil lipídico, glicemias quinzenais e leptina. As expressões de eNOS e iNOS foram determinadas na aorta por imunoblotting e a composição corporal avaliada nos tecidos adiposos visceral, urogenital e retroperitoneal, retirados no dia do experimento. Os resultados foram analisados com os métodos o teste estatístico de análise de variância (One Way ANOVA - Teste de Kruskal-Wallis), seguido pelo pós-teste de Dunn. Resultados mostram que a modificação dietética, associada ou não ao PTA, reduziu significativamente a massa corporal ($p < 0,0001$), comprimento naso-anal ($p = 0,0011$) e tecido adiposo (visceral [$p < 0,0001$], urogenital [$p = 0,0004$] e retroperitoneal [$p = 0,0083$]). Nas análises sanguíneas não foram encontradas diferenças com relação ao perfil lipídico e glicemia, já na leptina houve uma redução significativa ($p = 0,0039$). A análise da reatividade microvascular mostrou melhora significativa na vasodilatação endotélio-dependente nos grupos submetidos à modificação dietética associada ou não ao PTA. Nas medidas de permeabilidade a macromoléculas houve redução significativa no número de extravasamentos nos grupos submetidos à modificação dietética associada ou não ao PTA, (5 min [$p = 0,0207$] e 10 min [$p = 0,0057$]). Houve um aumento na expressão de eNOS nos grupos submetidos à modificação dietética associada ou não ao PTA, em comparação ao grupo OBC ($p = 0,0352$). Os resultados mostraram que a modificação dietética, associada ao protocolo de treinamento aeróbico melhora a vasodilatação endotélio-dependente, aumenta a expressão da óxido nítrico sintase endotelial e reduz o número de extravasamentos induzidos por isquemia e reperfusão, mesmo sem melhoras nos marcadores bioquímicos tradicionais como glicemia e perfil lipídico.

Palavras-chave: Microcirculação. Exercícios aeróbicos. Obesidade. Dieta hiperlipídica. Doenças cardiovasculares.

ABSTRACT

Obesity is a growing public health problem reaching epidemic proportions in industrialized countries and an independent risk to metabolic and circulatory diseases. Physical activity is seen as a non-pharmacological treatment to obesity and its co-morbidities, accessible to the population. Physical benefits are not necessarily related to adiposity loss but on improvement of vascular hemodynamic. The objective of this work was to evaluate if changes on diet associated or not to an aerobic training program (AET) for 8 weeks could counteract damages on obese hamsters, elicited by high fat chow given during 12 weeks. One hundred and twenty male hamsters (*Mesocricetus auratus*) with body mass around 60g were distributed into four groups, subdivided into three subgroups with ten animals each for different analysis. Obese Control (OBC) and Obese + Exercise (OBEX) groups received high fat chow for 20 weeks, being the last one combined to AET. Groups Obese + Standard Chow (OBSC) and Obese + Standard Chow/Exercise (OBSC/EX) received high fat chow for 12 weeks, returned to the standard chow, being the last one combined to AET. The cheek pouch preparation was used to evaluate the maximum number of extravasations induced by 30 min ischemia followed by reperfusion and microvascular reactivity in response to topical applications of acetylcholine and sodium nitroprusside. Blood was collected for lipid profile, biweekly glycemia and leptin. On the day of the experiment, the aorta was excised for immunoblotting of eNOS and iNOS and the body composition was determined by collection of different adipose tissues. For statistical analysis Kruskal Wallis ANOVA for transversal analysis, followed by the Dunn post test. Results have shown that dietary modification associated or not to AET significantly reduced body mass ($p < 0.0001$), naso-anal length ($p = 0.0011$) and the amount of adipose tissues (visceral [$p < 0.0001$], urogenital [$p = 0.0004$] and retroperitoneal [$p = 0.0083$]) in treated groups. Blood analysis did not show any differences between groups in relation to lipid profile and glycemia. Leptin had a significant reduction in all treated groups ($p = 0.0039$). Microcirculatory analysis showed that groups subjected to dietary modification associated or not to AET had better endothelium-dependent responses after topical application of acetylcholine, in all concentrations ($10^{-8}M$ [$p = 0.0001$], $10^{-6}M$ [$p < 0.0001$] and $10^{-4}M$ [$p < 0.0001$]). For ischemia/reperfusion, animals subjected to AET associated or not to dietary modification had significantly lower number of leaks (5 min [$p = 0.0207$] and 10 min [$p = 0.0057$]). Immunoblotting assays of eNOS showed linear improvement after AET associated to dietary modification in comparison to obese control animals ($p = 0.0352$). Results have shown that the dietary modification and its association to an aerobic exercise training, could detect substantial improvement on the endothelial response and reduction in the number of leaks on ischemia/reperfusion. These modifications occurred without any significant changes on biochemical markers.

Keywords: Microcirculation. Aerobic exercise. Obesity. Hyperlipid chow. Cardiovascular diseases.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 1 – | Tipos de obesidade e suas repercussões para os pacientes. Na segunda coluna encontram-se os tratamentos indicados..... | 15 |
| Figura 2 – | Progressão das modificações vinculadas ao ganho de peso e à disfunção do tecido adiposo. | 16 |
| Figura 3 – | Via intracelular observada em indivíduos obesos, via IRS-PI3K. O aumento da via Ras/Rho, em detrimento da IRS-1, ocasiona um aumento da vasoconstrição..... | 24 |
| Figura 4 – | Desenho experimental..... | 31 |
| Figura 5 – | Protocolo experimental das 20 semanas de tratamento. Na 20ª semana, os animais foram submetidos aos procedimentos de análise da microcirculação, sacrifício e coleta de materiais para futuras análises..... | 31 |
| Figura 6 – | Esquema do protocolo da rotina de exercícios aeróbicos a partir da 12ª semana de tratamento. No esquema encontram-se as velocidades, os tempos e a angulação da esteira das últimas oito semanas de tratamento..... | 32 |
| Figura 7 – | Equipamento (Esteira Insight Equipamentos Científicos, Ribeirão Preto, São Paulo – Brasil) utilizado para rotina de exercícios aeróbicos..... | 33 |
| Figura 8 – | Bolsa da bochecha do hamster após o término da preparação feita com o estereomicroscópio. A preparação foi fixada com pinos de metal na placa de acrílico com anel de silicone..... | 35 |
| Figura 9 – | Preparação da bolsa bochecha do hamster durante isquemia local feita por um torniquete inflável colocado em sua parte proximal..... | 35 |
| Figura 10 - | Sistema de microscopia intravital utilizado para observação da preparação da bolsa da bochecha. R = Reservatório da solução de superfusão; S = Serpentina de aquecimento da solução; BP = Bomba de perfusão; H = Hamster, e, M = Microscópio intravital..... | 36 |
| Figura 11 - | Avaliação de massa corporal feita na semana de sacrifício..... | 43 |
| Figura 12 - | Medidas de comprimento naso-anal feitas no dia de experimentação..... | 44 |
| Figura 13 - | Medidas de glicemia quinzenais feitas a partir da veia safena com os animais em jejum..... | 45 |

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 14 - | Perfil lipídico realizado na vigésima semana de tratamento. Não foram detectadas diferenças entre os grupos..... | 46 |
| Figura 15 - | Medidas de leptina feitas a partir de soro coletado no dia da experimentação..... | 47 |
| Figura 16 - | Medidas de composição corporal feitas no dia do experimento..... | 48 |
| Figura 17 - | Reatividade microvascular em resposta a aplicações tópicas em concentrações crescentes de acetilcolina..... | 50 |
| Figura 18 - | Reatividade microvascular em resposta a aplicações tópicas em concentrações crescentes de nitroprussiato de sódio..... | 51 |
| Figura 19 - | Medidas de permeabilidade microvascular a macromoléculas mostraram diferenças significativas em relação aos grupos tratados em ambos os tempos de contagem: 5min e 10 min..... | 52 |
| Figura 20 - | Níveis de eNOS e iNOS a partir de extrato de aorta e quantificação por Western blott..... | 54 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|--|----|
| Tabela 1 – | Valores nutricionais da ração hiperlipídica e hipercalórica fabricada no laboratório..... | 34 |
| Tabela 2 – | Pós-teste de Dunn com comparações múltiplas entre grupos em relação aos valores de massa corporal..... | 43 |
| Tabela 3 – | Pós-teste de Dunn com comparações múltiplas entre grupos em relação aos valores de comprimento naso-anal..... | 44 |
| Tabela 4 – | Valóres médios±S.E.M. das dosagens de glicemia feitas nos animais tratados, em jejum, quinzenalmente..... | 45 |
| Tabela 5 – | Pós-Teste de Dunn com comparações múltiplas entre grupos em relação aos valores de leptina..... | 47 |
| Tabela 6 – | Pós-teste de Dunn com comparações múltiplas entre grupos em relação aos valores de pesagem dos tecidos adiposos viscerais, urogenitais e retroperitoneais..... | 49 |
| Tabela 7 – | Pós-teste de Dunn com comparações múltiplas entre grupos em relação aos valores médios de dilatação de arteríolas em resposta a aplicações tópicas de concentrações crescentes de acetilcolina..... | 50 |
| Tabela 8 – | Pós-teste de Dunn com comparações múltiplas entre grupos em relação aos valores médios de permeabilidade microvascular a macromoléculas após procedimento de isquemia e reperfusão, nos tempos 5 e 10 minutos..... | 53 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------|---|
| Ach | Acetilcolina |
| AET | Aerobic exercise training |
| AGL | Ácidos graxos livres |
| DE | Disfunção endotelial |
| HDL | Lipoproteína de alta densidade |
| IMC | Índice de massa corporal |
| I/R | Isquemia e reperfusão |
| LDL | Lipoproteína de baixa densidade |
| NO | Óxido nítrico |
| OBC | Grupo Obeso Controle |
| OBEX | Grupo Obeso + Exercício Aeróbico |
| OBRC | Grupo Obeso + Ração comercial padrão |
| OBRC/EX | Grupo Obeso + Ração comercial padrão associada à exercício aeróbico |
| PTA | Protocolo de treinamento aeróbico |
| SNP | Nitroprussiato de sódio |
| Tg | Triglicerídeos |
| TNF- α | Fator de necrose tumoral α |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| | INTRODUÇÃO | 13 |
| 1 | OBESIDADE | 15 |
| 1.1 | Modelos experimentais de obesidade | 17 |
| 1.2 | Descrição da microcirculação | 18 |
| 1.3 | Microcirculação e obesidade | 21 |
| 1.4 | Função endotelial | 23 |
| 1.5 | Atividade física | 24 |
| 1.6 | Exercício e a célula endotelial | 26 |
| 2 | OBJETIVOS GERAIS | 28 |
| 2.1 | Objetivos específicos | 28 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 29 |
| 3.1 | Grupos experimentais | 29 |
| 3.2 | Protocolo de treinamento aeróbico | 32 |
| 3.3 | Ração hiperlipídica | 33 |
| 3.4 | Metodologia | 34 |
| 3.4.1 | <u>Medida de reatividade microvascular</u> | 37 |
| 3.4.2 | <u>Medida de permeabilidade microvascular</u> | 37 |
| 4 | ANÁLISES SANGÜÍNEAS | 38 |
| 4.1 | Perfil lipídico | 38 |
| 4.2 | Avaliação de leptina | 39 |
| 5 | ANÁLISES TECIDUAIS | 39 |
| 5.1 | Análises teciduais | 39 |
| 5.1.1 | <u>Western blotting</u> | 40 |
| 5.2 | Análises de tecidos adiposos | 40 |
| 6 | ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 41 |
| 7 | RESULTADOS | 42 |
| 7.1 | Massa corporal | 42 |
| 7.2 | Comprimento naso-anal | 44 |
| 7.3 | Glicemia quinzenal | 45 |
| 7.4 | Perfil lipídico | 46 |
| 7.5 | Leptina | 47 |
| 7.6 | Composição corporal | 48 |

| | | |
|-------|---|----|
| 7.7 | Análises microcirculatórias | 49 |
| 7.7.1 | <u>Reatividade (endotélio-dependente)</u> | 49 |
| 7.7.2 | <u>Reatividade (endotélio-independente)</u> | 51 |
| 7.7.3 | <u>Permeabilidade microvascular à macromoléculas</u> | 52 |
| 7.8 | Análises teciduais | 53 |
| 7.8.1 | <u>Western Blott da aorta</u> | 53 |
| 8 | DISCUSSÃO | 55 |
| 8.1 | Peso e Composição corporal | 55 |
| 8.2 | Análises sanguíneas | 57 |
| 8.3 | Análises microcirculatórias | 60 |
| 8.3.1 | <u>Permeabilidade microvascular a macromoléculas</u> | 60 |
| 8.3.2 | <u>Reatividade Microvascular e Dosagem de eNOS e Inos</u> | 61 |
| 9 | SUMÁRIO DOS RESULTADOS | 63 |
| 10 | CONCLUSÃO | 64 |
| | REFERÊNCIAS | 65 |

INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica que se caracteriza por acúmulo excessivo de tecido adiposo que compromete a saúde do indivíduo [1], considerada atualmente um problema de saúde pública [2] com consequente aumento nos gastos públicos (entre 2 e 7%) em países desenvolvidos.

Desde a década de 80 a obesidade dobrou mundialmente e, em 2008, 1.5 bilhões de adultos foram diagnosticados como tendo sobrepeso e dentre estes 300 milhões de pessoas (homens e mulheres) são obesos. Em países industrializados, a obesidade é responsável por um número maior de mortes que a desnutrição, acometendo cerca de 30% da população adulta e cerca 25% da infantil [3].

Na etiologia da doença estão fatores cujas origens podem estar associadas a características genéticas, hormonais, endócrinas, nutricionais, hipotalâmicas, estilo de vida (aumento do sedentarismo e maus hábitos nutricionais), psicológicos e farmacológicos, que se manifestam individualmente ou se inter-relacionam e se potencializam mutuamente.

Há, ainda, o aumento da obesidade infantil, que triplicou nos últimos trinta anos, com consequente desenvolvimento de patologias nesta população suscetível. De fato, os indivíduos obesos estão mais suscetíveis ao diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, esteatose hepática, problemas respiratórios, neurodegeneração, doenças biliares e certos tipos de câncer [4].

O tecido adiposo é metabolicamente ativo, ou seja, secretam múltiplas proteínas com importantes efeitos metabólicos, as adipocinas, com importante papel na resistência insulínica e complicações cardiovasculares associadas à obesidade, com destaque para o tecido adiposo visceral ou central [5]. Dentre essas substâncias há aquelas que exercem ações inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6). Além disso, na obesidade, há infiltração de macrófagos no tecido adiposo ativado que contribui para o perfil inflamatório, descrito em pacientes portadores de obesidade visceral [6].

A adiponectina é abundante no sangue e tem sua origem no tecido adiposo. Em oposição às adipocinas pró-inflamatórias, os níveis de adiponectina estão reduzidos em indivíduos obesos, particularmente em portadores de obesidade visceral [7]. A adiponectina *in vitro* melhora a sinalização da insulina e protege contra a aterosclerose [8 e 9]. Os níveis reduzidos de adiponectina em pacientes com obesidade visceral podem ser um dos fatores responsáveis pelo perfil aterogênico e de resistência à insulina.

Pacientes obesos com excesso de tecido adiposo abdominal têm níveis elevados plasmáticos de proteína C reativa, de IL-6 e TNF- α e reduzidos de adiponectina. Está claro hoje, que não só as citocinas apresentadas acima, mas uma série de outras, dentre as quais IL-1 β (interleucina 1 beta), ligante 2 de quimiocina (CCL2) exercem papéis na obesidade, considerada como um estado de inflamação sistêmica.

O estado inflamatório na obesidade difere do paradigma conhecido usualmente na inflamação, tendo em vista que os sinais cardinais tradicionais vermelhidão, sudorese, calor e dor não se aplicam. Essas respostas estão vinculadas a uma clássica resposta associada a um aumento da taxa metabólica basal e representa uma resposta rápida do sistema imune pela presença de patógenos exógenos.

A resposta inflamatória da obesidade tem natureza diferente. Primeiro, o “gatilho” inflamatório é metabólico e causado pelo excesso de consumo de nutrientes (neste caso, a perda de peso estaria associada com a redução do estado inflamatório). Segundo, não só o “gatilho” metabólico, mas também o estímulo proveniente de células especializadas, os adipócitos, sustentam tal estado inflamatório (haja vista as citocinas mencionadas acima). A exposição deste estado inflamatório não se limita ao tecido adiposo, mas ocorre também no fígado [10], pâncreas [11], cérebro [12] e possivelmente músculo [13], todos inter-relacionados.

1 OBESIDADE

A obesidade pode ser classificada de acordo com o IMC (índice de massa corporal) em três patamares: grau I (IMC entre 30 e 34,9), grau II (IMC entre 35 e 39,9) e grau III (IMC > 40). Os graus de obesidade estão intimamente relacionados com a gravidade desta patologia, assim como os seus respectivos tratamentos (Figura 1). No grau I, os pacientes apresentam risco de desenvolver doenças metabólicas como diabetes tipo 2, cardiopatias, hipertensão e alto colesterol. No grau II, o risco do desenvolvimento de doenças metabólicas aumenta linearmente e a taxa de mortalidade sobe para 50%. No grau III ou obesidade mórbida, o risco sobe ainda mais e a taxa de mortalidade sobe para 90% [14]. O tratamento da obesidade consiste na avaliação do estado do paciente e o grau de extensão da sua patologia. No grau I, o tratamento aconselhado é modificação do estilo de vida e re-educação alimentar. No grau II, os mesmos tratamentos sugeridos para o grau I com prescrição medicamentosa e, no grau III, intervenções cirúrgicas.

| TIPOS DE OBESIDADE | | TRATAMENTOS |
|---|---|--|
| <p>30-34,9</p> <p>TIPO I</p> <p>Obesidade Grau I</p> | <p>Risco Moderado de diabetes tipo II, hipertensão, colesterol, cardiopatia.</p> | <p>I - MODIFICAÇÃO DO ESTILO DE VIDA (ADOTAR A PRÁTICA DE EXERCÍCIOS DIÁRIOS) E RE-EDUCAÇÃO ALIMENTAR</p> |
| <p>35 - 39,9</p> <p>TIPO II</p> <p>Obesidade Grau II</p> | <p>Risco Grave. Aumenta o risco das doenças associadas. O risco de mortalidade aumenta 50%.</p> | <p>II - MODIFICAÇÕES SUGERIDAS PARA O GRAU I E PRESCRIÇÃO MEDICAMENTOSA.</p> |
| <p>> 40</p> <p>TIPO III</p> <p>Obesidade Grau III ou obesidade mórbida</p> | <p>Risco Muito Grave. O risco de doenças associadas assim como a mortalidade aumenta 90%.</p> | <p>III - CIRURGIA</p> |

Figura 1: Tipos de obesidade e suas repercussões para os pacientes. Na segunda coluna encontram-se os tratamentos indicados.

A fisiopatologia da obesidade visceral está relacionada à mobilização prejudicada de ácidos graxos, que contribui para a resistência insulínica encontrada nesses indivíduos. O

tecido adiposo intra-abdominal hipertrofiado é caracterizado por um estado hiperlipolítico, resistente aos estímulos antilipolíticos da insulina [15 e 16]. Em humanos há uma correlação entre o acúmulo de gordura visceral e o acúmulo de ácidos graxos não-esterificados no fígado (Figura 2).

A elevada concentração de ácidos graxos livres no fígado e o excesso de gordura corporal estão associados ao maior número de distúrbios metabólicos, hormonais, inflamatórios e cardiovasculares, como intolerância à glicose, dislipidemia, hiperinsulinemia [17] e estresse oxidativo com redução crônica da disponibilidade do óxido nítrico [18], que no conjunto implicarão em maior acometimento do sistema cardiovascular e impacto negativo sobre os órgãos-alvo, particularmente sobre o eixo cárdio-renal [19].

