



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

Marcel Pimenta Ferreira

**Treinamento intervalado de alta intensidade (natação), obesidade e estresse oxidativo na menopausa cirúrgica em camundongos**

Rio de Janeiro  
2014

Marcel Pimenta Ferreira

**Treinamento intervalado de alta intensidade (natação), obesidade e estresse oxidativo na menopausa cirúrgica em camundongos**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda

Rio de Janeiro

2014

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

F383 Ferreira, Marcel Pimenta.

Treinamento intervalado de alta intensidade (natação), obesidade e estresse oxidativo na menopausa cirúrgica em camundongos / Marcel Pimenta Ferreira. - 2014.

57 f.

Orientador: Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda

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

1. Exercícios físicos aquáticos - Teses. 2. Natação - Uso terapêutico - Teses. 3. Menopausa - Teses. 4. Obesidade - Teses. 5. Stress oxidativo - Teses. I. Mandarin-de-Lacerda, Carlos Alberto. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 613.72

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

---

Assinatura

---

Data

Marcel Pimenta Ferreira

**Treinamento intervalado de alta intensidade (natação), obesidade e estresse oxidativo na menopausa cirúrgica em camundongos**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 22 de outubro de 2014.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda (Orientador)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Tatiane da Silva Faria  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof. Dr. Pedro Paulo da Silva Soares  
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2014

## DEDICATÓRIA

Para a minha família, meus amigos e minha noiva.

## AGRADECIMENTOS

À minha família, pais, irmão e avós, que me proporcionaram todo o suporte para a realização não só do mestrado, mas sim, de todas as conquistas da minha vida.

A minha namorada e futura esposa que me acompanha desde o início da minha vida universitária, sendo essencial seu apoio e companheirismo para a realização das minhas conquistas.

Aos eternos amigos de infância, irmãos, que sempre me apoiaram e incentivaram a realização da universidade e do mestrado, estaremos sempre juntos.

Ao médico, mestre e grande amigo Afonso, que conheci na universidade e levarei para a vida toda, seu apoio e o aprendizado que recebi foi essencial para minha formação profissional e pessoal, sem ele não seria possível nem iniciar esse trabalho.

Ao grande amigo Guilherme Sá pela enorme ajuda durante todo esse trabalho e toda a graduação estando sempre ao meu lado para todos os momentos.

Aos amigos Victor Motta e Alini Schultz, por todo suporte “braçal” e intelectual neste trabalho.

As amigas Thatiany Marinho, Fernanda Ornellas, Aline Penna, Michele M. Soares, Gezileia B. Lau e Iara Karise que me ajudaram e sempre estiveram dispostas a auxiliar a qualquer momento em que necessitei.

A Prof<sup>a</sup> Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarim-de-Lacerda pela atenção e presteza com meu trabalho, e por toda a assessoria nos aspectos nutricionais do estudo.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda pela confiança, suporte, compreensão e paciência com o meu trabalho, além de me possibilitar a desenvolvê-lo com todo suporte técnico e subsídios inerentes ao estudo.

Vencer é o que importa. O resto é a consequência.

*Ayrton Senna*

## RESUMO

FERREIRA, Marcel Pimenta. *Treinamento intervalado de alta intensidade (natação), obesidade e estresse oxidativo na menopausa cirúrgica em camundongos*. 2014. 57f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

A ausência de estrogênios tem o problema significativo da obesidade e comorbidades em mulheres na pós-menopausa. Treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT, natação) pode ter efeitos benéficos. Camundongos fêmeas C57BL/6 com 3 meses de idade foram bilateralmente ooforectomizadas (grupo OVX) ou submetidos a um estresse cirúrgico sem ooforectomia (grupo sham) e separados em ração padrão (SHAM-SC; OVX-SC) e dieta rica em gordura (SHAM -HF; OVX-HF). Após 13 semanas, o HIIT começou por 7 semanas em grupos não treinados (NT) e treinados (T). A massa do útero mostrou uma redução significativa de 270% no grupo OVX ( $P < 0,0001$ ). Antes do HIIT, grupos ooforectomizados mostraram maior evolução da massa corporal (MC) do que grupos SHAM e o grupo OVX-HF-NT mostrou maior evolução da MC do que o grupo OVX-SC-NT. O HIIT mudou a tendência da evolução da MC nos animais. Quase instantaneamente, todos os grupos treinados mostraram uma tendência decrescente da MC em relação a contrapartes do NT. A pressão arterial (PA), colesterol total e do ácido tiobarbitúrico reativa tiveram aumento substancial em animais OVX e HF em comparação com seus respectivos, e o HIIT eficientemente reduziu todos. Nos camundongos HF e OVX, a superóxido dismutase muscular e catalase foram baixos assim como a GPx e a GR, e o HIIT conseguiu normalizar. A obesidade induzida por dieta maximiza os efeitos deletérios da ooforectomia. O HIIT exige algumas sessões semanais com pequena duração de cada sessão de treinamento, que são argumentos importantes para motivar as pessoas para fazer o treinamento nos dias de hoje. O HIIT tem efeitos benéficos, reduzindo MC, PA e estresse oxidativo. Portanto, podemos aceitar que HIIT diminui o aumento do risco cardiovascular e metabólico inerente à obesidade e menopausa