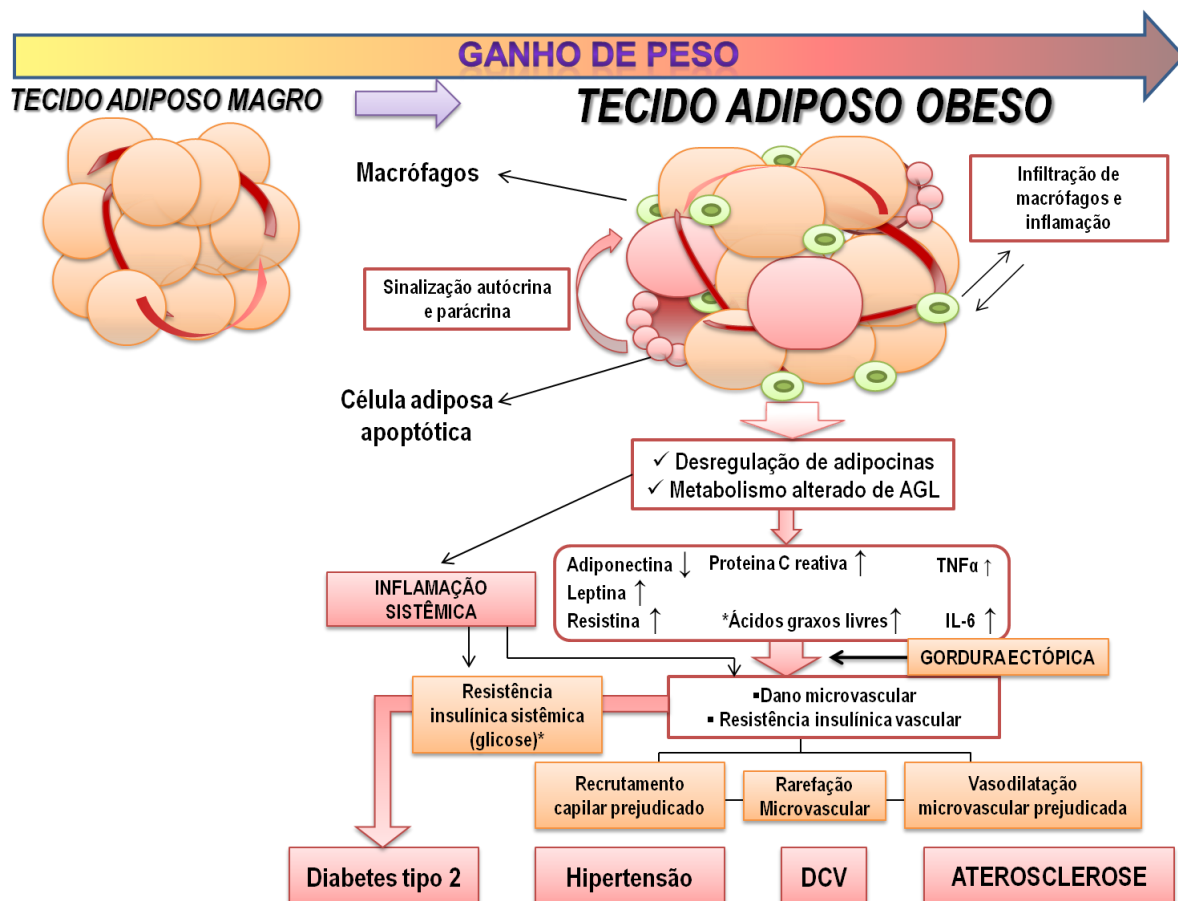


Figura 2: As modificações vinculadas ao ganho de peso e a disfunção do tecido adiposo.

1.1 Modelos experimentais de obesidade

Os modelos experimentais podem mostrar, de maneira controlada, o papel de cada um dos componentes de patologias como a obesidade e o diabetes mellitus e, desta maneira, fornecer subsídios para melhor compreensão e tratamento. Dentre os inúmeros modelos para se induzir experimentalmente obesidade destacam-se quatro: lesão do núcleo hipotalâmico ventromedial, ooforectomia, dietas hipercalóricas e modelos genéticos [20].

O modelo de lesão hipotalâmica é dividido em dois tipos: administração de glutamato monossódio (MSG) e lesão elétrica dos núcleos ventro-mediais do hipotálamo. A administração de glutamato monossódio é feita em ratos recém-nascidos, causa a destruição da região ventromedial do hipotálamo e núcleo arqueado e perda do controle entre a absorção e gasto energético. A lesão causada por estímulos elétricos é feita com eletrodos inseridos com uma corrente de 1.2 mA, duração de 4 s (repetido três vezes) e causa destruição bilateral do núcleo hipotalâmico.

A ooforectomia, ao contrário dos dois tipos anteriores, resulta da observação que mulheres, após a menopausa, apresentam uma série de modificações metabólicas, incluindo ganho de peso. Este modelo é usado para se ter uma compreensão melhor das modificações após o fim da idade fértil, e desenvolver estudos de intervenção que possam alterar o impacto da redução hormonal. A remoção das gônadas das ratas causa uma queda inicial nos níveis de leptina, correlacionado com um período de hiperfagia e significativo ganho de peso.

O modelo de obesidade induzido por dieta é o mais simples e, possivelmente, o que mais se aproxima da obesidade encontrada nos humanos. Existem inúmeros modelos para induzir obesidade via dieta que provaram ser eficientes. Algumas dietas utilizam valores hipercalóricos pela adição de carboidratos ou gordura, sendo que a maioria varia entre os valores calóricos de 3,7 Kcal/g e 5,4 Kcal/g. Todas as dietas são altamente palatáveis e induzem rapidamente obesidade. Esses modelos se baseiam na substituição da ração comercial padrão por ingredientes tais como maisena, leite condensado, banha de porco, gordura vegetal hidrogenada, entre outros.

Por último, o modelo genético de obesidade teve sua ascensão na década de 90 com o advento da clonagem e identificação de cinco genes. Além disso, nos últimos anos, animais “knockout” ou geneticamente modificados foram usados para estudar a obesidade. Existem cerca de 50 modelos genéticos de obesidade em roedores [21] e o primeiro dos cinco modelos

monogênicos de obesidade foi o diabético (db/db) e o obeso (ob/ob), ambos comprometendo a mesma via metabólica (Leptina).

1.2 Descrição da microcirculação

É na microcirculação que ocorre o principal propósito da circulação sanguínea que é o intercâmbio de nutrientes e excretas entre os tecidos e o sangue circulante. A microcirculação é composta por uma rede de vasos sanguíneos com diâmetro menores que 100 μm denominados arteríolas, vênulas, capilares e linfáticos. As arteríolas são microvasos derivados de ramificações provenientes das artérias. Possuem diâmetro interno variável e são revestidas por musculatura lisa, sendo também denominadas de vasos de resistência. As arteríolas tendem a se ramificar de duas a cinco vezes formando capilares. Podem existir, antes dos capilares, as arteríolas terminais ou metarteríolas que não apresentam revestimento muscular contínuo [22].

É através das arteríolas que o sangue inicia a perfusão da rede capilar, percorrendo as arteríolas terminais até alcançar os capilares. Na região onde há o início da formação dos capilares verdadeiros, pode existir o esfíncter pré-capilar, a última célula muscular lisa antes da circulação capilar, cuja função é realizar a abertura e o fechamento da entrada do leito capilar [23]. Os capilares são vasos extremamente delgados com estrutura constituída de uma única camada de células endoteliais, sendo sua parede vascular altamente permeável. A maior permeabilidade encontrada, entretanto, é nas vênulas pós-capilares (diâmetro de 9-16 μm). Os capilares são circundados por uma membrana basal externa, sem presença de musculatura lisa. Devido ao reduzido diâmetro capilar, as hemácias e demais células sanguíneas, como leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos, deformam-se para poder circular pelo lúmen. Os capilares com menor diâmetro são chamados de capilares verdadeiros [24]. Em sua parte terminal, os capilares unem-se para formar as vênulas pós-capilares, vasos também considerados de troca, que são possuidores de uma parede vascular composta por células endoteliais, sem musculatura lisa [24]. Após fluir pelas vênulas pós-capilares, o sangue percorre vênulas e veias, retornando ao coração.

As vênulas atuam como canais coletores, denominados canais de capacitância, têm um diâmetro maior que o das arteríolas correspondentes e uma camada muscular lisa menos espessa.

Existem vários procedimentos que servem para avaliar a microcirculação, dentre eles, os mais utilizados são a reatividade microvascular e a permeabilidade a macromoléculas. A reatividade microvascular é um parâmetro microcirculatório caracterizado pela resposta vascular a drogas vasoativas e à variação de volume circulante nos vasos. Sua análise é feita por meio da medição da variação de diâmetro dos microvasos. Dentre as diversas drogas, com efeito vasoativo, duas são usadas de rotina: a acetilcolina e o nitroprussiato de sódio.

O efeito vasodilatador da acetilcolina em vasos sanguíneos isolados necessita do endotélio com integridade estrutural e funcional, para que haja a homeostasia da parede dos vasos e da função circulatória [25]. A ativação dos receptores muscarínicos resulta na liberação de uma substância vasodilatadora (óxido nítrico) que se difunde pelo músculo liso provocando relaxamento [26]. O nitroprussiato de sódio (SNP) produz relaxamento do músculo liso por ativação da enzima guanilato ciclase e pelo aumento da produção de GMPcíclico e vasodilatação independente de dano ao endotélio. Além disso, o nitroprussiato de sódio age no sistema artério-venoso, sendo importante por avaliar de forma mais ampla a microcirculação [27].

Como caracterizado pelo grupo de Moncada [28], o óxido nítrico é um gás que em condições normais de temperatura e pressão apresenta uma estrutura com um radical livre com possibilidade de reagir com outras substâncias. Biologicamente, age como um metabolito que, por propriedades químicas, possui a tendência a se dissolver seletivamente em membranas biológicas e, também, na fase lipídica das células [29]. Hoje já se sabe que o óxido nítrico é sintetizado por uma enzima, a óxido nítrico sintetase (NOS) a partir do aminoácido arginina na presença de NADPH e do íon cálcio, em uma reação que envolve dois graus de mono-oxigenação. O primeiro é a formação do N^w-hidroxiarginina usando uma molécula de O₂ e uma molécula de NADPH na presença de tetrahidrobiopterina. O segundo grau é a oxidação na N^w-hidroxiarginina que forma citrulina e óxido nítrico [30]. Assim, a diminuição do relaxamento vascular encontrado em modelos experimentais de diabetes e em pacientes pode ser causada por uma diminuição da produção de óxido nítrico pelas células endoteliais; por um aumento na velocidade de fragmentação do próprio, isto é, diminuição de sua vida média; uma insensibilidade ao óxido nítrico adquirida pelas células musculares lisas

da parede dos vasos; ou por um aumento da produção dos fatores de contração também derivados das células endoteliais, que possuem efeitos opostos ao óxido nítrico.

A determinação da permeabilidade capilar ocorre por meio de três parâmetros: a taxa de difusão de solutos através da parede vascular; a área da membrana de troca e a diferença de concentração entre os meios intra e extracelulares. A troca entre o plasma e o meio extravascular é determinada pelas propriedades físicas da membrana vascular e, sobretudo, pelo desequilíbrio entre as forças oncóticas e hidrostáticas atuantes nesses meios [31]. A exsudação de proteínas plasmáticas e outras macromoléculas ocorre através das junções intercelulares das células endoteliais, exclusivamente nas vênulas pós-capilares não sendo observadas nas arteríolas, capilares ou vênulas [32]. As junções intercelulares respondem à ativação, contraindo-se, o que promove a separação das células endoteliais e a permissão para que as macromoléculas possam extravasar da microcirculação [33].

Em casos de inflamação aguda ou em momentos seguintes à aplicação tópica de fármacos como a histamina, bradicinina, prostaglandinas [34], leucotrienos [35] ou endotoxinas bacterianas [36 e 37], a permeabilidade vascular a macromoléculas aumenta nas vênulas pós-capilares, sendo um evento importante nas reações inflamatórias e na formação de edema [38]. Este aumento da permeabilidade vascular é totalmente reversível, sendo também dependente da concentração do íon cálcio e de filamentos de actina e miosina intracelulares [39].

A permeabilidade a macromoléculas na microcirculação pode ser avaliada através da observação dos pontos de extravasamento formados por moléculas fluorescentes injetadas por via intravascular e distribuídos por toda a circulação sistêmica. Além disso, pode ser avaliada através da microscopia intravital usando luz fluorescente e visualização dos pontos de extravasamento do marcador FITC-dextrana diretamente, tornando possível a correlação entre os pontos de extravasamento e a morfologia microvascular. O FITC-dextrana é disponível em vários pesos moleculares, mas o usado em estudos experimentais de permeabilidade a macromoléculas é o de 150000, ideal por ser facilmente detectável ao microscópio devido a sua intensidade fluorescente, mesmo em pequenas concentrações [40].

O modelo experimental utilizado no trabalho foi o da bolsa da bochecha de hamsters. Essa técnica é amplamente utilizada em estudos que quantificam danos oxidativos na microcirculação, avaliando o aumento da permeabilidade a macromoléculas, a reatividade microvascular, adesão leucocitária, entre outros. A bolsa da bochecha consiste em invaginações bilaterais da mucosa oral em forma de sacos membranosos, reversíveis,

transparentes e altamente vascularizados, que se prolongam no tecido subcutâneo até a região dos ombros. Na região próxima à inserção oral, a parede da bolsa é revestida por fibras musculares longitudinais e por um longo músculo retrator. As bolsas são irrigadas por ramos provenientes da artéria carótida externa [41] e por serem constituídas de tecido conjuntivo transparente, pode-se observar o leito microcirculatório da preparação. Uma característica importante, é que a bolsa da bochecha não possui vasos linfáticos ou linfonodos [42]. O estudo experimental só foi possível porque estas preparações são bastante sensíveis à aplicação tópica de drogas vasoativas e outras substâncias terapêuticas, além de ser um modelo experimental que permite a observação do leito microcirculatório *in vivo*.

1.3 Microcirculação e obesidade

A microcirculação e a célula endotelial apresentam funções essenciais para a manutenção da homeostase. Em condições normais, o endotélio é uma camada única de células organizadas em forma de fuso que separa o sangue da parede vascular e é responsável pela manutenção da homeostase microvascular, respostas inflamatórias e crescimento dos vasos [43]. A disfunção microvascular é um evento precoce na obesidade e provavelmente secundário à disfunção endotelial e rarefação capilar. A disfunção endotelial pode comprometer características funcionais do endotélio vascular associadas com diabetes e doenças cardiovasculares, mudanças na vaso-regulação, aumento na produção de intermediários de espécies reativas de oxigênio, ativação inflamatória, e função de barreira alterada [44]. Existem vários estudos que sugerem que a produção aumentada de radicais livres no diabetes mellitus pode ser a causa mais provável da inativação do óxido nítrico [45].

Há indicação que a maior parte dos tipos de célula da parede vascular, incluindo o endotélio e as células musculares lisas são capazes de sintetizar quantidades significativas de radicais livres, sendo a espécie mais produzida por estes tipos de célula o íon superóxido. Devido à alta concentração de superóxido dismutase presente nos tecidos, forma-se peróxido de hidrogênio [46]. Os radicais hidroxila, partículas extremamente reativas, são derivados da reação de peróxido de hidrogênio e íon ferro reduzido (Fe^{++}) ou resultam da reação do íon peróxido com óxido nítrico (NO) formando o peroxinitrito (ONOO^-).

No sistema vascular, o único tipo de célula que se acredita capaz de produzir a enzima xantina oxidase parece ser a célula endotelial. Na forma desidrogenase, essa enzima faz a oxidação da hipoxantina à xantina e o ácido úrico é ligado à redução de NAD^+ a NADPH . Na forma oxidase, o metabolismo da hipoxantina resulta na redução de O_2 a íon superóxido e H_2O_2 . Estímulos como hipóxia e reoxigenação parecem aumentar a atividade da xantina oxidase. Além disso, os metabólitos produzidos nos tecidos durante a hipóxia como o lactato (vindo da glicólise anaeróbica) e a hipoxantina (da degradação do ATP) servem de substrato para a produção de O_2 pela parede vascular. Um dos sistemas mais sensíveis regulados por H_2O_2 é a estimulação da produção de prostaglandinas e a atividade da guanilato ciclase do citosol. A inativação do NO e a inibição da estimulação da forma citosólica da guanilato ciclase são processos muito sensíveis à elevação do nível de íon peróxido.

Algumas doenças ligadas à expressão de processos de oxidação, como o diabetes [47], estão também associadas a um aumento do papel das prostaglandinas de contração.

Atualmente, está claro que a disfunção microvascular afeta a pressão e padrões de fluxo e é responsável por conseqüências para a resistência vascular periférica, e também por mudanças mediadas pela insulina na perfusão muscular e metabolismo da glicose [48].

O aumento da vasoconstrição e a redução das respostas vasodilatadoras podem ser demonstrados na microcirculação de indivíduos obesos. Rarefação nas arteríolas e capilares dentro dos leitos vasculares em vários tecidos (músculo e pele) também é observada [49 e 50]. Além disso, problemas microcirculatórios em obesos sugerem que isso poderia ser um fator causal em patologias associadas com o diabetes como resistência insulínica e hipertensão [51].

Como mencionado anteriormente, os adipócitos podem influenciar todo o balanço energético corporal modulando seu metabolismo. O tecido adiposo secreta várias substâncias como AGL (ácidos graxos livres), $\text{TNF-}\alpha$, leptina e adiponectina que podem influenciar a função microvascular. A exposição crônica aos AGL pode estar relacionada com o estado de resistência à insulina, responsável pela repressão da lipólise que prejudica a função vascular em vasos de resistência em humanos e na microvasculatura de ratos [52].

1.4 Função endotelial

As células endoteliais são uma barreira única de células de um órgão multifuncional dinâmico localizado na interface entre elementos sanguíneos e tecidos extra-vasculares. As funções endoteliais são definidas por cinco características fenotípicas: permeabilidade vascular, tônus vascular, coagulação e trombólise, respostas inflamatórias e crescimento vascular [53]. Além disso, em condições fisiológicas ainda é responsável por preservar a fluidez de membrana, fluxo sanguíneo laminar e inibir a proliferação celular, migração e também gerar e liberar o óxido nítrico, um fator vasodilatador. O óxido nítrico produzido ativa a guanilato ciclase (GCs), mantém o tônus vascular que é fator determinante para a regulação do fluxo e pressão sanguínea. A via de sinalização IRSPI3K é um fator chave para a produção de óxido nítrico e, como em outros tecidos, o excesso de nutrientes rapidamente induz inflamação endotelial. Em resposta, a sinalização IRS-PI3K e produção de óxido nítrico são inibidas. Sendo assim, a resposta da vasculatura ao excesso de nutrientes é um reflexo da observada em outros tecidos, e oferece um link plausível entre o excesso de nutrientes e doenças cardiovasculares (Figura 3). A enzima responsável pela produção de óxido nítrico é a óxido nítrico sintase (NOS2) constantemente ativada pela força de cisalhamento produzida pela circulação sanguínea.

A disfunção endotelial, clínica e experimentalmente, é definida como alterações no relaxamento vascular por redução de fatores protetores do endotélio, como o óxido nítrico (NO), prostaciclina e outros (Figura 3). A ativação endotelial, seguida por disfunção, predispõe a um estado constritor, inflamatório e coagulante, de maneira a alterar a homeostase vascular com consequente estado pró-aterogênico. Esse distúrbio fisiológico é caracterizado como um evento precoce na doença arterial, associado ao desenvolvimento de alterações associadas com a reatividade microvascular e endotelial antes de serem observadas alterações estruturais, não só em adultos, mas também em crianças [54, 55 e 56]. Estudos realizados por Meyers e colaboradores [57 e 58] sugerem que as anormalidades estruturais e funcionais já são evidentes em crianças obesas em idades entre 9 e 12 anos, com espessura íntima-média nos vasos, disfunção endotelial e altos níveis de marcadores de ativação endotelial. Além disso, a disfunção endotelial é associada a diversos fatores de risco como resistência á insulina, diabetes mellitus, hipercolesterolemia, hipertensão arterial, envelhecimento e obesidade [59]. O excesso de gordura está intrinsecamente relacionado com a disfunção microvascular, pois induz doença vascular periférica, com diminuição da perfusão periférica

nos tecidos e membros, causando também edema e perda progressiva da função e viabilidade do tecido [60].

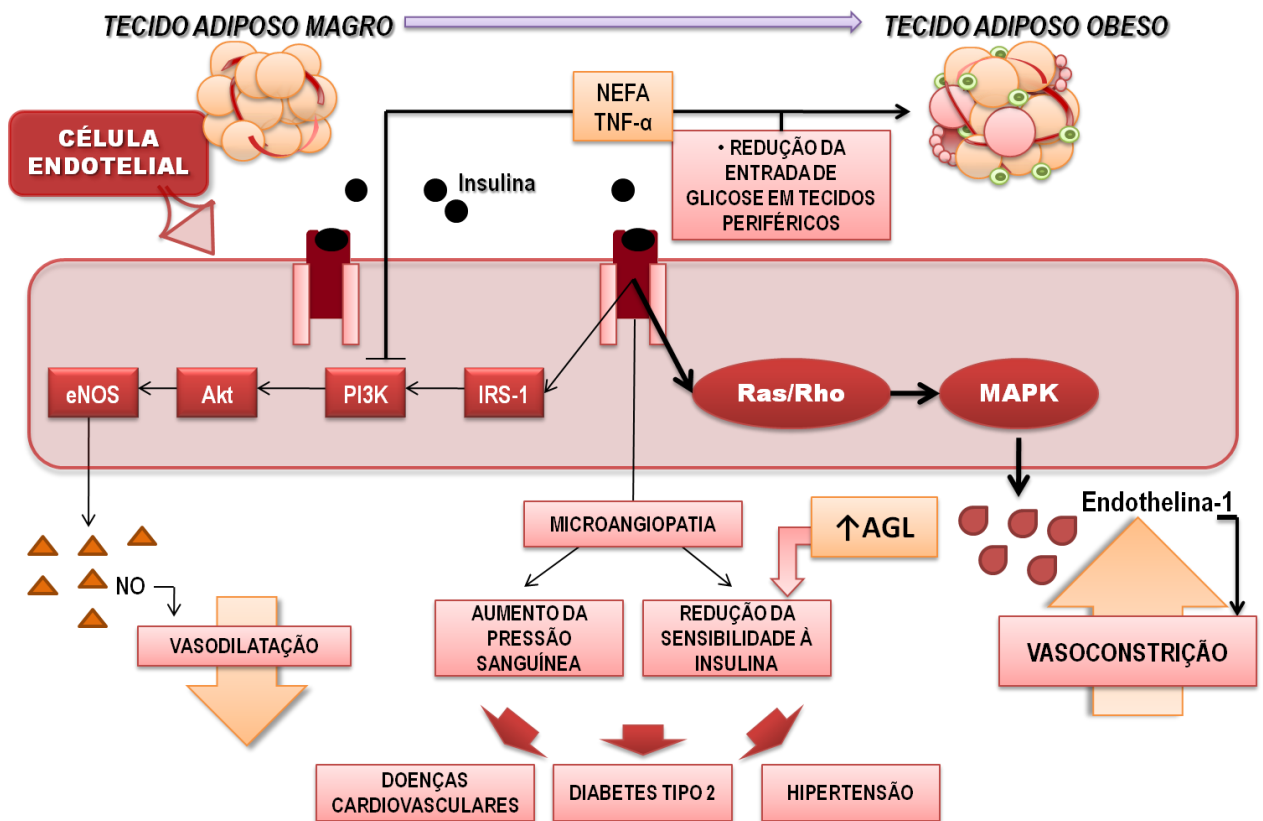


Figura 3: Via intracelular desencadeada em indivíduos obesos, por meio da via IRS-PI3K. Aumento da via Ras/Rho em detrimento da IRS-1 ocasiona um aumento da vasoconstrição.

1.5 Atividade física

A inatividade física teve seu auge no mundo ocidental nas últimas décadas e as mudanças tecnológicas reforçam este cenário [61]. Estima-se que o sedentarismo é responsável por aproximadamente um terço das mortes por doença coronária, câncer de cólon e diabetes tipo 2 [62]. Portanto, a inatividade física é um fator chave na etiologia e progressão de doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares e metabólicas. Em adição, a característica da sociedade moderna, de baixo gasto energético diário, com saldo constantemente positivo da balança energética, as conseqüências da inatividade física parecem ser piores. A plethora de evidências a partir de estudos ocupacionais, tempo de lazer e taxas de “fitness” suportam uma associação inversa, forte, e independente entre a atividade física e saúde com relação às doenças cardiovasculares (DCV) e, sobretudo, a mortalidade em

indivíduos aparentemente saudáveis e naqueles com DCV documentadas [63]. Exercícios regulares estão associados com a redução de eventos vasculares primários [64] e secundários [65]. Programas de alta e baixa intensidade mostraram respostas em termos de redução de adiposidade e melhoras de diversos fatores de risco metabólicos como triglicerídeos, HDL-c, insulina e HOMA-IR quando ambos os regimes utilizaram o mesmo gasto energético [66]. Independentemente da maior parte dos dados, resultados controversos em programas de exercícios de baixa [67] e alta [68] intensidades tiveram efeitos moderados em termos de aumento dos níveis de HDL-c. Apesar de existirem inúmeros protocolos de exercícios aeróbicos crônicos esses estão, normalmente, associados a um corte calórico significativo e expõe o animal a uma alta intensidade. Protocolos aeróbicos de baixa intensidade são utilizados para exposições agudas. Adiciona-se a isso o fato de que essas intervenções estão acompanhadas de reduções calóricas significativas, não mimetizando, de fato, uma dieta de acompanhamento nutricional.

Os efeitos do exercício na função endotelial são relacionados ao estímulo provocado pela força de cisalhamento (“shear stress”). Esse estímulo é relacionado a vários outros no endotélio em termos de aumento na atividade da enzima óxido nítrico sintase (eNOS) e aumento da expressão da óxido nítrico sintase endotelial fosforilada (eNOS-P), Akt. Adiciona-se a isto a maior produção de óxido nítrico (NO) e redução do estado inflamatório.

Existem alguns riscos associados à prática de exercícios físicos, o mais óbvio seria a lesão da musculatura esquelética, e existem preocupações de profissionais da área que mudanças repentinas no status do exercício possam exacerbar complicações microvasculares e macrovasculares em pacientes diabéticos. Portanto, cuidados como risco-benefício individualizado por paciente, e regimes que têm incremento de intensidade com o tempo [69] devem ser considerados. Há uma falta de concordância na população sedentária com relação aos regimes de exercício envolvendo o esforço para a execução do protocolo. Os motivos abrangem o grau de dificuldade, falta de diversão, falta de confiança e intimidação pelo ambiente de academia. Exercícios de menor intensidade têm maior aderência por parte dos pacientes e, conseqüentemente, uma maior taxa de sucesso em termos de benefícios. A intensidade do exercício tem que ser graduada e adequada individualmente. A FITT (frequência, intensidade, tipo e tempo) para indivíduos com sobrepeso recomendada pela “American College of Sports Medicine”, 2007 [70] estipula:

- Frequência: 3-5 dias na semana com gasto total energético de 1000-2000 kcal por semana.
- Duração: 20-60 minutos por sessão com gasto total > de 300 kcal por dia.

- Intensidade: 55-90% do limite de taxa de batimentos cardíacos alcançados por meio de teste de esforço.
- Tipo de exercício: Exercícios resistidos e atividades aeróbicas de maneira prolongada (corrida, ciclismo e caminhada). Uma mistura dos tipos de exercício pelo menos 2-3 vezes por semana.

Os exercícios trazem benefícios enormes para os indivíduos em especial para pacientes obesos, porém modificações no estilo de vida são difíceis de serem alcançadas.

1.6 Exercício e a célula endotelial

O exercício físico por meio da força de cisalhamento (“shear stress”) propicia um aumento dos estímulos agonistas endoteliais revertido em uma maior vasodilatação endotélio-dependente. A mudança na vasodilatação endotélio-dependente induzida por acetilcolina é diretamente relacionada com o estímulo da força de cisalhamento/fosforilação Akt dependente da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) na serina-1177 [71]. Níveis fisiológicos da força de cisalhamento atuam como estímulo para a diferenciação de células endoteliais de veias umbilicais humanas para induzir um fenótipo protetor, anti-aterogênico onde há “up regulation” de genes *in vitro* similares aos expressos em células endoteliais *in vivo* [72]. O “laminar shear stress” (LSS) é responsável por estimular a expressão de pelo menos 107 genes em muitas artérias [72]. Os genes endoteliais regulados especificamente pelo LSS inclui molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1), ciclooxigenase 2, eNOS, SMAD6, TGF- β 1, Cu/Zn superóxido dismutase (SOD), trombomodulina, aldeído desidrogenase-6, heme-oxigenase-1, entre outros. Interessantemente, os genes regulados pelo “shear stress” pertencem a um número limitado de grupos funcionais que incluem genes relacionados com: metabolismo oxidativo, inflamação, apoptose, crescimento/proliferação e diferenciação celular. Isso sugere que o fluxo é um importante estímulo biomecânico que exerce regulação da expressão endotelial *in vivo* e que os genes estimulados por “shear stress” exercem um papel na manutenção da homeostase endotelial *in vivo*.

A acetilcolina provoca um aumento da $[Ca^{2+}]$ endotelial e concomitantemente da vasodilatação. Nas células endoteliais, a enzima óxido nítrico sintase localiza-se nas caveolas com uma configuração translacional acetilada. Nesta configuração, a NOS é negativamente regulada pela caveolina, porém, ao ser estimulada por agonistas (como a acetilcolina e

bradicinina) há a dissociação do complexo caveolina/NOS. A liberação de cálcio, e sua conseqüente ligação com a caveolina, são responsáveis pela dissociação do complexo, que permite a ativação da NOS e produção do óxido nítrico. O óxido nítrico estimula a guanilato ciclase com conseqüente produção de GMPcíclico (GMPc). Posteriormente há ativação da proteína quinase dependente de GMPc responsável por um aumento da extrusão de cálcio do citosol da célula muscular lisa vascular e, inibição da maquinaria contrátil da vasculatura [73]. Nos indivíduos obesos, a vasodilatação provocada pela acetilcolina com concomitante liberação de cálcio está prejudicada. O exercício, juntamente com o maior estímulo provocado pelo “shear stress”, é responsável por aumentar a sinalização de vasodilatação acetilcolina/ Ca^{2+} /NO. Isso ocorre por um aumento da resposta do cálcio e, conseqüentemente, aumento da vasodilatação endotélio-dependente provocada pela liberação de óxido nítrico [74].

2 OBJETIVOS GERAIS

Foram utilizados procedimentos de intervenção singulares, tendo em vista que não houve intervenções de alta intensidade ou de grandes restrições calóricas. O objetivo deste trabalho foi avaliar, após a indução de uma obesidade exógena causada pelo uso de uma ração hiperlipídica, os efeitos na microcirculação, de uma mudança ou não desta dieta e sua associação ou não a um programa de treinamento aeróbico (PTA) durante as últimas 8 semanas, observando a possível reversibilidade dos danos causados por alimentação com dieta hiperlipídica por 12 semanas.

2.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram testar os efeitos da mudança ou não da dieta e associação ou não a um programa de treinamento aeróbico (PTA) durante 8 semanas sobre:

- 1.** A reatividade microvascular endotélio-dependente e independente;
- 2.** A indução da permeabilidade a macromoléculas induzida por isquemia/reperfusão;
- 3.** A expressão de eNOS e iNOS;
- 4.** IMC, depósitos de gordura, perfil lipídico e glicemia.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados para o projeto 120 machos adultos da espécie *Mesocricetus auratus*, com massa corporal inicial em torno de 60 g. Esses animais foram provenientes de colônias de criação da ANILAB (Paulínia, São Paulo). Os animais foram utilizados logo após o período do desmame (aproximadamente 23 dias após o nascimento). Durante todo o período de tratamento, os animais foram mantidos em um ambiente com temperatura controlada a 20°C com ciclo diurno/noturno de 12h mantido por temporizador. Todos os grupos foram tratados com ração de alto teor lipídico (a composição da ração encontra-se na tabela 1). Dando prosseguimento ao tratamento alguns grupos tiveram a dieta alterada para ração isocalórica (*Nutrilab*, Mercavet, Belo Horizonte, MG, Brasil) associada ou não ao treinamento aeróbico (Figura 6).

3.1 Grupos experimentais

Os hamsters foram aleatoriamente distribuídos em quatro grandes grupos, Obeso controle (OBC), Obeso Exercitado (OBEX), Obeso + Ração Comum (OBRC), Obeso + Ração Comum/Exercícios (OBRCEX). Esses grupos foram subdivididos em três grupos de experimentos/procedimentos: Acetilcolina (Ach), Nitroprussiato de Sódio (SNP), Isquemia/Reperusão (I/R).

✚ Grupo OBESO CONTROLE (OBC; n=30) – Animais que ingeriram a ração hiperlipídica durante as 20 semanas de tratamento.

✓ Grupo Obeso Controle 1 (n=10) - reatividade microvascular avaliada por aplicação tópica de acetilcolina (Ach);

✓ Grupo Obeso Controle 2 (n=10) - reatividade microvascular avaliada por aplicação tópica de nitroprussiato de sódio (SNP);

- ✓ Grupo Obeso Controle 3 (n=10) - avaliação do número máximo de extravasamentos induzidos por isquemia/reperfusão.
- ✚ Grupo OBESO + EXERCÍCIO (OBEX; n=30) – Animais que ingeriram a ração hiperlipídica por 20 semanas associada, nas últimas oito semanas, a um programa de exercícios aeróbicos (P.T.A.).
- ✓ Grupo Obeso+Exercício 1 (n=10) - reatividade microvascular avaliada por aplicação tópica de acetilcolina (Ach);
- ✓ Grupo Obeso+ Exercício 2 (n=10) - reatividade microvascular avaliada por aplicação tópica de nitroprussiato de sódio (SNP);
- ✓ Grupo Obeso+ Exercício 3 (n=10) - avaliação do número máximo de extravasamentos induzidos por isquemia/reperfusão.
- ✚ Grupo OBESO + RAÇÃO PADRÃO (N=30) – Grupo que foi tratado com a ração hiperlipídica por um período de 12 semanas e, nas últimas oito semanas, teve a dieta modificada para ração comercial padrão.
- ✓ Grupo Obeso + Ração Padrão 1 (n=10): reatividade microvascular avaliada por aplicação tópica de acetilcolina (Ach);
- ✓ Grupo Obeso + Ração Padrão 2 (n=10): reatividade microvascular avaliada por aplicação tópica de nitroprussiato de sódio (SNP);
- ✓ Grupo Obeso + Ração padrão 3 (n=10): avaliação do número máximo de extravasamentos induzidos por isquemia/reperfusão;
- ✚ Grupo OBESO + RAÇÃO PADRÃO/ EXERCITADO (n=30): Grupo que foi tratado com a ração hiperlipídica por um período de 12 semanas e, nas últimas oito semanas, teve a dieta modificada para ração comercial padrão associada a um programa de exercícios aeróbicos (P.T.A.).
- ✓ Grupo Obeso + Ração Padrão 1 (n=10): avaliação da reatividade microvascular avaliada por aplicação tópica de acetilcolina (Ach);
- ✓ Grupo Obeso + Ração Padrão 2 (n=10): avaliação da reatividade microvascular avaliada por aplicação tópica de nitroprussiato de sódio (SNP);
- ✓ Grupo Obeso + Ração padrão 3 (n=10): avaliação do número máximo de extravasamentos induzidos por isquemia/reperfusão;

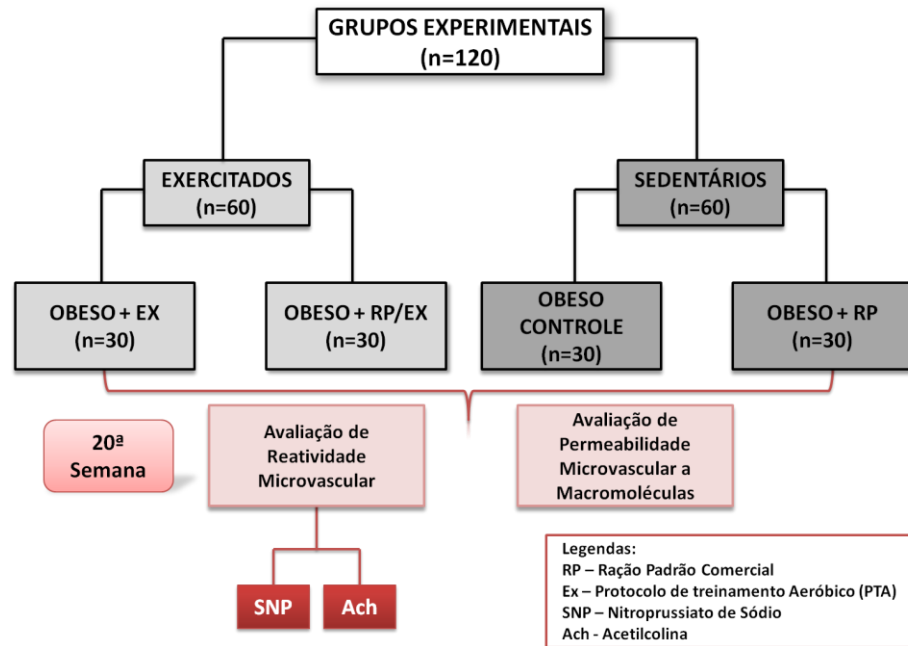


Figura 4: Desenho experimental: Os animais receberam a ração hiperlipídica por 12 semanas e foram, então, redistribuídos aleatoriamente em 4 grupos pelas oito semanas seguintes: OBC, manteve a ração hiperlipídica; OBEX, manteve a ração hiperlipídica associada a um treinamento aeróbico (T.A.), OBRC, dieta modificada para ração comercial padrão e OBRCEX, dieta modificada associada a um treinamento aeróbico (T.A.). Na vigésima semana, os experimentos foram feitos.



Figura 5: Protocolo experimental durante as 20 semanas. Na 20ª semana, os animais foram submetidos aos procedimentos de análise da microcirculação, sacrifício e coleta de materiais para futuras análises.

3.2 Protocolo de treinamento aeróbico

Uma semana antes do início do protocolo de exercícios, os animais foram introduzidos na esteira para ambientação com a maquinaria, com tempo e velocidades inferiores aos do protocolo (15 minutos a 7m/min). A rotina de exercícios foi implementada cinco vezes por semana, nas últimas oito semanas de protocolo e, caracterizou-se pelo incremento gradual da velocidade, do tempo e da angulação da esteira [75].

| | PROTOCOLO DE TREINAMENTO AERÓBICO | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|-----------------------------------|--------|------------------------|--------|----------------------|--------|-------------------|--------|---------------|--|---------------|--|---------------|--|---------------|--|
| TEMPO (min e hora) E VELOCIDADE (m/min) | 40 min - 11.4 m/min | | 40 min - 11.4-15 m/min | | 40 min - 15-18 m/min | | 50 min - 18 m/min | | 1h - 18 m/min | | 1h - 18 m/min | | 1h - 18 m/min | | 1h - 18 m/min | |
| SEMANAS | 12ªSem | 13ªSem | 14ªSem | 15ªSem | 16ªSem | 17ªSem | 18ªSem | 19ªSem | | | | | | | | |
| ANGULAÇÃO | 0° | 0° | 0° | 5° | 5° | 5° | 5° | 5° | | | | | | | | |

Figura 6: Esquema do protocolo de treinamento aeróbico feito a partir da 12ª semana de tratamento. No esquema encontram-se as velocidades com seus respectivos tempos e a angulação da esteira relacionados com as últimas oito semanas de tratamento.