Palavras chave: Exercício. Menopausa. Obesidade. Exercício de alta intensidade. HIIT.



## ABSTRACT

FERREIRA, Marcel Pimenta. *High intensity interval training (swimming), obesity and oxidative stress in surgical menopause in mice*. 2014. 57f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

The absence of estrogens has a significant issue of obesity and comorbidities in postmenopausal women. High intensity interval training (HIIT, swimming) may have beneficial effects. Three-month-old female C57BL/6 mice were bilaterally ovariectomized (OVX group) or submitted to a surgical stress without ovariectomy (SHAM group) and separated into standard chow (SHAM-SC; OVX-SC) and high-fat diet (SHAM-HF; OVX-HF). After 13 weeks, HIIT began for 7 weeks into non-trained (NT) and trained (T) groups. The uterus mass showed a significant reduction of 270 % in the OVX group ( $P < 0.0001$ ). Before HIIT, ovariectomized groups showed greater body mass (BM) evolution than SHAM groups, and OVX-HF-NT showed greater BM evolution than the group OVX-SC-NT. HIIT changed the trend of the evolution of BM in animals. Almost instantly, all trained groups showed decreasing trend of BM compared to NT counterparts. Blood pressure (BP), total cholesterol and thiobarbituric acid reactive substances raised in animals OVX and HF compared to their counterparts, and HIIT efficiently reduced all. In HF and OVX mice, muscular superoxide dismutase and catalase were low, glutathione peroxidase and glutathione reductase were high, and HIIT normalizes all. Diet-induced obesity maximizes the deleterious effects of ovariectomy. HIIT necessitates a few weekly sessions with small duration of each training session, which are significant arguments to motivate people to make training in the present days. HIIT has beneficial effects reducing BM, BP and oxidative stress. Therefore, we can accept that HIIT diminishes the increased risk cardiovascular and metabolic inherent to obesity and menopause.

Keywords: Exercise. Menopause. Obesity. High intensity exercise. HIIT.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1 – Composições das Dietas .....	27
Tabela 2 – RT-qPCR primers e respectivas sequências .....	32
Figura 1 – Massa corporal .....	35
Figura 2 – Pressão Arterial .....	36
Figura 3 – Estresse oxidativo nos eritrócitos .....	38
Figura 4 – Western Blot (músculo esquelético) .....	42
Figura 5 – RT-qPCR (músculo esquelético) .....	43
Tabela 3 - Dados dos grupos .....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	análise de variância
CAT	catalase
GPx	glutadiona peroxidase
GR	glutadiona redutase
HF	dieta hiperlipídica
HIIT	treinamento intervalado de alta intensidade
MC	massa corporal
NT	não treinado
OVX	ooforectomia
PA	pressão arterial
RNA	ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	ácido ribonucleico mensageiro
SC	dieta padrão
SH	procedimento simulado
SOD	superóxido dismutase
T	treinado
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	15
1.1	<b>Menopausa</b> .....	15
1.2	<b>Obesidade</b> .....	16
1.3	<b>Estresse Oxidativo</b> .....	18
1.4	<b>Sistema Antioxidante</b> .....	20
1.5	<b>Treinamento Intervalado de Alta Intensidade</b> .....	22
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	24
2.1	<b>Geral</b> .....	24
2.2	<b>Específicos</b> .....	24
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
3.1	<b>Animais e dietas</b> .....	25
3.2	<b>Cirurgia</b> .....	25
3.3	<b>Protocolo de treinamento</b> .....	28
3.4	<b>Pressão arterial</b> .....	28
3.5	<b>Eutanásia</b> .....	29
3.6	<b>Bioquímica do plasma e estresse oxidativo nos eritrócitos</b> .....	29
3.7	<b>Western Blot</b> .....	30
3.8	<b>RT-qPCR</b> .....	31
3.9	<b>Análise estatística</b> .....	32
4	<b>RESULTADOS</b> .....	33
4.1	<b>Massa do útero</b> .....	33
4.2	<b>Massa corporal</b> .....	33
4.2.1	<u>Antes do HIIT</u> .....	33
4.2.2	<u>Depois do HIIT</u> .....	33
4.3	<b>Ingestão alimentar e ingestão energética</b> .....	34
4.4	<b>Pressão arterial</b> .....	36
4.5	<b>Bioquímica do plasma e estresse oxidativo nos eritrócitos</b> .....	37
4.6	<b>Western blot (músculo esquelético)</b> .....	38
4.6.1	<u>SOD</u> .....	38