Legenda

- | | |
|--|---|
| <p>1 – Baias para introdução dos animais</p> <p>2 – Painel de controle da esteira: botão de liga/desliga, controle da velocidade (metros, m/min e cm/min), botão de controle do cronômetro e regulador de choque (0mA a 0,4mA)</p> | <p>3 – Grades condutoras de choque</p> <p>4 – Controle de angulação</p> |
|--|---|

Figura 7: Equipamento (Esteira Insight Equipamentos Científicos, Ribeirão Preto, SP, Brasil) utilizado para o protocolo de treinamento aeróbico.

3.3 Ração hiperlipídica

A ração hiperlipídica tem como base a ração padrão (Nutrilab, Paulínia, São Paulo) com adição significativa no teor de gordura [76]. A ração foi triturada e, em seguida, foram adicionados gordura vegetal hidrogenada previamente derretida (Primor, Brasil) e leite condensado (Nestlé, SP, Brasil). As proporções e valores calóricos encontram-se na tabela 2.

Tabela 1: Tabela de valores nutricionais da ração hiperlipídica e hipercalórica fabricada no laboratório.

| COMPARAÇÃO ENTRE RAÇÃO PADRÃO E DIETA HIPERLIPÍDICA | | |
|--|---|----------------------------------|
| COMPONENTES | DIETA HIPERLIPÍDICA (% PESO) | RAÇÃO PADRÃO (% PESO) |
| RAÇÃO PADRÃO | 60 | 100 |
| GORDURA VEGETAL HIDROGENADA² | 25 | - |
| LEITE CONDENSADO³ | 15 | - |
| PROTEÍNA | 15 | - |
| GORDURA | 30 | 6 |
| CARBOIDRATOS | 55 | 71 |
| ENERGIA (kcal/g) | 5,50 | 4,28 |

¹ Ração Padrão para roedores, Nuvital, Nuvilab, Colombo PR, Brasil.

² Gordura Vegetal hidrogenada, Primor SC, Brasil.

³ Leite condensado, Nestlé SP, Brasil.

3.4 Metodologia

No dia do experimento, a anestesia foi induzida com uma injeção intraperitoneal de 0,2ml/100g de massa corporal de pentobarbital sódico (Pentobarbital Sodique, Sanofi, França, 60 mg/ml). A temperatura corporal do animal foi mantida constante, em torno de 36,5°C durante todo o experimento com o uso de uma manta aquecedora controlada por um termistor retal (Thermostat System, Uppsala Processdata AB, Suécia). Para facilitar a respiração foi feita uma traqueostomia com inserção de um tubo traqueal (PE 190). A veia femoral foi canulada com o uso de um tubo de polietileno (PE 10) para a injeção endovenosa de anestésico (α -cloralose-25mg/ml – Sigma Chemical, USA – na quantidade de 0,3ml/100g de massa corporal) e do marcador fluorescente FITC-dextrana (FITC-Dextran, PM 150 000 dalton – Sigma, USA – 0,3ml/100g de massa corporal) importante para visualizar os pontos de extravasamento microvasculares.

O hamster foi colocado em um estereomicroscópio e a bolsa bochecha (BBH) foi evertida, de modo não traumático, com o auxílio de um cotonete umedecido em solução de NaCl a 0,9%. A parte distal não muscular da bolsa da bochecha foi, então, fixada em um anel

de silicone localizado na borda de uma placa de acrílico e exposta à superfície inferior. A fixação da região descrita ocorreu com o auxílio de pinos metálicos (Figuras 7 e 8). Em todas as preparações, foi evitado o excessivo estiramento ou enrugamento da região da bolsa bochecha fixada na placa. O tecido conjuntivo frouxo foi removido para permitir a observação de vasos da microcirculação. Todo procedimento foi realizado com extrema cautela para não danificar vasos calibrosos evitando sangramentos que pudessem alterar o fluxo sanguíneo normal. A superfície inferior da bolsa foi dissecada com auxílio de um estereomicroscópio (Nikon SMZ-1, Japão) com magnificação de dez a dezesseis vezes e as áreas não vascularizadas de tecido conjuntivo frouxo que cobriam os microvasos foram retiradas com o auxílio de instrumentos cirúrgicos. A área final da preparação visualizada foi de, aproximadamente, 1cm^2 .

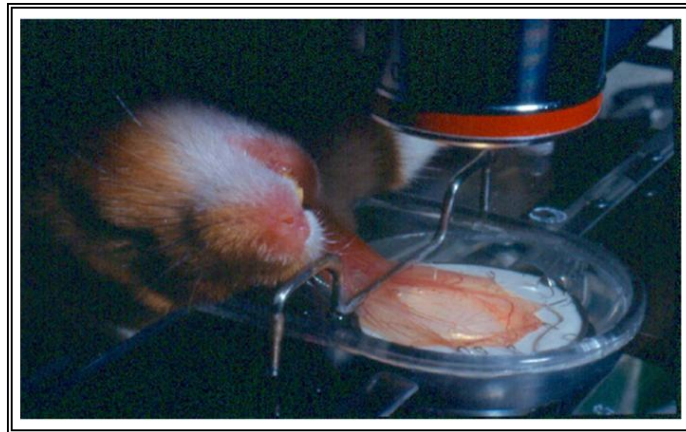


Figura 8: Bolsa da bochecha do hamster após o término da preparação, feita com o estereomicroscópio. A preparação foi fixada com pinos de metal na placa de acrílico com anel de silicone.

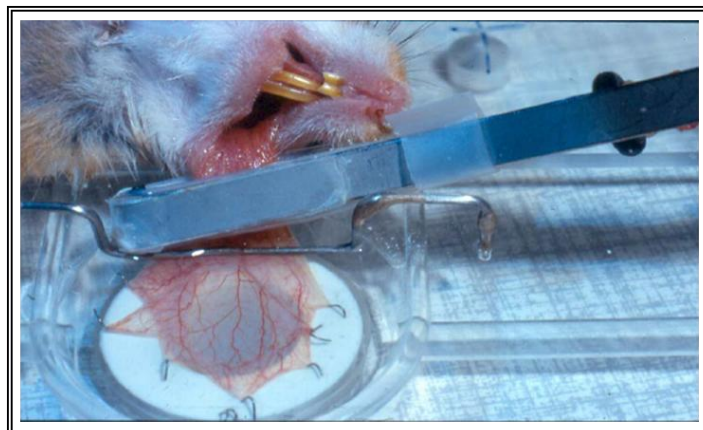


Figura 9: Preparação da bolsa bochecha do hamster para isquemia local feita por um torniquete inflável colocado em sua parte proximal.

Após o término da retirada do tecido conjuntivo, a placa de acrílico com o animal foi colocada para observação da microcirculação em um microscópio Ortholux II (Leitz, Wetzlar,

Alemanha). A fonte luminosa foi uma lâmpada de mercúrio HBO 100W/2 (Osram, Alemanha) para observação em luz fluorescente (luz ultravioleta) alimentada por uma fonte IREM modelo E2-XH5 P/L (Suécia). Durante a preparação e todo o experimento, a bolsa bochecha permaneceu totalmente submersa em uma solução tampão com HCO_3^- e HEPES com fluxo e velocidade de perfusão constantes através de uma bomba de perfusão (Peristaltic Pump P-3, Pharmacia Fine Chemicals, Suécia).

A composição da solução tamponada com HEPES e HCO_3^- foi em mM: NaCl 110,0; KCl 4,7; CaCl_2 2,0; MgSO_4 1,2; NaHCO_3 18,0; ácido N'-2'-hidroxiethylpiperazine-N'-2-etanosulfônico (HEPES) 15,39; e, HEPES sal de Na^+ 14,61. A temperatura foi mantida a $36,5^\circ\text{C}$ através do uso de um banho de aquecimento (WWR Scientific modelo 1130 A, USA). Para manter o pH em 7,4 e a pressão de oxigênio na preparação em torno de 12 a 15 mmHg, utilizou-se de uma mistura de 95% de nitrogênio e 5% de CO_2 (White Martins Gases Especiais, Brasil) que borbulhou constantemente a solução.

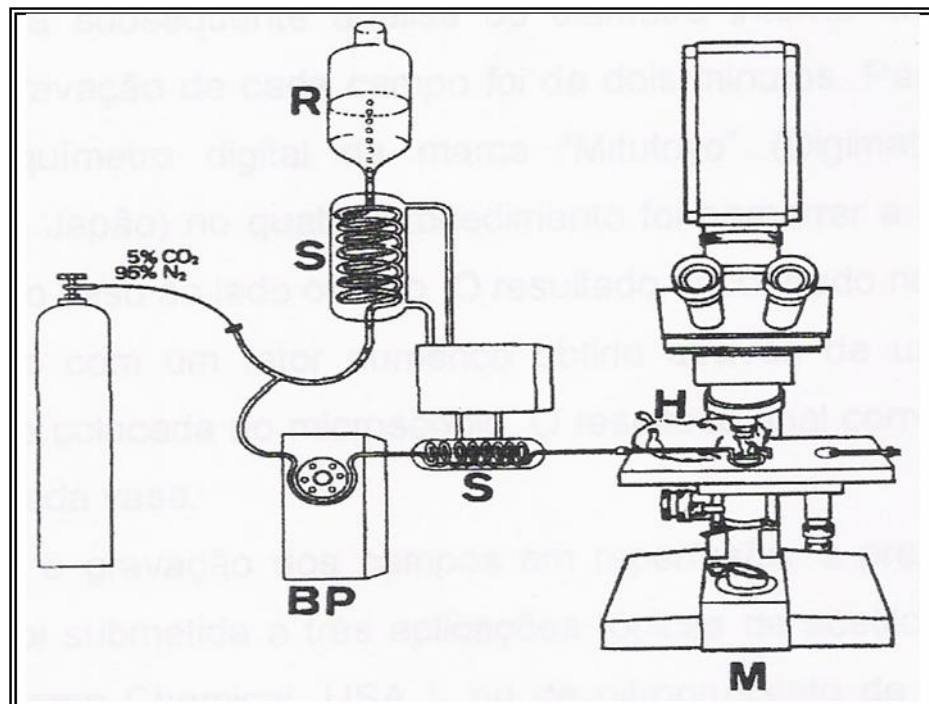


Figura 10: Sistema de microscopia intravital utilizado para observação da preparação da bolsa da bochecha. R = Reservatório da solução de superfusão; S = Serpentina de aquecimento da solução; BP = Bomba de perfusão; H = Hamster, e, M = Microscópio intravital.

Após o procedimento cirúrgico, a preparação permaneceu em repouso por trinta minutos, período necessário para a estabilização da microcirculação.

3.4.1 Medida de reatividade microvascular

Após a preparação da bolsa da bochecha e seu tempo de acomodação, foram escolhidos e gravados três campos contendo, no mínimo, uma arteríola e uma vênula. Os campos foram filmados por um circuito fechado de televisão acoplado ao microscópio e gravados por um videocassete para subsequente análise do diâmetro interno venular e arteriolar. O tempo de gravação de cada campo foi de dois minutos.

Para análise, utilizou-se um paquímetro digital da marca “Mitutoyo” (Digmatiz Caliper, Mitutoyo Corporation, Japão) e o procedimento foi percorrer a distância de um lado a outro da parede interna do vaso. O resultado encontrado no visor do vídeo foi corrigido por um fator numérico obtido através de uma régua de escala micrométrica colocada no microscópio. O resultado final compreendia o diâmetro interno real do vaso, em μm (utilizado para fazer o aumento percentual de dilatação do vaso em relação ao basal).

Após a gravação dos campos durante o controle, foram feitas três aplicações tópicas de acetilcolina (Acetilcoline Chloride, Sigma Chemical, USA) ou nitroprussiato de sódio (Sodium Nitroprusside, Sigma Chemical, USA), adicionados à solução de superfusão através de uma bomba apropriada (Harvard Apparatus Inc., USA). A primeira aplicação de cada droga foi na concentração de 10^{-8}M durante o período de dez minutos com uma velocidade de perfusão de $200\mu\text{l}/\text{min}$. Ao término da aplicação, os três campos foram gravados, cada um por dois minutos novamente. A segunda e terceira aplicações foram, respectivamente, de 10^{-6}M e 10^{-4}M e seguiram o mesmo procedimento explicado acima.

3.4.2 Medida de permeabilidade microvascular

Após a preparação da bolsa da bochecha e um período de acomodação de trinta minutos, foi injetado, via endovenosa, o marcador macromolecular FITC-dextrana (isotiocianato de fluoresceína) com peso molecular de 150 000 dalton, concentração de 25mg/100g a 5% de solução de NaCl a 0,9%.

Depois da injeção de FITC-dextrana, a preparação permaneceu em repouso por um período de trinta minutos. Todas as preparações que apresentaram mais de dez extravasamentos espontâneos foram descartadas, devido a danos vasculares precoces.

Em seguida, foi feita uma isquemia de 30 min com um manguito inflável localizado na porção proximal da bolsa da bochecha. Ao término dos trinta minutos, o torniquete foi desinflado, permitindo o retorno do sangue para a preparação. Foram contados os pontos de extravasamento induzidos pela isquemia/reperfusão nos tempos zero, cinco e dez minutos, a partir do início da reperfusão.

4.0 ANÁLISES SANGÜINEAS

Após os procedimentos experimentais foi realizado, em cada animal, a retirada de sangue por punção cardíaca. O sangue obtido por animal foi cerca de 4ml que foi centrifugado (Eppendorf Centrifuge 5804R, Hamburg – Alemanha) por 12 minutos a 12500rpm e o soro estocado no freezer -80°C (REVCO, Thermo Fisher Scientific Inc) para futuras análises.

4.1 Perfil lipídico

A partir do procedimento descrito anteriormente, o soro foi levado ao Laboratório de Lípidos (LabLip) do Hospital Universitário Pedro Ernesto onde foram analisados a partir do soro coletado Colesterol total, colesterol HDL, Colesterol LDL, colesterol VLDL e triglicerídeos.

Colesterol total (Testado pelo método Oxidase/Peroxidase - Analisador Automático A25 marca BioSystems), colesterol HDL (Testado pelo método: Detergente Direto - Analisador Automático A25 marca BioSystems), Colesterol LDL (Método Cálculo de Friedewald: Colesterol LDL (mg/dl) = Colesterol Total – Triglicerídeos – Colesterol HDL/5), Colesterol VLDL [Método: Cálculo de Friedewald segundo a reação: Colesterol VLDL (mg/dl) = Triglicerídeos/5] e triglicerídeos (Testado pelo método: glicerol fosfato oxidase/peroxidase - Analisador Automático A25 marca BioSystems).

4.2 Avaliação de leptina

O sangue obtido por meio de punção cardíaca foi subseqüentemente centrifugado (Eppendorf, Centrifuge 5804R, Hamburg – Alemanha) por 12 minutos a 12500rpm. O soro obtido foi estocado a -80°C para avaliação de leptina por meio de teste de ELISA (Kit de ELISA, 900-K76 – PeProtech)

5.0 ANÁLISES TECIDUAIS

Ao final dos experimentos foram coletadas amostras de tecidos dos animais para análise.

5.1 Análises teciduais –aorta

Após o protocolo experimental e coleta sanguínea por meio de punção cardíaca, com o auxílio de instrumentos cirúrgicos e em condições estéreis, a aorta do animal foi coletada e inserida em um “eppendorf” contendo 150µl de tampão de lise (Hepes 50 mM, MgCl₂ 1 mM, EDTA 10 mM, SDS 1% e os inibidores de proteases: PMSF 1 mM, aprotinina 1mM, leupeptina 1 mM e inibidor de tripsina de soja 1mM). Em seguida, o “eppendorf” contendo o tampão e a aorta foi colocada no gelo. O extrato celular foi obtido através da homogenização da aorta com sonificador (Sonopuls Mini 20, Bandelin - Alemanha) em 150 µl de tampão de lise, conforme mencionado anteriormente. Após homogenização, a amostra foi centrifugada por 10 minutos, 10000 rpm a 4°C (Eppendorf, Centrifuge 5804R, Hamburg – Alemanha). As amostras centrifugadas foram utilizadas para coleta do sobrenadante para posterior precipitação de proteínas.

Ao sobrenadante adicionou-se cerca de 10% do volume de TCA absoluto (ácido tricloroacético, Reagen) durante 30 minutos no gelo. As amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 15 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o “pellet” lavado com 50 ml de etanol absoluto à 12000 x g por 15 minutos. Ao “pellet”, adicionou-se 30 ml de SDS 1%,

deixado a temperatura ambiente para solubilização. Após a solubilização, seguiu-se a dosagem de proteína [77]. Em seguida, as amostras foram tratadas com tampão de amostra 5x concentrado por 3 minutos a 90°C e aliqüotadas para submissão ao SDS-PAGE.

5.1.2 Western blotting

Amostras contendo 30 mg de proteína foram submetidas ao SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10%. Em seguida, foi realizada a transferência para a membrana de PVDF (PVDF Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech) por 1 hora utilizando-se o sistema Semi-dry (BIO-RAD). A membrana foi então bloqueada com Tween-TBS (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; NaCl 500 mM, Tween-20 0,01%) contendo BSA 1% por 30 minutos, seguida de incubação “overnight” com o anticorpo primário específico. Os anticorpos primários utilizados foram: anti-NOS2 e anti-NOS3 (1:500 para aorta, Santa Cruz Biotechnology). As membranas foram então incubadas com o anticorpo secundário específico conjugado com biotina (1:1000, Santa Cruz Biotechnology), seguida de incubação com peroxidase conjugada com estreptavidina (HRP-estreptavidin, 1:1000, Caltag Laboratories) As proteínas imunorreativas foram visualizadas pela marcação com 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma).

5.2 Análises de tecidos adiposos

No dia do experimento, foram retirados os tecidos adiposos branco dos animais tratados. Após a retirada de sangue por punção cardíaca e da aorta, os tecidos adiposos foram retirados pela seguinte ordem urogenital, mesentérica e retroperitoneal e, pesados subsequentemente para evitar a desidratação dos mesmos.

6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão (SEM). Todos os valores de $p < 0,05$ foram considerados como significativos.

Foi aplicado em todos os dados obtidos o teste estatístico de análise de variância (One Way ANOVA - Teste de Kruskal-Wallis).

O Pós-teste de Dunn foi efetuado após o ANOVA para identificar entre quais grupos houve diferenças, feito com comparações múltiplas entre os grupos dois a dois. Este teste foi usado devido ao pequeno número amostral nos subgrupos, o que sugere a presença de variáveis não-paramétricas.

Diferenças dentro dos grupos em relação ao basal foram avaliadas pelo Teste de Friedman.

7 RESULTADOS

Foram utilizados para o projeto 120 machos adultos da espécie *Mesocricetus auratus*, com massa corporal inicial em torno de 60g. Esses animais vieram de colônias de criação da ANILAB (Paulínia, São Paulo) e foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos, Obeso Controle (OBC – n=30), Obeso Exercitado (OBEX – n=30), Obeso + Ração Comum (OBRC – n=30), Obeso + Ração Comum/Exercícios (OBRP/EX – n=30). Os grupos foram subdivididos em três subgrupos (n=10/cada subgrupo): acetilcolina (Ach), nitroprussiato de sódio (SNP), isquemia/reperfusão (I/R). A experimentação, sacrifício e coleta de sangue e órgãos ocorreram na 20^a semana de tratamento.

7.1 Avaliação de massa corporal

A avaliação de massa corporal (figura 10) foi feita quinzenalmente, mas como diferenças significativas só foram observadas entre os grupos nas últimas semanas de tratamento, a demonstração gráfica ficou limitada à última semana (20^a semana). No dia do experimento foi feita também a medida do comprimento naso-anal (figura 11). Após a modificação da dieta e associação à rotina de exercícios foi possível observar uma redução significativa na massa corporal ($p < 0,0001$) e comprimento naso-anal ($p = 0,0011$) entre os animais obesos (Obeso controle e obeso exercitado) e os animais que tiveram a modificação dietética associada ou não a uma rotina de exercícios aeróbicos (Obeso + Ração Padrão e Obeso + Ração Padrão/Exercício).