4.6.2	GPX e GR .....	39
4.6.3	Catalase .....	39
4.7	<b>RT-qPCR (músculo esquelético)</b> .....	40
4.7.1	<u>SOD</u> .....	40
4.7.2	<u>GPx e GR</u> .....	40
4.7.3	<u>Catalase</u> .....	41
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	45
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	49
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	50
	<b>ANEXO A</b> - Termo de submissão do artigo científico à publicação.....	56
	<b>ANEXO B</b> - Certificado da Comissão de Ética para o cuidado e uso de animais experimentais .....	57

## INTRODUÇÃO

A obesidade é hoje reconhecida como uma epidemia mundial. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2013), em 2008, mais de 1,4 bilhão de adultos com idade superior a 20 anos estavam acima do peso, com 200 milhões de homens e 300 milhões de mulheres. A literatura aponta que maus hábitos no estilo de vida, como uma dieta rica em lipídios combinado com estilo de vida sedentário, são a chave do desenvolvimento da obesidade, especialmente o acúmulo de gordura visceral está fortemente associado com diversas condições adversas, como a síndrome metabólica, inflamação, diabetes tipo 2, dislipidemia, resistência à insulina, doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer e morte (Manson, Skerrett et al. 2004; Chang, Beason et al. 2012; Kastorini and Panagiotakos 2012).

As mulheres entre os 45 e os 55 anos de idade desenvolvem a menopausa, devido ao envelhecimento biológico, o qual é caracterizado pela redução na produção das hormonas sexuais femininas, especialmente estrogênio. A mulher é diagnosticada depois que tem amenorreia há 12 meses consecutivos (Soules, Sherman et al. 2001). A redução do estrogênio contribui para um grande déficit na qualidade de vida das mulheres, tais como a massa muscular reduzida (sarcopenia), redistribuição e aumento subcutâneo e visceral de gordura, aumentando o risco de doença cardiovascular e aumento do estresse oxidativo, que é caracterizada por um desequilíbrio negativo na produção de radicais livres e a capacidade antioxidante do organismo (Signorelli, Neri et al. 2001; Carr 2003).

A fim de estudar a menopausa em humanos, procurou-se um modelo experimental em animais, especialmente roedores, ratos e camundongos, com características presentes e anormalidades endócrinas encontradas em seres humanos. Em ratos e camundongos foi utilizado como um modelo da menopausa a cirurgia de ooforectomia bilateral que consiste na remoção dos ovários, sendo assim distribuído em investigação pré-clínica translacional (Diaz Brinton 2012). Estudos experimentais têm mostrado um aumento do estresse oxidativo em animais ovariectomizados, o que pode causar a apoptose celular, em alguns casos (Juan, Chuang et al. 2012; Evsen, Ozler et al. 2013). Também é notável o aumento da resistência à insulina no fígado e no músculo esquelético (Wang, Li et al. 2013).

É bem reconhecido que os camundongos C57BL/6 apresentam como efeito

crônico da ingestão de uma dieta rica em gordura a remodelação de tecido adiposo, com hiperplasia e hipertrofia das suas células (adipócitos) e o desenvolvimento de esteatose hepática não alcoólica (Fraulob, Ogg-Diamantino et al. 2010). Assim, a associação de dieta rica em gordura e ooforectomia agrava os efeitos deletérios de ambos os insultos (Ludgero-Correia, Aguila et al. 2012).

Diante do exposto, parece clara a relação entre a menopausa, a obesidade e o sedentarismo e a associação de causas multifatoriais que culminam na redução da qualidade de vida e saúde da mulher. No entanto, a prática habitual de exercício contínuo de intensidade baixa a moderada surge como uma terapia não farmacológica eficaz para o tratamento dos efeitos deletérios e é amplamente estudado na literatura (Heeren, De Sousa et al. 2009; Jeong and Yoon 2012).

No entanto, há poucos estudos em relação ao treinamento intervalado de alta intensidade. Portanto, os estudos envolvendo a ooforectomia, dieta rica em gordura e este sistema de treinamento são escassos na literatura (Moholdt, Madssen et al. 2013).

O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos do treinamento de alta intensidade intervalado (natação), cujo protocolo inclui uma redução do tempo da sessão e da frequência de treinamento, em mudanças no perfil oxidativo em modelo experimental de ooforectomia e / ou combinada com a administração de uma dieta rica em gordura.

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Menopausa

A menopausa é diagnosticada após a ausência da menstruação no período de 1 ano e tem início por volta de 45 a 55 anos. O momento designado de pós-menopausa ocorre após o último ciclo menstrual da mulher, podendo ser fisiológica ou cirúrgica (ooforectomia). A palavra menopausa vem do grego “*men*” (mês) e *pausis* (interrupção, pausa, repouso) referindo-se a interrupção do ciclo menstrual. A pós-menopausa é frequentemente relacionada à ocorrência de diversas mudanças fisiopatológicas tais como, aterosclerose, obesidade, dislipidemias, distúrbios de humor, osteoporose e envelhecimento da pele, sugerindo que a redução na produção de estrogênio pode ser responsável por acelerar o desenvolvimento de processos degenerativos (Miquel, Ramirez-Bosca et al. 2006).

Já se sabe que a pós-menopausa natural ou induzida pela cirurgia de ooforectomia gera, como consequência, tanto em mulheres como em roedores, aumentos nos depósitos de gordura no tecido adiposo (Butera 2010). Assim, redução dos níveis de estrogênio pode vir a ocasionar a obesidade, mas independente disso, há uma alteração da disposição do tecido adiposo, resultando em formas mais andrógenas. Além disso, a escassez deste hormônio gera o aumento da pressão arterial e alteração no perfil lipídico (Carr 2003; Butera 2010). No metabolismo das lipoproteínas plasmáticas é observado aumento nos níveis plasmáticos de LDL-colesterol (lipoproteína de baixa densidade) e diminuição nos níveis plasmáticos de HDL-colesterol (lipoproteína de alta densidade). Essas alterações têm sido relacionadas ao aumento do risco de doenças cardiovasculares no período pós-menopausa (Bittner 2005).

Estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo e a inflamação estão frequentemente associados e têm uma importante participação no desenvolvimento e manutenção da hipertensão. Ainda não está esclarecido se o estresse oxidativo e a inflamação causam a hipertensão, ou se a hipertensão promove o aumento desses eventos nos tecidos cardiovasculares, renais, hepáticos e adiposos. Essas observações indicam que o estresse oxidativo, a inflamação e a hipertensão arterial



participam de um ciclo de ativação e perpetuação de sinais que podem causar a progressão de doenças cardiovasculares (Vaziri and Rodriguez-Iturbe 2006).

Observa-se uma menor incidência de doenças cardiovasculares em mulheres antes da menopausa, levando a ideia de que o estrogênio é responsável por essa proteção cardiovascular (Khalil 2005). Vários mecanismos têm sido propostos a fim de explicar os efeitos benéficos do estrogênio no sistema cardiovascular, como por exemplo, redução da pressão arterial, alterações no metabolismo lipídico e efeitos antioxidantes (Higashi, Sanada et al. 2001).