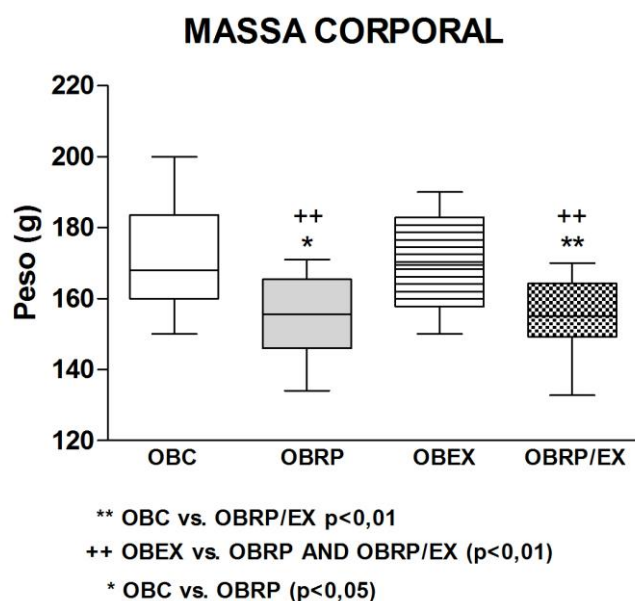


Figura 11: Avaliação de massa corporal feita na semana de sacrifício (20^a semana) entre os hamsters tratados com a ração hiperlipídica. Observou-se uma redução significativa da massa corporal nos animais que retornaram, na 12^a semana de tratamento, à ração padrão comercial associada ou não a uma rotina de exercícios aeróbicos (comparação controle $p < 0,01$ [OBRP] e $p < 0,05$ [OBRP/EX], e comparação obeso + exercício $p < 0,01$) em comparação aos animais que continuaram a ingerir a ração hiperlipídica associada ou não a uma rotina de exercícios aeróbicos.

Tabela 2: Pós-teste de Dunn com comparações múltiplas entre grupos em relação aos valores de massa corporal.

| Comparação Múltipla com Teste de Dunn para massa corporal (Valor de p) | |
|---|----------------|
| MASSA CORPORAL | |
| OBC vs. OBEX | $p > 0,05$ |
| OBC vs. OBRP | * $p < 0,05$ |
| OBC vs. OBRP/EX | * $p < 0,0001$ |
| OBEX vs. OBRP | * $p < 0,01$ |
| OBEX vs. OBRP/EX | * $p < 0,0001$ |

Os valores médios de massa corporal para os grupos que foram tratados por vinte semanas com ração hiperlipídica foram: (Obeso Controle - OBC $132,5 \pm 7,9$ g) (Obeso + Exercícios - OBEX $136,1 \pm 11,3$ g); e para os grupos que foram tratados com ração hiperlipídica por 12 semanas e que nas últimas oito semanas tiveram modificação dietética foram: (Obeso + Ração Padrão - OBRP $130,3 \pm 5,2$ g); (OBRP/EX $120,5 \pm 6,5$ g).

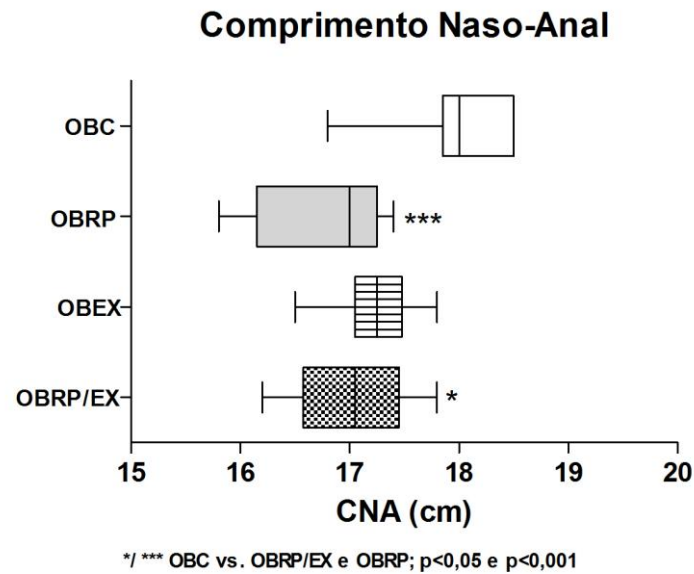


Figura 12: Medidas de comprimento naso-anal feitas no dia de experimentação. Diferenças foram encontradas entre os grupos obeso controle e obeso+ração padrão ($p < 0,01$) e obeso+ração padrão/exercício ($p < 0,05$).

Os valores médios para comprimento naso-anal (figura 12) para os grupos tratados foram: Obeso Controle ($18,00 \pm 0,17$ cm), Obeso + Ração Padrão ($16,74 \pm 0,20$ cm), Obeso + Exercício ($17,24 \pm 0,13$ cm) e Obeso + Ração Padrão/Exercício ($17,03 \pm 0,19$ cm).

Tabela 3: Pós-teste de Dunn com comparações múltiplas entre grupos em relação aos valores de comprimento naso-anal.

| Comparações Múltiplas com Teste de Dunn para comprimento naso-anal (Valor de p) | |
|--|----------------|
| COMPRIMENTO NASO-ANAL | |
| OBC vs. OBEX | $p > 0,05$ |
| OBC vs. OBRP | * $p < 0,0001$ |
| OBC vs. OBRP/EX | * $p < 0,001$ |
| OBEX vs. OBRP | $p > 0,05$ |
| OBEX vs. OBRP/EX | $p > 0,05$ |

7.2 Glicemia quinzenal

A glicemia foi feita quinzenalmente nos hamsters desde sua chegada até o fim do tratamento. O procedimento foi realizado em jejum e, não se constatou diferenças entre os animais (Figura12).

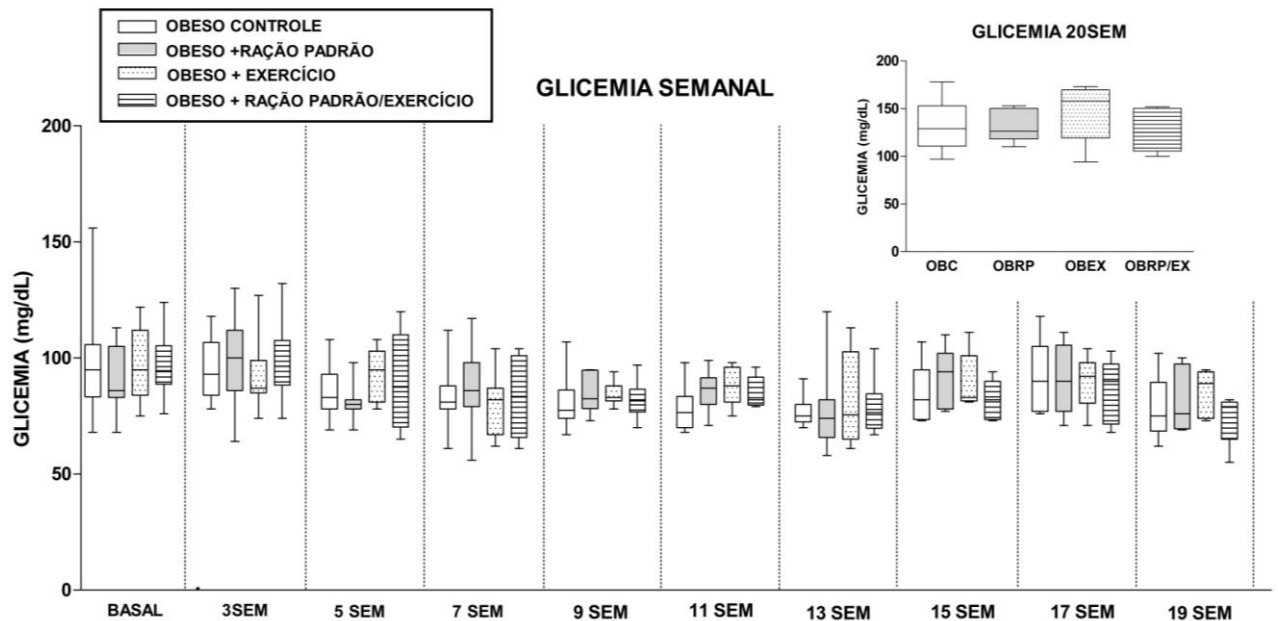


Figura 13: Medidas de glicemia quinzenais feitas a partir da veia safena com os animais em jejum. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

Tabela 4: Valores médios±S.E.M. das dosagens de glicemia feitas nos animais tratados, em jejum, quinzenalmente.

| VALORES MÉDIOS DE GLICEMIA QUINZENAL | | | | | | |
|--------------------------------------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|
| SEMANAS/GRUPOS | BASAL | 3ª SEM | 5ª SEM | 7ª SEM | 9ª SEM | 11ª SEM |
| OBC | 98,7±4,9mg/dl | 94,2± 2,8mg/dl | 85,9± 2,8mg/dl | 82,0±3,4mg/dl | 80,7±3,5mg/dl | 78,2±3,0mg/dl |
| OBRP | 90,7±3,3mg/dl | 99,2± 4,4mg/dl | 81,7± 2,1mg/dl | 88,7±3,9mg/dl | 84,9±3,1mg/dl | 86,0±2,7mg/dl |
| OBEX | 97,1±3,9mg/dl | 91,4± 3,1mg/dl | 92,9± 2,9mg/dl | 79,7±3,0mg/dl | 84,2±1,5mg/dl | 88,3±2,7mg/dl |
| OBRP/EX | 96,5±3,1mg/dl | 97,4± 3,9mg/dl | 88,4± 4,9mg/dl | 82,6±4,2mg/dl | 81,9±2,7mg/dl | 85,3±2,1mg/dl |
| SEMANAS/GRUPOS | 13ª SEM | 15ª SEM | 17ª SEM | 19ª SEM | 20ª SEM | |
| OBC | 76,7±2,0mg/dl | 83,8± 6,1mg/dl | 90,8±7,5mg/dl | 78,2± 6,5mg/dl | 132,5±7,9mg/dl | |
| OBRP | 77,1±5,5mg/dl | 90,8± 6,0mg/dl | 91,0±6,9mg/dl | 82,0±6,5mg/dl | 130,3±5,2mg/dl | |
| OBEX | 82,7±6,2mg/dl | 89,6± 5,6mg/dl | 89,8±5,3mg/dl | 85,0± 4,6mg/dl | 145,5±9,1mg/dl | |
| OBRP/EX | 78,7±3,6mg/dl | 81,8± 3,9mg/dl | 85,6±6,3mg/dl | 74,2± 4,9mg/dl | 126,6±6,5mg/dl | |

7.3 Perfil lipídico

As análises do perfil lipídico foram feitas a partir do sangue coletado por punção cardíaca, no dia da experimentação. Não foram encontradas diferenças entre os animais tratados em nenhuma das análises feitas para o perfil lipídico, apesar de se observar uma tendência à redução nos grupos exercitados na análise de LDL.

Os valores médios para o perfil lipídico foram: Colesterol total (OBC - $2,33 \pm 0,16$ mmol; OBRP - $2,32 \pm 0,21$ mmol; OBEX - $2,09 \pm 0,15$ mmol; OBRP/EX - $2,14 \pm 0,087$ mmol); HDL (OBC - $1,61 \pm 0,10$ mmol; OBRP - $1,44 \pm 0,14$ mmol; OBEX - $1,58 \pm 0,09$ mmol; OBRP/EX - $1,55 \pm 0,04$.mmol); LDL (OBC - $0,40 \pm 0,05$ mmol; OBRP - $0,38 \pm 0,09$ mmol; OBEX - $0,27 \pm 0,06$ mmol; OBRP/EX - $0,26 \pm 0,06$ mmol); Triglicerídeos (OBC - $1,63 \pm 0,23$ mmol; OBRP $1,89 \pm 0,17$ mmol; OBEX - $1,74 \pm 0,20$ mmol; OBRP/EX - $1,65 \pm 0,11$ mmol); VLDL (OBC - $0,33 \pm 0,05$ mmol; OBRP - $0,38 \pm 0,03$ mmol; OBEX - $0,35 \pm 0,04$ mmol; OBRP/EX - $0,33 \pm 0,02$ mmol).

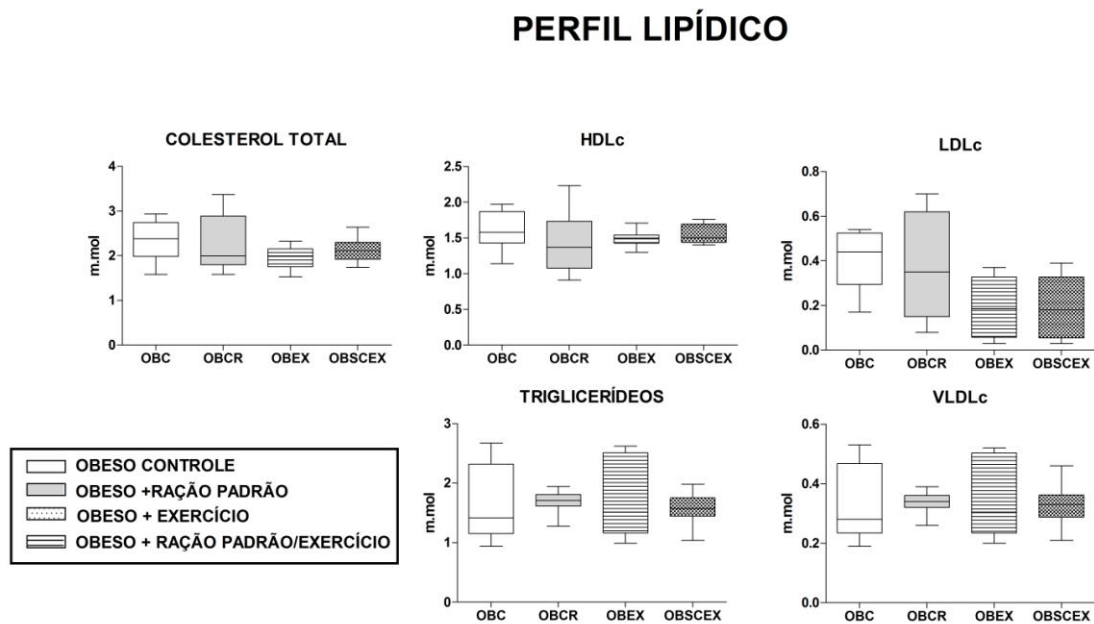


Figura 14: Perfil lipídico realizado na vigésima semana de tratamento. Não foram detectadas diferenças entre os grupos.

7.4 Análise de leptina

A análise da leptina foi feita com o sangue obtido dos hamsters no dia de experimentação por meio de punção cardíaca. Foi possível observar uma redução linear nos níveis de leptina ($p=0,0039$), mas, diferenças significativas em relação ao grupo obeso controle só foram encontradas, utilizando o pós-teste de Dunn, no grupo obeso+ração padrão/exercício ($p<0,01$).

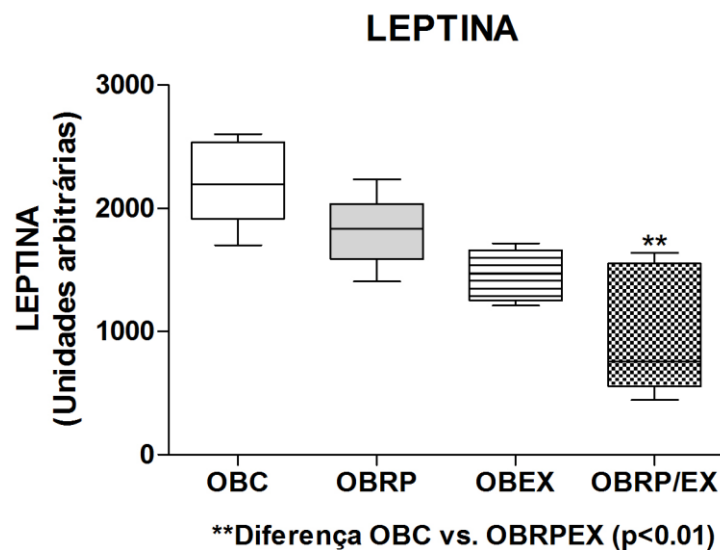


Figura 15: Medidas de leptina feitas a partir de soro coletado no dia da experimentação. Nas análises observou-se uma redução linear a partir do grupo controle com diferenças significativas em relação ao grupo obeso ração padrão/exercício ($p<0,01$).

Tabela 5: Pós-Teste de Dunn com comparações múltiplas entre grupos em relação aos valores de leptina.

| Comparação Múltipla com Teste de Dunn para comprimento leptina (Valor de p) | |
|--|------------|
| LEPTINA | |
| OBC vs. OBEX | $p>0,05$ |
| OBC vs. OBRP | $p>0,05$ |
| OBC vs. OBRP/EX | * $p<0,01$ |
| OBEX vs. OBRP | $p>0,05$ |
| OBEX vs. OBRP/EX | $p>0,05$ |

7.5 Composição corporal

No dia do experimento, os animais foram submetidos ao protocolo experimental e subsequentemente à retirada dos tecidos adiposos das áreas: tecido adiposo urogenital, visceral e retroperitoneal para diferenças de composição corporal entre os grupos tratados (figura 15).

Após a modificação dietética associada ou não a uma rotina de exercícios aeróbicos houve uma significativa redução no acúmulo de tecidos adiposo (urogenital [$p=0,0004$]; retroperitoneal [$p = 0,0083$] e visceral [$p<0.000$]).

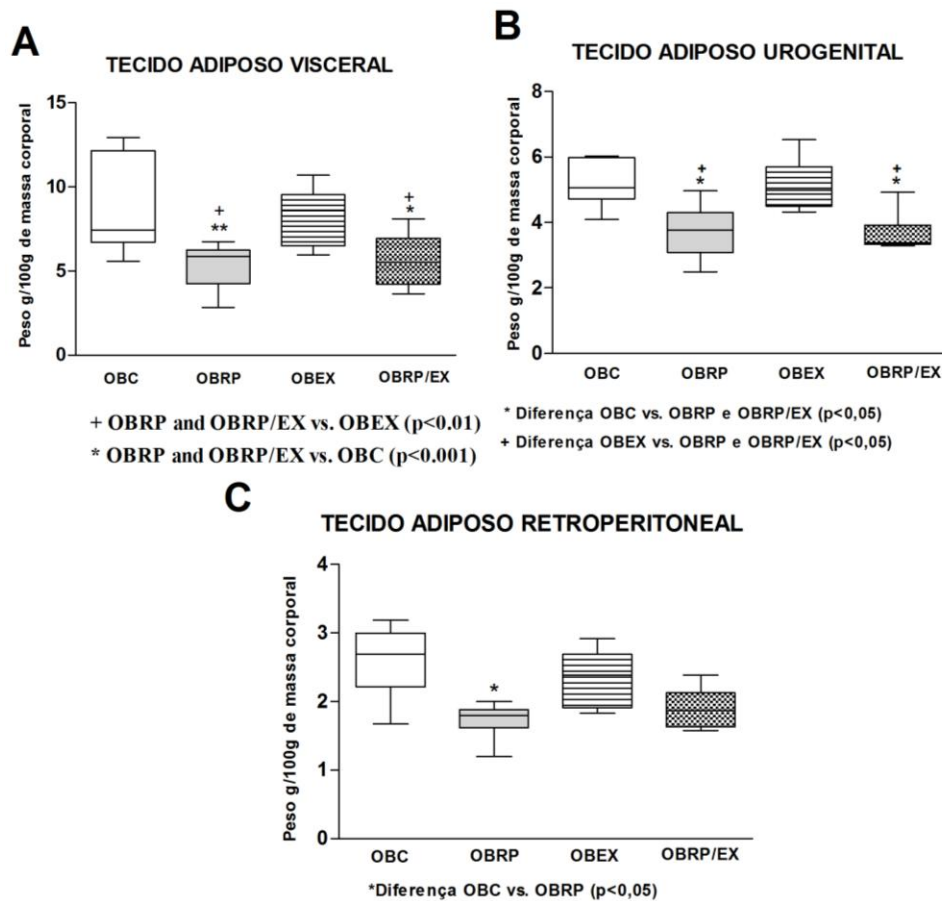


Figura 16: Medidas de composição corporal feitas no dia do experimento. (A) Diferenças entre os grupos obesos controle e obesos + ração padrão associada ou não a exercícios aeróbicos foram encontradas nas pesagens dos tecidos adiposos viscerais e urogenitais ($p<0.0001$). (B) Diferenças entre os grupos obesos controle e obesos + ração padrão associada ou não a exercícios aeróbicos foram encontradas nas pesagens dos tecidos adiposos viscerais e urogenitais ($p=0.0004$). (C) Na pesagem do tecido adiposo retroperitoneal houve diferenças entre os grupos obeso controle e obeso + ração padrão ($p = 0,0083$).

No pós-teste de Dunn foi possível confirmar as diferenças entre o grupo obeso controle e os grupos obeso + ração padrão e obeso + ração padrão/exercício, com exceção da

medida de tecido adiposo retroperitoneal que apresentou diferença unicamente entre os grupos obeso controle (OBC) e obeso + ração padrão (OBRP) apesar de haver uma tendência do grupo obeso + ração padrão/exercício (OBRP/EX).

Tabela 6: Pós-teste de Dunn com comparações múltiplas entre grupos em relação aos valores de pesagem dos tecidos adiposos viscerais, urogenitais e retroperitoneais.

| Comparação Múltipla com Teste de Dunn (Valor de p) | | | |
|--|----------|------------|-----------------|
| | VISCERAL | UROGENITAL | RETROPERITONEAL |
| OBC vs. OBEX | p>0,05 | p>0,05 | p>0,05 |
| OBC vs. OBRP | *p<0,01 | *p<0,05 | *p<0,05 |
| OBC vs. OBRP/EX | *p<0,05 | *p<0,05 | p>0,05 |
| OBEX vs. OBRP | *p<0,01 | *p<0,05 | p>0,05 |
| OBEX vs. OBRP/EX | *p<0,01 | *p<0,01 | p>0,05 |
| OBEX vs. OBRP | p>0,05 | p>0,05 | p>0,05 |

7.6 Análises microcirculatórias

7.6.1 Reatividade microvascular (Vasodilatação endotélio-dependente)

As análises microcirculatórias foram feitas também na vigésima semana após o início do tratamento (figuras 18 e 19). A partir destas análises, foi possível constatar a disfunção endotelial que, após a modificação dietética associada ou não a uma rotina de exercícios, melhorou em todas as concentrações de acetilcolina testadas (10^{-8} M [p=0,0001], 10^{-6} M [p<0,0001] e 10^{-4} M [p<0,0001]).

Os valores dos diâmetros internos médios das arteríolas testadas para as diferentes concentrações de acetilcolina foram (comparados com o valor do controle [antes da aplicação] considerado igual a 100%): 10^{-8} M (OBC - $87,9 \pm 2,8\%$; *OBRP - $116,7 \pm 6,0\%$; *OBEX - $109,1 \pm 4,7\%$ e *OBRP/EX - $105,0 \pm 2,9\%$), 10^{-6} M (OBC - $95,4 \pm 3,1\%$; *OBRP - $126,0 \pm 6,3\%$; *OBEX - $122,5 \pm 4,8\%$ e *OBRP/EX - $118,1 \pm 4,3\%$) e 10^{-4} M (OBC - $109,5 \pm 4,8\%$; *OBRP - $149,6 \pm 6,7\%$; *OBEX - $143,5 \pm 5,5\%$ e *OBRP/EX - $139,4 \pm 5,3\%$).

A partir da análise com teste de Friedman foi possível constatar uma variação significativa do diâmetro interno dos vasos em relação ao basal nos grupos Obeso controle

($p < 0.0001$), Obeso + Ração Padrão ($p = 0,0002$), Obeso + Exercício ($p < 0.0001$). No Pós-teste de Dunn, porém, foi possível constatar que no grupo controle tal diferença existe unicamente na concentração mais alta de acetilcolina ($10^{-4}M$). Já nos demais grupos foi possível observar diferenças a partir da concentração intermediária de acetilcolina ($10^{-6}M$).

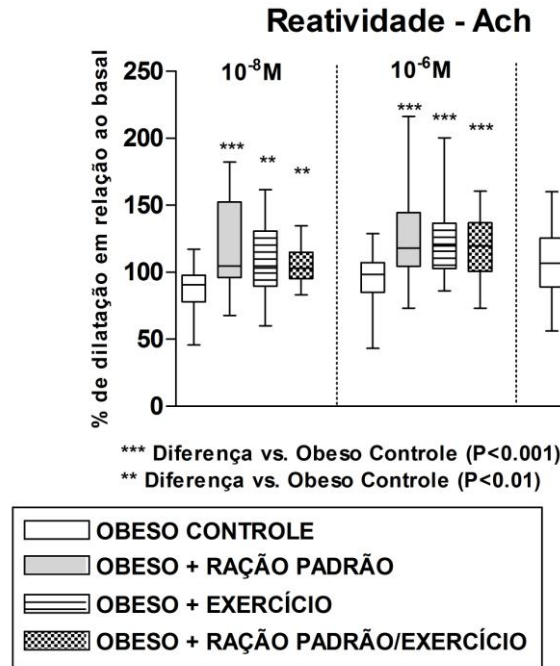


Figura 17: Reatividade microvascular em resposta a aplicações tópicas em concentrações crescentes de acetilcolina. Todas as concentrações de acetilcolina mostraram aumento significativo em todas as modificações de tratamento [$10^{-8}M$ ($p < 0,0001$), $10^{-6}M$ ($p < 0.0001$) e $10^{-4}M$ ($p < 0.0001$)].

Tabela 7: Pós-teste de Dunn com comparações múltiplas entre grupos em relação aos valores médios de dilatação de arteríolas em resposta a aplicações tópicas de concentrações crescentes de acetilcolina [Ach (10^{-8} , 10^{-6} , $10^{-4}M$)].

| Comparação Múltipla com Teste de Dunn para reatividade microvascular em resposta a Ach (Valor de p) | | | |
|---|----------------|----------------|----------------|
| | $10^{-8}M$ | $10^{-6}M$ | $10^{-4}M$ |
| OBC vs. OBEX | * $p < 0,01$ | * $p < 0,0001$ | * $p < 0,0001$ |
| OBC vs. OBRP | * $p < 0,0001$ | * $p < 0,0001$ | * $p < 0,0001$ |
| OBC vs. OBRP/EX | * $p < 0,01$ | * $p < 0,01$ | * $p < 0,01$ |
| OBEX vs. OBRP | $p > 0,05$ | $p > 0,05$ | $p > 0,05$ |
| OBEX vs. OBRP/EX | $p > 0,05$ | $p > 0,05$ | $p > 0,05$ |

7.6.2 Reatividade microvascular (Vasodilatação endotélio-independente)

As análises microcirculatórias foram obtidas na vigésima semana de tratamento. Após aplicações tópicas em concentrações crescentes de nitroprussiato de sódio foi possível constatar que o tempo de tratamento não foi suficiente para causar danos na parede dos microvasos. Apesar do valor de p ser significativo na menor dosagem de nitroprussiato de sódio (10^{-8}M ; $p=0,0335$), no pós-teste de Dunn não foi constatado diferenças entre os animais.

Os valores arteriolares médios para as diferentes concentrações de nitroprussiato foram: 10^{-8}M (OBC - $98,2 \pm 1,9\%$; *OBRP - $112,2 \pm 6,7\%$; *OBEX - $108,4 \pm 2,6\%$ e *OBRP/EX - $97,5 \pm 2,1\%$), 10^{-6}M (OBC - $117,2 \pm 3,3\%$; *OBRP - $123,2 \pm 4,6\%$; *OBEX - $123,8 \pm 3,7\%$ e *OBRP/EX - $115,8 \pm 2,65\%$) e 10^{-4}M (OBC - $125,9 \pm 3,5\%$; *OBRP - $133,3 \pm 3,5\%$; *OBEX - $130,9 \pm 4,3\%$ e *OBRP/EX - $122,4 \pm 2,9\%$).

A partir da análise com teste de Friedman foi possível constatar uma variação significativa do diâmetro interno dos vasos em relação ao basal nos grupos Obeso controle ($p < 0.0001$), Obeso + Ração Padrão ($p < 0.0001$), Obeso + Exercício ($p < 0.0001$). No pós-teste de Dunn foi possível confirmar que no grupo controle tal diferença existiu nas três concentrações de nitroprussiato de sódio ($p < 0,05$) assim como nos demais grupos (obeso + ração padrão; obeso + exercício; obeso + ração padrão/exercício, $p < 0,001$).

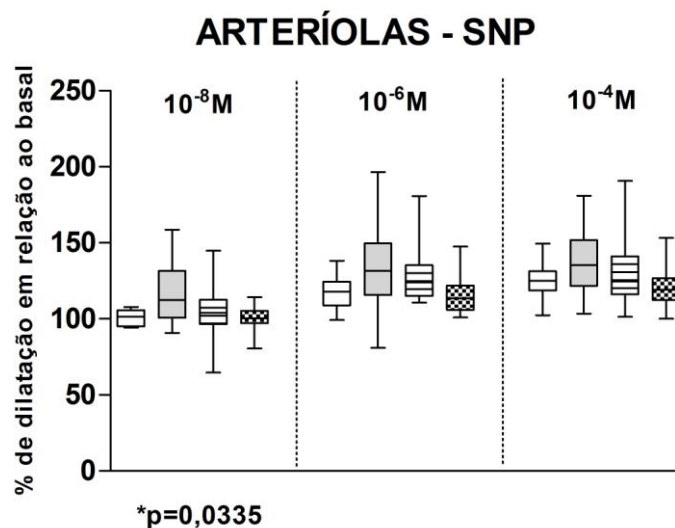


Figura 18: Reatividade microvascular em resposta a aplicações tópicas em concentrações crescentes de nitroprussiato de sódio. O valor de p só foi significativo na menor concentração de nitroprussiato de sódio (10^{-8}M [*p=0,0335]).

7.6.3 Permeabilidade microvascular a macromoléculas

As análises de permeabilidade (figura 18) tiveram valores significativos nos dois tempos de análise: 5 (p= 0,0207) e 10 minutos (p= 0,0057). A modificação no tratamento associada ou não ao treinamento aeróbico reduziu o número de extravasamentos em todos os grupos. No pós-teste de Dunn essa diferença foi confirmada nos tempos 5 minutos entre os grupos obeso controle e obeso + ração padrão (p<0,05) e 10 minutos entre os grupos obeso controle e os demais grupos (p<0,05).

Os valores médios de extravasamento para os grupos tratados foram aos 5 minutos (OBC - 29,4± 4,0 leaks/cm²; OBRP - 13,1± 0,9 leaks/cm²; OBEX - 20,9± 3,1 leaks/cm²; OBRP/EX - 19,9± 2,9 leaks/cm²) e 10 minutos (OBC - 40,6± 4,2 leaks/cm²; OBRP - 19,0± 1,7 leaks/cm²; OBEX - 18,7± 2,2 leaks/cm²; OBRP/EX - 21,5± 3,8 leaks/cm²).

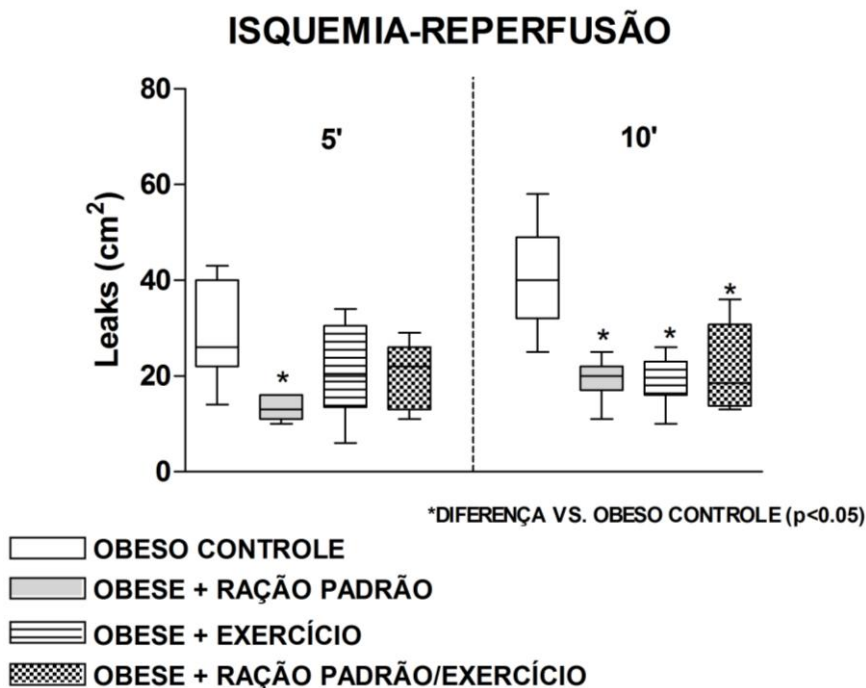


Figura 19: Medidas de permeabilidade microvascular a macromoléculas mostraram diferenças significativas em relação aos grupos tratados em ambos os tempos de contagem: 5min (p= 0,0207) e 10 min (p= 0,0057). A modificação no tratamento assim como o treinamento aeróbico reduziu significativamente o número de extravasamentos em ambos os tempos de contagem.

Tabela 8: Pós-teste de Dunn com comparações múltiplas entre grupos em relação aos valores médios de permeabilidade microvascular a macromoléculas após procedimento de isquemia e reperfusão, nos tempos 5 e 10 minutos.

| Comparação Múltipla com Teste de Dunn para permeabilidade microvascular após procedimento de isquemia e reperfusão | | |
|--|---------|---------|
| | 5' | 10' |
| OBC vs. OBEX | p>0,05 | *p<0,05 |
| OBC vs. OBRP | *p>0,01 | *p<0,05 |
| OBC vs. OBRP/EX | p>0,05 | *p<0,05 |
| OBEX vs. OBRP | p>0,05 | p>0,05 |
| OBEX vs. OBRP/EX | p>0,05 | p>0,05 |

7.7 Análises Teciduais

7.7.1 Western Blott da aorta.

A partir das análises de Western blott (**figura 19**) foi possível perceber um aumento linear e significativo ($p=0,0352$) na expressão da proteína óxido nítrico sintase endotelial (NOS2) em relação ao grupo obeso controle e diferenças significativas, no pós-teste de Dunn, em relação ao grupo obeso+ração padrão/exercício (OBRP/EX, $p<0,05$).

Com relação às análises de iNOS, não foram encontradas diferenças significativas ($p= 0,3566$), o que pode significar que o quadro inflamatório encontrado nesses animais permaneceu o mesmo com a modificação do tratamento.

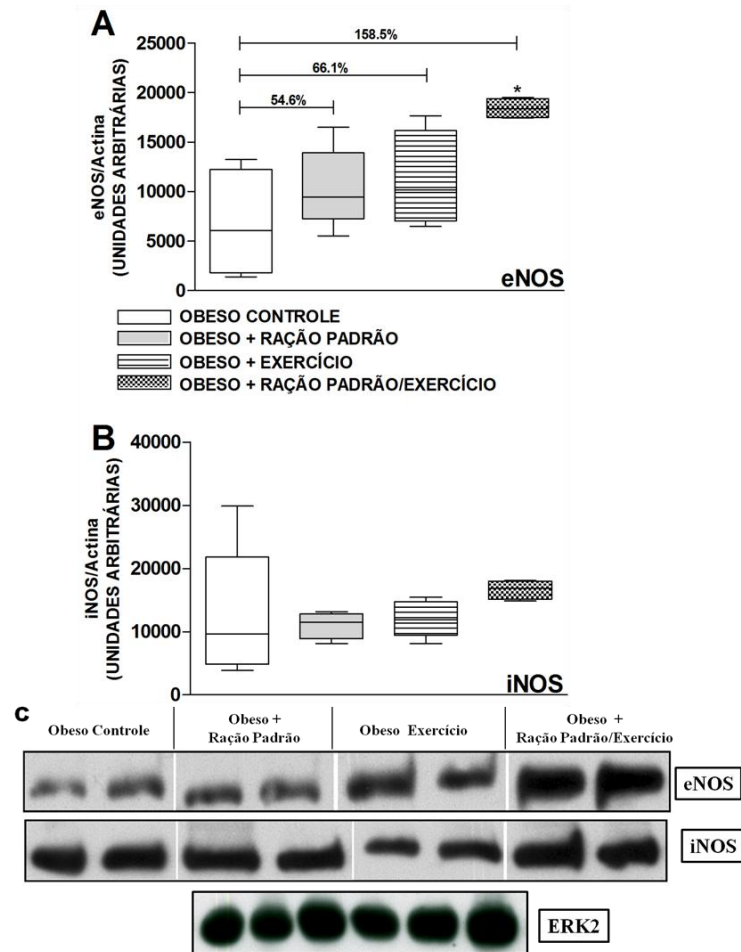


Figura 20: Níveis de eNOS e iNOS a partir de extrato de aorta e quantificação por Western blott. **(A)** Os grupos tratados tiveram um aumento linear em relação ao grupo obeso controle ($p=0,0352$). **(B)** Em relação à quantificação de iNOS, não foram detectadas diferenças entre os grupos. **(C)** Ensaios de Western revelados com anticorpos anti-NOS2 e anti-NOS3.

8 DISCUSSÃO

Para uma avaliação das alterações microvasculares causadas, escolhemos a bolsa da bochecha de hamster, uma preparação que permite a visualização da microcirculação por ser bastante transparente e ter estabilidade em relação ao fluxo de sangue, servindo para observações *in vivo* de possíveis alterações da hemodinâmica vascular ocorridas, como a variação do diâmetro arteriolar e extravasamento vascular de macromoléculas.

O sistema utilizado também foi de grande importância, pois a solução de perfusão que banhou a bolsa bochecha do hamster constantemente manteve a sua temperatura ao longo do procedimento experimental a 36,5°C. Isto evitou que a preparação ficasse exposta ao ar e pudesse sofrer possíveis oxidações, criando uma variável que prejudicaria o transcorrer do estudo. Além disso, foi essencial manter o pH da preparação, por meio da adição de CO₂ na solução de perfusão, uma vez que a variação do pH desestabilizaria metabolicamente a preparação, alterando as atividades enzimáticas locais.

O controle térmico do animal foi feito por meio de um termistor retal que avaliou as oscilações de temperatura e que, com o auxílio de uma manta aquecedora, manteve a temperatura corporal do animal em torno de 36,5°C, importante para a manutenção da homeostase.

O anestésico pentobarbital sódico foi utilizado para indução anestésica, enquanto para a manutenção da mesma foi utilizado o anestésico alfa cloralose.

Neste estudo demonstramos que a rotina de exercícios aeróbicos assim como a modificação dietética foi capaz de minimizar os danos endoteliais encontrados em hamsters obesos, que parece ser secundário à redução de peso e gordura.

As avaliações de citocinas foram impossibilitadas devido a limitações de análises sanguíneas encontradas nos hamsters, portanto, só as análises de perfil lipídico e glicemia foram feitas.

8.1 Peso e composição corporal

Diversos trabalhos mostram uma correlação direta entre a dieta e o ganho de tecido adiposo em modelos animais [76]. O modelo de obesidade exógena citado foi introduzido em

nosso laboratório e apesar de utilizar o percentual de 25% de gordura vegetal hidrogenada, foi possível observar diferenças significativas no peso em relação ao controle desde a primeira semana de tratamento. Neste modelo observamos disfunção endotelial, intolerância à glicose e resistência à insulina [78].