## 1.2 Obesidade

Segundo informações sobre a obesidade da Organização Mundial da Saúde, o sobrepeso e a obesidade são definidos como o acúmulo de gordura anormal ou excessivo que apresenta um risco para a saúde. Uma medida bruta populacional de obesidade é o índice de massa corporal (IMC), que consiste no peso de uma pessoa (em quilogramas) dividido pelo quadrado da sua altura (em metros). Uma pessoa com um IMC de 30 ou mais é geralmente considerada obesa. Uma pessoa com um IMC igual ou superior a 25 é considerado com sobrepeso. O sobrepeso e a obesidade são os principais fatores de risco para uma série de doenças crônicas, incluindo diabetes, doenças cardiovasculares e câncer. Uma vez considerado um problema apenas em países de alta renda, o sobrepeso e a obesidade estão agora dramaticamente em ascensão em países de baixa e média renda, especialmente em ambientes urbanos.

No mundo, há atualmente 2,1 bilhões de pessoas obesas ou com sobrepeso, o que representa quase 30% da população mundial. De 1980 a 2013, a obesidade e o sobrepeso, em conjunto, aumentaram 27,5% entre os adultos e 47,1% entre as crianças. A obesidade e o sobrepeso também aumentaram entre crianças e adolescentes, especialmente nos países desenvolvidos onde, em 2013, 23,8% dos meninos e 22,6% das meninas tinham sobrepeso ou obesidade. Nos países em desenvolvimento, esse índice é de 12,9% entre os meninos e 13,4% entre as meninas. No Brasil, segundo o estudo, 52,5% dos homens com mais de 20 anos e 58,4% das mulheres da mesma faixa etária apresentam sobrepeso ou obesidade.

Entre os garotos com menos de 20 anos, essa parcela é de 22,1%; e entre as garotas, o índice é de 24,3%. O Brasil fica acima da média global de obesidade, mas abaixo de países como Estados Unidos, Reino Unido, México e Bolívia. Nenhum país teve um declínio significativo da obesidade nos últimos 33 anos, o que representa um motivo de preocupação (Ng, Fleming et al. 2014).

Devido a essa epidemia, a obesidade vem sendo alvo de muitos estudos por todo o mundo. O grande passo inicial foi a descoberta que o tecido adiposo é um órgão endócrino, capaz de produzir e liberar substâncias no organismo humano sinalizadoras do estoque energético e não mais, apenas, como um tecido que cuja função era de estoque de energia na forma de gordura que poderia ser rapidamente mobilizado durante o jejum ou outros períodos de necessidade de energia, por regulação hormonal (insulina, glicocorticoides) ou pelo Sistema Nervoso Simpático (catecolaminas). A obesidade gera uma produção anormal de citocinas com a ativação de algumas vias de sinalização pró-inflamatórias relacionadas à doença (Bastard, Maachi et al. 2002; Stepan and Lazar 2002). Com isso, foi descoberto que à medida que o adipócito aumenta o seu tamanho ou quantidade, aumenta também a produção e liberação destas citocinas, como consequência o aumento da massa corporal. A massa corporal adiposa é determinada pela diferenciação de células precursoras em novos adipócitos e pelo aumento do tamanho dos mesmos (hipertrofia) (Ristow, Muller-Wieland et al. 1998). Os estudos atuais indicam que há quatro fatores principais associados a gênese da obesidade: determinantes genéticos, fatores ambientais, comportamento alimentar e aumento do sedentarismo. No entanto, o completo entendimento da sua fisiopatologia permanece sem resposta (Gurevich-Panigrahi, Panigrahi et al. 2009).

No desenvolvimento da obesidade verifica-se a formação de radicais livres, pois o tecido adiposo de animais e humanos obesos sofrem ações de células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos, que aumentam a produção local de citocinas pró-inflamatórias que concomitantemente elevam a produção de radicais livres. Com isso, a inflamação e o estresse oxidativo no tecido adiposo induzem mudanças importantes na expressão gênica do adipócito, no metabolismo lipídico e no conteúdo do adipócito (Espirito and Mazzone 2008). Um dos principais mecanismos responsáveis pela produção dos radicais livres, decorrente da obesidade, é a modificação oxidativa de lipoproteínas circulatórias, particularmente a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDLs). A lipoproteína de baixa

densidade quando oxidada (LDL-ox) é capturada por macrófagos e formam células espumosas carregadas de colesterol. A obesidade também pode induzir estresse oxidativo sistêmico, devido ao aumento na produção de radicais livres na gordura acumulada e consequente redução da capacidade do sistema de defesa antioxidante. Na fisiopatologia da obesidade, há grande formação de radicais livres nas células adiposas, levando a mudanças na expressão gênica do adipócito, no metabolismo dos lipídeos e no conteúdo dos adipócitos, que acompanham o aumento dos níveis da NADPH oxidase e diminuição das defesas antioxidantes. Assim, a obesidade induz o aumento dos radicais livres local e sistêmico, com mudança do estado redox e redução da capacidade do sistema antioxidante (Stefanovic, Kotur-Stevuljevic et al. 2008).

Mesmo sabendo que a cirurgia de ooforectomia não retrata, exatamente, o processo de pós-menopausa, pois este ocorre naturalmente de forma gradual, onde a secreção de estrogênio não reduz abruptamente como na ooforectomia; todavia, este procedimento utilizado em estudos experimentais demonstra-se eficaz, permitindo avaliar os efeitos da ausência do estrógeno na massa corporal, pressão arterial, perfil metabólico, perfil oxidativo dentre outras variáveis (Shi and Clegg 2009). Nesse contexto, modelos experimentais de obesidade induzida pela administração de dieta hiperlipídica em animais camundongos castrados podem fornecer informações importantes para a compreensão dos efeitos deletérios associados à obesidade e menopausa.

### **1.3 Estresse oxidativo**

A instalação do quadro de estresse oxidativo decorre da ocorrência de um desequilíbrio entre os compostos oxidantes e os antioxidantes, seja por uma maior produção de oxidantes ou por uma menor capacidade antioxidante, e até mesmo pelas duas vias. O estresse oxidativo conduz a oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, gerando danos oxidativos contra células e tecidos (Halliwell and Whiteman 2004). O estresse oxidativo pode instalar-se de forma crônica, tendo relevantes implicações sobre o processo etiológico de várias doenças crônicas não transmissíveis como

aterosclerose, diabetes tipo 2, obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer (Green, Brand et al. 2004).

Os compostos oxidantes que promovem o estresse oxidativo são, em sua maioria, radicais livres. A geração dos radicais livres constitui um processo contínuo e fisiológico, pois cumprem funções biológicas relevantes. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas. Assim, a produção dos radicais livres em proporções adequadas possibilita, por exemplo, a geração de ATP, através da cadeia transportadora de elétrons, fertilização do óvulo, ativação de genes, participação de mecanismos de defesa durante o processo de infecção (Halliwell and Whiteman 2004).

Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem, em sua maior parte, nas mitocôndrias, nas membranas celulares e no citoplasma. A mitocôndria é a principal fonte de radicais livres através da cadeia transportadora de elétrons, pois cerca de 2% a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias, a fim de gerar ATP, são desviados para outra via metabólica, e reduzidos de forma univalente, dando origem aos radicais livres (Green, Brand et al. 2004). Essa redução univalente do  $O_2$  é responsável pela geração dos radicais superóxidos ( $O_2^-$ ), hidroxila ( $OH^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Esse processo se dá mediante reações específicas, catalisadas por enzimas e com a participação dos íons ferro e de cobre. O peróxido de hidrogênio não é, exatamente, um radical livre, pois não apresenta um elétron desemparelhado na sua última camada eletrônica, mas é considerado uma espécie com alto potencial reativo porque participa da reação de geração da hidroxila, que corresponde ao radical livre de maior potencial deletério. Outra razão para justificar a importância do  $H_2O_2$  como uma espécie de potencial deletério, se dá pela vida longa que ele possui, diferente dos radicais livres que apresentam uma vida bastante curta. Com isso, o  $H_2O_2$  é capaz de atravessar as membranas celulares e gerar hidroxila dentro da célula, apresentando, então, um grande potencial tóxico aos tecidos. O radical livre superóxido ( $O_2^-$ ) além de participar das reações de geração de  $OH^-$ , pode também, gerar a espécie reativa de nitrogênio, o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), através da reação do  $OH^-$  com o óxido nítrico ( $ON^-$ ) (Green, Brand et al. 2004).

As reações que geram os radicais livres podem ter anexadas a elas, catalisadores cujos responsáveis são os íons dos metais ferro e cobre. Essa participação desses íons como catalisadores se dá pelas reações de Fenton e

Haber-Weiss. A reação de Fenton corresponde a geração do radical  $\text{OH}^\cdot$  por meio da reação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  com os íons de ferro ou cobre, e a reação de Haber-Weiss corresponde a reação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  com o  $\text{O}_2$  gerando  $\text{OH}^\cdot$ , sendo catalisada por esses íons (Barry, Mueller-Bunz et al. 2012).