Este modelo foi, então, utilizado para analisar os possíveis tratamentos e intervenções que, no caso desta dissertação, foram caracterizados pela modificação dietética com retorno a ração isocalórica associada ou não à atividade física.

Já está claro que a inatividade física exerce um importante papel, talvez fundamental, no rápido aumento da prevalência da obesidade nas últimas décadas [79, 80 e 81], mas o montante exato de atividade necessária para prevenir o ganho de peso não é conhecido e varia de indivíduo para indivíduo.

Em estudos clássicos que compararam intervenções de exercício vs. dieta foi possível observar que o estímulo do exercício foi, primeiramente, equivalente ao da intervenção dietética [82]. Isso se mostra importante à medida que as comparações de intervenções dietéticas vs. as de exercício envolvem déficits calóricos substanciais por parte da dieta em comparação a uma modesta intervenção com o exercício e, como resultado, a dieta é considerada a única forma de se perder peso.

Em termos de dieta e perda de peso, mesmo sem mudanças na dieta, a maior parte dos indivíduos com sobrepeso conseguiram prevenir o ganho de peso ou ter uma modesta perda de peso com a intervenção de 180 minutos de exercícios moderados por semana [83]. O incremento desta atividade está relacionado com perdas de peso, gordura e reduções em medidas de obesidade central (Figuras 11, 12 e 14). Adicione-se a isso o fato de que mudanças na composição corporal são de extrema importância à medida que indivíduos com excesso de tecido adiposo intra-abdominal ou visceral possuem riscos substanciais de desenvolverem resistência insulínica, doenças cardiovasculares e síndrome metabólica [84].

Abre-se um parêntese acerca dos indivíduos obesos, existe, atualmente, o importante conceito do obeso saudável. Esse desmistifica totalmente o conjunto bioquímico e sintomático encontrado nos obesos. Há uma alta prevalência de indivíduos com um fenótipo de obeso saudável, nesses aparentemente não há um aumento de risco de desenvolvimento de DCV, apesar do excedente de peso e de adiposidade. Aproximadamente 30% dos indivíduos obesos mantêm perfis cardiometabólicos saudáveis e dados coletados sugerem que a perda de peso, contraditoriamente, teria um efeito negativo na expressão saudável desse perfil cardiometabólico [85].

No presente estudo foi possível observar um crescente ganho de massa corporal em todos os grupos até a décima segunda semana. Porém, a partir das intervenções feitas, os dados coletados demonstraram que o exercício *per se* não foi suficiente para alterar a massa corporal, comprimento naso-anal e composição corporal dos hamsters obesos. Além disso, foi possível observar que a modificação dietética foi de extrema importância para alterar a massa corporal, deposição de gordura e comprimento naso-anal destes animais e que com a adição do P.T.A. os animais tiveram esta perda potencializada.

No presente estudo, os animais obesos tiveram aumento de peso, porém naqueles submetidos a uma rotina de exercícios associada ou não a modificação dietética houve uma significativa redução de peso, comprimento naso-anal e em todas as medidas de adiposidade (tecido adiposo visceral, urogenital e retroperitoneal). O treinamento físico, assim como o retorno a dieta isocalórica, foi eficiente para a redução da composição corporal nos animais obesos.

8.2 Análises sanguíneas

A partir do sangue coletado foi possível fazer as análises bioquímicas de glicemia (durante o tratamento) assim como de leptina e perfil lipídico (no dia de experimentação). As análises de citocinas inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) e antiinflamatórias (IL-10) que foram objetivadas no início do estudo não foram feitas por falta de meios bioquímicos viáveis para análises sanguíneas do roedor hamster.

Os indivíduos obesos, normalmente, possuem uma dieta rica em carboidratos e gordura sendo que após a ingestão desta dieta a concentração de insulina aumenta dramaticamente, levando diretamente a uma rápida redução nas concentrações de glicose e ácidos graxos, frequentemente abaixo dos níveis de jejum. Por isso, entre a terceira e quinta hora após consumo, a concentração sanguínea destes dois combustíveis metabólicos está baixa, o que é interpretado pelo sistema nervoso como um estado de “baixa energética” [86].

Refeições frequentes estão associadas com um chamado “declínio dinâmico” das concentrações de glicose imediatamente após o pico induzido pela ingestão de carboidrato. Além disso, os efeitos hipo e hiperglicêmicos da alimentação rica em carboidratos e gordura poderiam ser parcialmente explicados pela baixa saciedade observada no período pós-prandial.

A longa exposição à hiperglicemia e hiperinsulinemia crônica resulta em um decréscimo da expressão de enzimas chaves e alteram o potencial para oxidação de gordura, como por exemplo, a enzima Malonil-CoA, intermediário da oxidação da glicose, inibindo fortemente o transporte de ácidos graxos para dentro da mitocôndria, resultando um decréscimo de sua oxidação [87]. A capacidade reduzida de oxidação de ácidos graxos está presente em alguns indivíduos obesos [88] e ratos obesos [89].

Outras alterações bioquímicas são induzidas pela elevação da glicemia, dentre elas, destacam-se o aumento da atividade da via dos polióis, ativação da proteína quinase C, entre outros [90]. Entretanto, alguns estudos recentes mostraram que os exercícios físicos aeróbicos e anaeróbicos mesmo feitos de forma mais moderada já apresentam efeitos benéficos, dentre eles, a melhora do controle glicêmico, qualidade de vida, redução dos fatores de risco cardiovasculares, melhora da sensibilidade à insulina, redução da pressão sanguínea.

Autores sugerem que a exposição crônica dos vasos sanguíneos a concentrações elevadas de glicose no sangue contribua para a diminuição da capacidade de vasodilatação, dependente da integridade do endotélio por aumento do estresse oxidativo, gerando mais radicais livres, o que contribui para a peroxidação lipídica [91] e diminuição da capacidade de vasodilatação dependente do endotélio [92].

No nosso estudo, entretanto, após a modificação dietética, não foram encontradas diferenças na glicemia entre os grupos tratados nas semanas de tratamento (figura 13).

O perfil lipídico se apresenta como uma importante análise já que baixos valores de lipoproteínas de alta densidade (HDL-C) são fatores de risco independentes para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV) [93 e 94]. Dados transversais fornecem uma forte evidência que pessoas fisicamente mais ativas têm maiores níveis de HDL-C e reduzido risco de DCV [95, 96 e 97].

Em contraste, os estudos acerca de exercícios aeróbicos variam entre si consideravelmente, dependendo do programa (duração, intensidade ou frequência), assim como as características dos indivíduos no início dos exercício [98].

No estudo em questão, apesar das tendências de redução nas medidas de colesterol total e na de lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

A medida de leptina faz parte das adipocinas interessantes para dosagem, tendo em vista que estas constituem um link potencial entre o acúmulo de gordura e o desenvolvimento de patologias associadas (como resistência a insulina). A leptina é uma proteína produzida e

liberada pelas células do tecido adiposo e que possui função de regular a ingestão e gasto energético em roedores [99].

A leptina também é responsável por regular a sensibilidade à insulina assim como a homeostase da glicose através de dois mecanismos: o primeiro, por meio do controle do balanço energético e gordura corporal, e, o segundo, por uma via independente da adiposidade mediada pelo sistema nervoso central de controle hepático de glicose [100 e 101].

Nos indivíduos obesos há um aumento significativo da leptina, relacionado ao aumento do tecido adiposo, porém, sua resposta a essa proteína não é adequada sem redução da ingesta alimentar [102].

O mecanismo de resistência à leptina possui duas explicações sendo ambas relacionadas à falha em alcançar alvos cerebrais além de inibição da cascata de sinalização intracelular LRb.

Diversos trabalhos mostraram que os níveis plasmáticos de leptina são reduzidos após o treinamento físico em animais alimentados por rações hiperlipídicas [103 e 104]. Steinberg e colaboradores constataram que o treinamento de *endurance* em esteira, com velocidade de 21 m/min, 5 dias por semana, 2 horas/sessão, durante 4 semanas reverte, parcialmente, a resistência à leptina induzida pela dieta hiperlipídica. Resultados semelhantes foram encontrados por Jen e colaboradores que verificaram que o treinamento de *endurance* em ratos evitava o aumento dos níveis plasmáticos de leptina induzido por dieta hiperlipídica. Em adição, estes trabalhos mostraram que, além da redução dos níveis de leptina, isso era acompanhado, também, por menores ganhos de massa corporal e adiposa [104].

Em nosso estudo foi possível observar que, mesmo com massa corporal semelhante ao grupo obeso controle, os hamsters obesos exercitados já apresentaram uma queda na concentração de leptina, mesmo que não significativa. E, após a modificação dietética e associação com o P.T.A., houve uma significativa queda na sua concentração (figura 15).

8.3 Análises microcirculatórias

8.3.1 Permeabilidade microvascular a macromoléculas

O aumento da permeabilidade a macromoléculas pode ser causado, em consequência, de alterações morfo-fisiológicas por diversos agentes como mediadores inflamatórios [105], endotoxinas [106] e lesões vasculares causadas por radicais livres [107]. Dentro desse contexto a obesidade entra como um fator para o aumento da permeabilidade microvascular tendo em vista que há um estado inflamatório sistêmico e uma menor produção do vasodilatador óxido nítrico por uma redução da biodisponibilidade da conformação dimérica da enzima óxido nítrico sintase.

A enzima óxido nítrico sintase (NOS) possui duas conformações distintas e a dimérica é responsável pela produção do vasodilatador óxido nítrico

Estudos mostram que o exercício físico pode influenciar na proporção dímero/monômero da enzima óxido nítrico sintetase, portanto, também, na via de produção de espécies reativas do oxigênio. O exercício é importante à medida que altera a proporção dímero/monômero, priorizando a forma dimérica (forma catalizadora de óxido nítrico) da enzima a custa da conformação monomérica (forma catalizadora de ROS) [108].

A partir do estímulo do exercício há uma menor produção de espécies reativas de oxigênio, no caso, do íon superóxido (O_2^-). Além disso, o exercício é responsável por aumentar a defesa por parte dos sistemas antioxidantes [109].

Foi observado, nesse estudo, que o uso de uma ração hiperlipídica levou a um aumento significativo no número de extravasamentos macromoleculares após isquemia/reperfusão. Entretanto, nosso estudo mostrou que após o PTA os animais obesos exercitados, mesmo sem perda de peso, tiveram uma melhora significativa na contagem de extravasamentos. Tal resultado foi similar aos grupos que tiveram associado perda de peso, onde foi possível observar que após a modificação dietética, associada ou não a uma rotina de exercícios aeróbicos (OBRP e OBRP/EX), a lesão de reperfusão acentuada causada pelo uso da ração hiperlipídica foi completamente revertida (figura 19).

8.3.2 Reatividade Microvascular e Dosagem de eNOS e iNOS

Sabe-se que a aplicação tópica de acetilcolina em uma rede vascular provoca vasodilatação imediata. A explicação para este fato se deve a presença de receptores muscarínicos na região terminal dos nervos simpáticos, que, no momento que são ativados, reduzem a liberação de norepinefrina, inibindo o efeito vasoconstrictor que esta droga exerce sobre os vasos sanguíneos. Além disso, esse bloqueio da liberação de norepinefrina causa um aumento do fluxo sanguíneo para a área afetada, o que pode ser uma explicação para a dilatação encontrada nos vasos [110].

Experimentos realizados por Furchgott e Zawadzki ([111]1980) demonstraram que a acetilcolina causava uma significativa dilatação em artérias de mamíferos. Utilizando uma preparação com a artéria aorta torácica descendente de coelhos, concluiu-se que a ação da acetilcolina no processo de vasodilatação, é via receptores muscarínicos das células endoteliais. E é a partir da estimulação das células endoteliais que há a liberação de fatores que agem nas células musculares lisas, provocando a dilatação dos vasos sanguíneos. Esses fatores são os fatores de relaxamento derivados do endotélio.

Porém, para que a acetilcolina possa começar seus efeitos vasodilatadores é fundamental que o endotélio esteja íntegro. Diferentemente da acetilcolina, o vasodilatador nitroprussiato de sódio não necessita da integridade do endotélio para exercer seu efeito vasodilatador.

O vasodilatador nitroprussiato de sódio atua diretamente na camada muscular lisa dos vasos e ativa a guanilato ciclase independente de agonistas endoteliais o que leva a uma vasodilatação estimulada por GMPc [112].

O endotélio também medeia a hiperpolarização das células musculares lisas vasculares por uma via NO-independente, que aumenta a condutância ao potássio e subsequente propagação da hiperpolarização da célula muscular lisa vascular com manutenção do tônus vascular.

No nosso estudo foi possível observar melhoras em todos os grupos tratados que foram superfundidos com acetilcolina em todas as concentrações (10^{-8} , 10^{-6} , 10^{-4} M), independente da massa corporal. No caso das análises microcirculatórias o exercício exerceu um importante estímulo de melhora, inclusive no grupo obeso (OBEX). A modificação dietética associada ou não a uma rotina de exercícios aeróbicos provou melhorar a resposta endotelial em todas as concentrações de acetilcolina, o que sugere uma melhora na disfunção

endotelial causada pelo uso da ração hiperlipídica (figura 15). Essas modificações mostram um importante resultado, tendo em vista que os animais submetidos não passaram por uma rotina de alta intensidade, inclusive justificada por uma falta de resposta positiva ao exercício. Todavia foi possível observar que mesmo com pouco estímulo há uma melhora significativa das análises microcirculatórias.

Com relação à análise com o vasodilatador nitroprussiato de sódio, não foram encontradas diferenças entre os grupos, inclusive após o tratamento. Isso pode ser explicado pelo tempo de tratamento, que teve por objetivo causar danos endoteliais e não da parede microvascular (figura 18).

O exercício físico é considerado um estímulo angiogênico poderoso dentro dos músculos ativos e que leva a um aumento importante na capilaridade. Além disso, o exercício também altera a reatividade vascular e, portanto, a capacidade de fluxo aumentando o calibre das artérias de irrigação em diferentes sistemas vasculares [113, 114 e 115].

Adiciona-se a isso o aumento da sensibilidade do relaxamento endotélio-dependente pelo estímulo do vasodilatador endotélio-dependente acetilcolina, mas não quando é estimulado pelo vasodilatador endotélio-independente nitroprussiato de sódio.

O exercício crônico aumenta a produção de Óxido Nítrico (NO) mesmo no seu início. Estudos reforçam a idéia de que tais mudanças sejam devido a um aumento da proteína eNOS (óxido nítrico sintetase endotelial) [116 e 117]. Esse aumento está diretamente relacionado com o estímulo provocado pelo “shear stress”.

Os efeitos do treinamento podem ser limitados a vasculatura dos músculos ativos, não se obtendo resultados semelhantes em arteríolas mesentéricas, sugerindo que o mecanismo para esta melhora seja uma indução feita pelo exercício através do aumento do “shear stress” [118]. Outros grupos têm reportado que o “shear stress” induz o aumento da expressão de eNOS e eNOS fosforilada.

Nossos resultados corroboram os encontrados na literatura [108] já que, após a modificação dietética e uma rotina de exercícios houve um aumento linear na expressão de eNOS. Dentre os grupos foi visto novamente que o estímulo do exercício foi suficiente para provocar uma melhora no grupo obeso exercitado (OBEX), tendo em vista que neste observamos uma maior expressão desta enzima em relação ao grupo obeso controle (OBC). Este resultado também é refletido na análise microcirculatória de reatividade, onde, após qualquer intervenção, houve um aumento da resposta ao vasodilatador endotélio-dependente, acetilcolina. Não foram encontradas diferenças em relação às dosagens de iNOS (figura 20).

9 SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Em resumo nossos dados mostraram que animais obesos em condições basais apresentam:

- Valores maiores de peso, comprimento naso-anal e quantidades de tecido adiposo visceral, urogenital e retro-peritoneal em comparação aos grupos de intervenção;
- Menor resposta às aplicações tópicas de drogas vasoativas, no caso, acetilcolina (vasodilatador endotélio-dependente) em todas as concentrações aplicadas, em comparação aos demais grupos;
- Alteração do sistema NO no sistema vascular;
- Lesão de reperfusão mais acentuada, observada pelo maior número de extravasamentos induzidos por isquemia-reperfusão, em comparação aos demais grupos;
- Após a rotina de exercícios e associação com a modificação dietética, um aumento linear da expressão da proteína eNOS.
- Após a rotina de exercícios e associação com a modificação dietética, uma redução linear da quantidade da leptina.

10 CONCLUSÃO

A partir do estudo no nosso laboratório foi possível confirmar que o uso de uma ração hiperlipídica causa alterações microcirculatórias e sugere este modelo como útil para futuros estudos em relação à obesidade e seus possíveis tratamentos.

A partir das análises para a avaliação da microcirculação foi possível observar que: o uso de uma ração com alto teor de gordura causa disfunção endotelial e que com a adição de diferentes intervenções tais como a modificação dietética associada ou não a uma rotina de exercícios aeróbicos foi possível observar uma melhora da disfunção endotelial e no número máximo de extravasamentos de macromoléculas.

Dentro das intervenções, o exercício *per se* demonstrou ser capaz de reverter danos endoteliais assim como reduzir aqueles causados por isquemia e reperfusão mesmo sem perda de gordura ou massa corporal.

A massa corporal, comprimento naso-anal e pesagem de diferentes tecidos adiposos aferidos mostraram melhora nos grupos tratados somente com a modificação dietética e, potencializada com a submissão de uma rotina de exercícios (PTA).

Com relação aos marcadores bioquímicos tradicionais, apesar de não haver diferenças significativas, houve uma tendência de redução nos grupos exercitados para as medidas de colesterol total e LDL-C. Adiciona-se a análise de leptina que mostrou uma redução linear após às intervenções em relação ao grupo obeso controle.

Os resultados microcirculatórios foram reforçados com a dosagem da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) que sofreu um incremento linear em todos os grupos tratados em relação ao grupo obeso controle.

REFERÊNCIAS

- 1 Who Index, Facts. 2006 [acesso em 2011]. Disponível em: <http://www.who.int/features/qa/49/en/index.html>.
- 2 Vigitel Brasil 2009: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2010. [Acesso em 2011]. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/vigitel2009_220610.pdf>.
- 3 Pesquisa de Orçamentos Familiares: Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2008-2009.[Acesso em 2011] Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_encaa/pof_20082009_encaa.pdf.
- 4 Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006; 444:860-67.
- 5 Antuma-Puente B, Fève B, Fellahi S, Bastard J-P. Adipokines: The missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes & Metabolism*. 2008; 34 2-11.
- 6 Yudkin JS, Stehouwer CD, Erneis JJ & Coppack SWC. C-reactive protein in healthy subjects: association with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines origination from adipose tissue? *Arterioscler. Thromb, Vasc. Biol*. 1999; 19, 972-978.
- 7 Côté M. Adiponectinemia in visceral obesity: impact on glucose tolerance and plasma lipoprotein and lipids levels in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2005; 90, 1434-1439.
- 8 Berg AH & Scherer PE. Adipose tissue inflammation and cardiovascular disease. *Cir Res* 2005; 96, 939-949.
- 9 Matsuzawa Y. Therapy Insight: adipokynes in metabolic syndrome and related cardiovascular disease. *Nature Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006; 3, 35-42.
- 10 Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β e NF-kB. *Nat. Med*. 2005; 11:183-90.

- 11 Ehses JA, Perren A, Eppler E, Ribaux P, Popsilik JA. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2007; 56:2356-70.
- 12 De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*. 2005; 146:4192-99.
- 13 Saghizadeh M, Ong JM, Garvey WT, Henry RR, Kern PA. The expression of TNF- α by human muscle, Relationship to insulin resistance. *J. Clin. Investig.* 1996; 97:1111-16.
- 14 WHO INDEX, FACTS. <http://www.who.int/features/qa/49/en/index.html>. (2006); Acesso 2011.
- 15 Mauriège P. Regional variation in adipose tissue metabolism of severely obese premenopausal women. *J.Lipid. Res.* 1995; 36:672-684.
- 16 Mittleman, Sd, Van Citters GW, Kirkman EL & Bergman RN. Extreme insulin resistance of the central adipose depot in vivo. *Diabetes*. 2002; 51, 755-761.
- 17 Abate N, Garg A. Heterogeneity in adipose tissue metabolism: causes, implications and management of regional adiposity. *Lipid research* 1995; 34: 53-70.
- 18 Rutkowski JM, Davis KE, Scherer, PE. Mechanisms of obesity and related pathologies: the macro- and microcirculation of adipose tissue. *The FEBS Journal* 2009; 276(20): 5738-46.
- 19 Rosa EC, Zanella MT, Ribeiro AB, Junior OK. Obesidade visceral, hipertensão arterial e risco cardíaco-renal: uma revisão. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2005; 49(2): 196-204.
- 20 Von Diemen V, Trindade EN, Trindade MRM. Experimental model to induce obesity in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira* – 2006; Vol 21 (6) 425.
- 21 Good DJ. Using obese mouse models in research: special considerations for IACUC members, animal care technicians, and researchers. *Lab Animal*. 2005; 34(2):30-7.
- 22 Berne RM and Levy MN. *Fisiologia*. Guanabara Koogan 2000, 4ª Edição, cap. 27 – [287-289].

- 23 Guyton AC and Hall JE. Tratado de Fisiologia Médica. Elsevier 2010, 11^a Edição; cap. 16 (181-182).
- 24 Levick JR. An introduction to cardiovascular physiology. Butterworth &Co (publishers) Ltd.: 1991; 117-141.
- 25 Contran RS, Kumar V. And Robbins ST. Fundamentos de Robbins, Patologia Estrutural e funcional. 2001; 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- 26 Goodman and Gilman A, Rall TW, Nies AS and Taylor P. As bases farmacológicas da terapêutica. Guanabara Koogan: 1996; 8^a Edição, cap. 5.
- 27 Valle LBS, Oliveira Filho RM, DeLucia R, Oga S. Farmacologia Integrada – Fundamentos Farmacológicos da Terapêutica. Vol II, 1991; cap.29:pp. 435-6.
- 28 Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme-isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxidase to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. Nature 1976; 263: 663-665.
- 29 Kerwin JF, Lancaster JR. and Feldman PL. Nitric Oxide: a new paradigm for second messengers. J. Med. Chem. 1995; 38: 434-436.
- 30 Knowles RG and Moncada S. Nitric Oxide synthases in mammals. Biochem. J. 1994; 298: 249-258.
- 31 Levick JR. An introduction to cardiovascular physiology. Butterworth &Co (publishers) Ltd.: 1991; 117-141.
- 32 Persson CGA and Svensjo E. Vascular responses and their suppression: drugs interfering with venular permeability. In: Handbook of inflammation, vol. 5: The pharmacology of inflammation. Bonta, I. L., Bray, M. A. and Pamham, M. J. (eds.). Elsevier, Amsterdam: 1985; 61-82.
- 33 Hultström D, Svensjo E. Intravital and electron microscopic study of bradykinin-induced vascular permeability changes using FITC-dextran as a tracer. J. Pathol. 1979; 129: 125-133.
- 34 Bouskela E, Cyrino FZGA, and Marcelon G. Inhibitory effect of the Ruscus extract and of the flavonoid hesperidine methylchalcone on increase microvascular permeability

- induced by various agents in the hamsters cheek pouch. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1993; 22: 225-230.
- 35 Bjork J, Arfors KE, Dahlén SE and Hedqvist P. Effects of leukotrienes on vascular permeability and leukocyte adhesion. In: *The Inflammatory Process*. Venge, P., Lindbom, A. (eds.), Almqvist & Wiksell, Uppsala, Suécia, 1981; 103-112.
 - 36 Carvalho-Gama H. Estudo da endotoxemia na microcirculação: efeitos da perfusão com soluções cristalóides com e sem adição de colóides. Tese (Mestrado em Biologia). 1997, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
 - 37 Svensjo E. The hamsters cheek pouch as a model in microcirculation research. *Eur. Respir. J.* 1990; 3 (suppl. 12): 595s-601s.
 - 38 Grega GJ, Svensjo E and Haddy FJ. Macromolecular permeability of the microvascular membrane: physiological and pharmacological regulation. *Microcirculation* 1981; 1(4): 325-341.
 - 39 Rippe B, and Haraldsson B. Transport of macromolecules across microvascular walls: The two-pore theory. *Physiological Reviews* 1994; 74: 163-219.
 - 40 Svensjo E, Arfors K-E, Arturson G and Rutili G. The hamster cheek pouch preparation as a model for studies of macromolecular permeability of the microvasculature. *Uppsala. J. Med. Sci.* 1978; 83: 71-79.
 - 41 Handler AH. and Shepro D. Cheek pouch technology: uses and applications. IN: Hoffman R.A., Robinson PF, Magalhães, H. (eds.). *The golden hamster: its biology and use in medical research*. The Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA: 1968; 195-201.
 - 42 Desai RG. Hematology and Microcirculation. In: Hoffman, R. A., Robinson, P. F., Magalhães, H. (eds.). *The golden hamster: its biology and use in medical research*. The Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA: 1968; 185-194 .
 - 43 You T, Nicklas BJ. Effects of Exercise on Adipokines and Metabolic Syndrome. *Current Diabetes Report*, 2008; 8:7-11.
 - 44 Bakker W, Eringa EC, Sipkema P, Van Hinsbergh VWM. Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity. *Cell Tissue Res* 2009; 335:165–189.

- 45 Giugliano D, Ceriello A. And Pailisso G. Diabetes mellitus, hypertension and cardiovascular disease: which role for oxidative strss? *Metabolism* 1995; 44: 363-368.
- 46 Mohazzab HKM. and Wolin MS. Properties of a superoxide anion generation micrososomal NADH-oxidoreductase, a potencial pulmonary artery PO₂ sensor. *Am. J. Physiol.* 1994; 267:L823-L831.
- 47 Tesfamarian B. Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radical Biol. Med.* 1994; 16:383-391
- 48 Serné EH, de Jongh RT, Eringa EC, Ijzerman RG, de Boer MP, Stehouwer CDA et al. Microvascular Dysfunction: Causative role between hypertension, insulin resistance and the metabolic syndrome? *Essays in Biochemistry* 2006; volume 42.
- 49 Villela NR, Kramer-Aguiar LG, Bottino DA, Wiernsperger N, Bouskela E. Metabolic disturbances linked to obesity: the role of impaired tissue perfusion. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009; Mar; 53(2):238-45.
- 50 de Jongh, RT, Serné, EH, IJzerman, RG, de Vries, G & Stehouwer, CD. Impaired microvascular function in obesity: implications for obesity-associated microangiopathy, hypertension and insulin resistance. *Circulation* 2004; 109, 2529 –2535
- 51 Krentz AJ. Clough G. Byrne CD. Vascular Disease in the Metabolic Syndrome:Do We Need to Target the Microcirculation to Treat Large Vessel Disease? *J. Vasc Res.* 2009; 46:515–526.
- 52 Rosen ED and Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balanceand glucose homeostasis. *NATURE|* 2006; Vol 444|14 /nature05483.
- 53 Byrne CD, Wild SH. *The Metabolic Syndrome.* Wiley 2007 – 1 ed.
- 54 Aguiar LGK, Villela NR, Bouskela E. A microcirculação no diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2007; 51(2): 204-211.
- 55 Aguiar LGK, Laflor CM, Bouskela E. Skin microcirculatory dysfunction is already present in normoglycemic subjects with metabolic syndrome. *Metabolism Clinical and Experimental* 2008; 57: 1740-1746.

- 56 Gielen S, Hambrecht R. The childhood obesity epidemic – impact on endothelial function. *Circulation* 2004; 109:1911–1913.
- 57 Meyer AA, Kundt G, Lenschow U, Schuff-Werner P, Kienast W. Improvement of early vascular changes and cardiovascular risk factors in obese children after a six-month exercise program. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48(9): 1865-1870.
- 58 Meyer AA, Kundt G, Steiner M, Schuff-Werner P, Kienast W. Impaired flow-mediated vasodilation, carotid artery intima-media thickening, and elevated endothelial plasma markers in obese children: the impact of cardiovascular risk factors. *Pediatrics* 2006; 117: 1560–1567.
- 59 Steinberg GR, Smith AC, Wormald S, Malenfant P, Collier C, Dyck DJ. Endurance training partially reverses dietary-induced leptin resistance in rodent skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004; 286:E57-63.
- 60 Mensah GA, Mokdad AH, Ford E, Narayan KM, Giles WH, Vinicor F, Deedwania PC. Obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes: emerging epidemics and their cardiovascular implications. *Cardiol Clin*. 2004 Nov;22(4):485-504.
- 61 Booth FW, Chakravarthy MV, Spangenburg EE. Exercise and gene expression: physiological regulation of the human genome through physical activity. *J Physiol* 2002; 543:399–411.
- 62 Van Melle JP, Bot M, De Jonge P, De Boer RA, Van Veldhuisen DJ, Whooley MA. Diabetes, Glycemic Control, and New-Onset Heart Failure in Patients With Stable Coronary Artery Disease. *Diabetes Care* 2010; 33:2084–2089.
- 63 Kokkinos P, Sheriff H. and Kheirbek R. Physical Inactivity and Mortality Risk. *Cardiology Research and Practice*, 2011; Article ID 924945
- 64 Myers J, Prakash M, Froelicher V, Do D, Partington S, Atwood JE. Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. *N Engl J Med* 2002; 346:793–801.
- 65 Piepoli MF, Corrà U, Benzer W, Bjarnason-Wehrens B, Dendale P, Gaita D et al. Cardiac Rehabilitation Section of the European Association of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. Secondary prevention through cardiac rehabilitation: from knowledge to implementation. A position paper from the Cardiac Rehabilitation Section of the European Association of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation. 2010; Feb 17(1):1-17.

- 66 Cho J-K, Lee S-H, Lee J-Y, Kang H-S. Randomized Controlled Trial of Training Intensity in Adiposity. *Int J Sports Med* 2011; ISSN 0172-4622.
- 67 Kodama S, Tanaka S, Saito K, Shu M, Sone Y, Onitake F et al. Effect of Aerobic Exercise Training on Serum Levels of High-Density Lipoprotein Cholesterol. *Arch Intern Med*. 2007; 167:999-1008.
- 68 King AC, Haskell WL, Young DR, Oka RK, Stefanick ML. Long-term Effects of Varying Intensities and Formats of Physical Activity on Participation Rates, Fitness, and Lipoproteins in Men and Women Aged 50 to 65 Years. *Circulation*.; 1995; 91:2596-2604.
- 69 Pate RR, Pratt M, Blair SN, Haskell WL, Macera CA, Bouchard C, Buchner D, Ettinger W, Heath GW, King AC. Physical activity and public health. A recommendation from the Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports Medicine. *JAMA*. 1995; Feb 1;273(5):402-7.
- 70 Haskell W, Min-Lee I, Pate RR, Powell K, Blair S, Franklin B. Physical Activity and Public Health: Updated Recommendation for Adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 2007. 1423-1434.
- 71 Hambrecht R, Adams V, Erbs S. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2003; 107:3152-8.
- 72 Wasserman SM, Mehraban F, Komuves LG. Gene expression profile of human endothelial cells exposed to sustained fluid shear stress. *Physiol Genomics*. 2002; 12: 13-23.
- 73 Lincoln TM, Komai Avilas P, Cornwell TL. Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Hypertension*. 1994; 23:1141, 1147.
- 74 Jen CJ, Chan HP, Chen HI. Acute exercise enhances vasorelaxation by modulating endothelial calcium signaling in rat aortas. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 282: H977-82.
- 75 Heunskens LMA, Bast AALT, Van Herwaarden CLA, Haenen GRMM and Dekhuijzen PNR. Effects of emphysema and training on glutathione oxidation in the hamster diaphragm. *J Appl Physiol* 2000; 88: 2054–2061.

- 76 Pinheiro AR, Cunha AR, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. Beneficial effects of physical exercise on hypertension and cardiovascular adverse remodeling of diet-induced obese rats. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. 2007; 17, 365e375.
- 77 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 1976; 72:248-54.
- 78 Costa RRS, Villela NR, Souza MGC, Boa BCS, Cyrino FZGA, Silva SV, Lisboa PC, Moura EG, Barja-Fidalgo TC, Eliete Bouskela. High fat diet induces central obesity, insulin resistance and microvascular dysfunction in hamsters. 2011, doi:10.1016/j.mvr.2011.08.007.
- 79 Prentice AM, Jebb SA. Obesity in Britain: gluttony or sloth? *BMJ*; 1995; 311:437–439.
- 80 Heini AF, Weinsier RL. Divergent trends in obesity and fat intake patterns: the American paradox. *Am J Med*. 1997; 102:259–264.
- 81 Weinsier RL, Hunter GR, Heini AF, Goran MI, Sell SM. The etiology of obesity: relative contribution of metabolic factors, diet, and physical activity. *Am J Med*; 1998; 105:145–150.
- 82 Ross R, Dagnone D, Jones PJ. Reduction in obesity and related comorbid conditions after diet-induced weight loss or exercise induced weight loss in men. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med*. 2000; 133:92–103.
- 83 Houmard JA, Tanner CJ, Slentz CA. Effect of the volume and intensity of exercise training on insulin sensitivity. *J Appl Physiol* 2004; 96:101–106.
- 84 Després JP & Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. 2006; *Nature*|Vol 444|14 |doi:10.1038/nature05488.
- 85 Wildman RP. Healthy obesity. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 2009 - Volume 12 - Issue 4 - p 438-443. doi: 10.1097/MCO.0b013e32832c6db7.
- 86 Ludwig DS. Dietary glycemic index and obesity. *J Nutr*. 130(suppl): 2000; 280S–3S.
- 87 Wolfe RR. Metabolic interactions between glucose and fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr*. 67(suppl): 1998; 519S–26S.

- 88 Simoneau JA, Veerkamp JH, Turcotte LP, Kelley DE. Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and effects of weight loss. *FASEB J*; 1999; 13:2051–60.
- 89 Commerford SR, Pagliassotti MJ, Melby CL, Wei Y, Gayles EC, Hill JO. Fat oxidation, lipolysis, and free fatty acid cycling in obesity-prone and obesity-resistant rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279:E875–85.
- 90 Hammes HP, Bartmann A, Engel L and Wulfroth P. Antioxidant treatment of experimental diabetic retinopathy in rats with nicanartine. *Diabetologia* 1997; 40:629-634.
- 91 Mohanty P, Hamouda W, Garg R, Aijada R, Ghanim H. and Dandona P. Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2970-2973.
- 92 Dandona P. Endothelium, Inflammation and Diabetes. *Curr Diab Rep Latin Am* 2003; 2: 20-24.
- 93 Franceschini G. Epidemiologic evidence for high-density lipoprotein cholesterol as a risk factor for coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 2001; 88(12A):9N-13N.
- 94 Boden WE. High-density lipoprotein cholesterol as an independent risk factor in cardiovascular disease: assessing the data from Framingham to the Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Intervention Trial. *Am J Cardiol*. 2001; 86(12A):19L-22L
- 95 Williams PT. High-density lipoprotein cholesterol and other risk factors for coronary heart disease in female runners. *N Engl J Med*. 1996; 334:1298-1303.
- 96 Prentice AM, Jebb SA. Obesity in Britain: gluttony or sloth? *BMJ*; 1995; 311:437–439.
- 97 Rippe B, and Haraldsson B. Transport of macromolecules across microvascular walls: The two-pore theory. *Physiological Reviews* 1994; 74: 163-219.
- 98 Crouse SF, O'Brien BC, Grandjean PW. Training intensity, blood lipids, and apolipoproteins in men with high cholesterol. *J Appl Physiol*. 1997; 82:270-277.
- 99 Munzberg H & Myers Jr MG. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nature Neuroscience*. 2005, Vol 8/ Number 5.

- 100 Kamohara S, Burcelin R, Halaas JR, Friedman JM and Charron MJ. Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature*. 1997; 389, 374-377.
- 101 Burcelin R. Acute intravenous leptin infusion increases glucose turnover but not skeletal muscle glucose uptake in ob/ob mice. *Diabetes*. 1999; 48, 1264-1269.
- 102 Frederich RC. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced for leptin action. *Nat Med*. 1995; 1-1311-1314.
- 103 Kowalska I, Strackowski M, Gorski J, Kinalska I. The effect of fasting and physical exercise on plasma leptin concentrations in high-fat fed rats. *J Physiol Pharmacol*. 1999; 50(2):309-20.
- 104 Jen CKL, Buisson A, Pellizzon M, Ordiz FJR, Ana LS, Brown J. Differential effects of fatty acids and exercise on body weight regulation and metabolism in female Wistar rats. *Exp Biol Med*. 2003; 228:843-9.
- 105 Estadella D, Oyama LM, Dâmaso AR, Ribeiro EB, Nascimento CMD. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition*. 2004; 20:218-24.
- 106 Bouskela E, Cyrino FZGA, and Marcelon G. Inhibitory effect of the Ruscus extract and of the flavonoid hesperidine methylchalcone on increase microvascular permeability induced by various agents in the hamsters cheek pouch. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1993; 22: 225-230.
- 107 Carvalho H, Matos JA, Bouskela E and Svensjo E. Vascular permeability increase and plasma volume loss induced by endotoxin was attenuated by hypertonic saline with or without dextran. *Shock* 1999; 12(1): 75-80.
- 108 Farber JL, Kyle ME. and Coleman JB. Biology of disease: mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab. Invest*. 1990; 62: 670-679.
- 109 Grijalva J, Hicks S, Zhao X, Medikayala S, Kaminski PM, Wolin MS and Edwards JG. Exercise training enhanced myocardial endothelial nitric oxide synthase (eNOS) function in diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Cardiovascular Diabetology*. 2008; 7:34
doi:10.1186/1475-2840-7-34.

- 110 Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Ting NK, Birringer M, Kiehntopf M et al. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *PNAS*. 2009; Vol. 106 _ no. 21 _ 8665–8670.
- 111 Shepherd JT. and Vanhaoutte PM. Endothelium-derived relaxing (EDRF) and contracting factors (EDCF) in the control of cardiovascular homeostasis: the pioneering observations. In: *Cardiovascular significance of endothelium-derived vasoactive factors*. Rubanyi G. M. (eds.). Futura Publishing Company, New York, 1991, pp. 39-64.
- 112 Furchgott RF and Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 299:373-376.
- 113 Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: Testing Clinical relevance. *Circulation*. 2007; 115:1285-1295.
DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.1060652859.
- 114 Laughlin MH. Endothelium mediated control of coronary vascular tone after chronic exercise training. *Med Sci Sports Exerc*. 1995; 27:1152-7.
- 115 Delp MD. Effects of exercise training on endothelium-dependent peripheral vascular responsiveness. *Med Sci Sports Exerc*. 1995; 27:1152-7.
- 116 Leung FP, Yung LM, Laher I, Yao X, Chen ZY and Huang Y. Exercise, Vascular Wall and Cardiovascular Diseases. An Update (Part 1). *Sports Med*. 2008; 38(12): 1009-1024.
- 117 Sessa WC, Pritchard K, Seyedi N, Wang J, Hintze TH. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res*, 1994; 74:349-53.
- 118 Johnson LR, Rush JW, Turk JR, Price EM, Laughlin MH. Short term exercise training increases Ach-induced relaxation and eNOS protein in porcine pulmonary arteries, *J Appl Physiol*, 2001; 90:1102-10.
- 119 Sun EN, Yu DY, Alder VA, Cringler SJ and Yu PK. Direct vasodilatory effect of insulin on isolated retinal arterioles. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1998; 37(13): 2634-2644.