O radical  $\text{OH}^\cdot$  apresenta o maior potencial reativo e possui extrema instabilidade (vida média de  $10^{-9}$  segundos). Essas características capacitam esse radical livre como o mais propício na produção de danos oxidativos, além de ser o principal iniciador do processo de peroxidação lipídica, tendo como consequência a alteração da função biológica das membranas celulares, esse radical é capaz de agir sobre as proteínas, alterando-as em relação à sua estrutura e/ou função biológica. Seu ataque ao DNA possibilita a ocorrência de mutações (Welch, Davis et al. 2002).

Há também outras vias geradoras de radicais livres, como as enzimas NADPH oxidases (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases*), que são proteínas transmembrana que têm a função de transferir os elétrons através das membranas celulares. Como, geralmente, o acceptor de elétrons é o oxigênio, gera-se o radical superóxido ( $\text{O}_2^\cdot$ ) em decorrência desse processo. Tais enzimas existem em pelo menos seis isoformas, diferindo quanto ao local de expressão e cofatores necessários para a sua ativação (Bedard and Krause 2007).

#### 1.4 Sistema antioxidante

O organismo atua neutralizando o efeito potencialmente danoso dos radicais livres através de substâncias geralmente agrupadas, que se chama sistema de defesa antioxidante, o qual se integram muitas substâncias genericamente denominadas antioxidantes (Valko, Leibfritz et al. 2007). O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não-radicaais. Tais ações podem ser alcançadas por meio de diferentes mecanismos de ação: impedindo a formação dos radicais livres ou espécies não-radicaais (sistemas de prevenção), impedindo a ação desses (sistemas varredores) ou, ainda, favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo). Logo, antioxidante pode ser assim definido como: qualquer substância capaz de doar

elétrons para o radical livre, ativando-o e tornando-o um composto estável (Valko, Leibfritz et al. 2007).

O sistema antioxidante é dividido em enzimático e não-enzimático. O sistema não-enzimático pode ter origem endógena ou dietética e é constituído por uma grande variedade de substâncias antioxidantes, tendo como as principais: vitaminas lipossolúveis (vitamina A, vitamina E, betacaroteno; vitaminas hidrossolúveis (C e complexo B) e oligoelementos (zinco, cobre, selênio, magnésio, entre outras). O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas Superóxido Dismutase (SOD) que são representadas pelo manganês SOD (Mn-SOD) mitocondrial, dependente do manganês, e a cobre zinco SOD (Cu-SOD) citoplasmática, dependente de cobre e zinco; Catalase (CAT), dependente de ferro, e Glutadiona Peroxidase (GPx), dependente ou não do selênio (Valko, Leibfritz et al. 2007).

A SOD é a primeira na linha de defesa da célula e existe em três isoformas: SOD-Cu-Zn (SOD 1) presente no citosol, SOD-Mn (SOD2) localizada primariamente na mitocôndria e a SOD extracelular (SOD 3). A SOD catalisa a dismutação do ânion  $O_2^-$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$ .

A GPx tem ação fundamentalmente citosólica e catalisa a redução do  $H_2O_2$  e peróxidos orgânicos através da utilização da glutadiona (GSH), que atua como co-substrato da glutadiona peroxidase, doando elétrons, a qual é regenerada através da glutadiona redutase (GR) com a transferência do hidrogênio do NADPH. A catalase é uma heme proteína localizada nos peroxissomas e no citosol, e catalisa a redução do  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ . A catalase é efetivada em altos índices de estresse oxidativo com altos níveis de  $H_2O_2$ . Assim, as enzimas CAT e GPx agem com o mesmo propósito, ou seja, o de impedir o acúmulo de peróxido de hidrogênio. Tal ação integrada é de grande importância, uma vez que essa espécie reativa, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, mediante a participação dos metais ferro e cobre, culmina na geração do radical  $OH^\cdot$  contra o qual não há sistema enzimático de defesa (Mayne 2003; Valko, Leibfritz et al. 2007). O estresse oxidativo gera metabólitos específicos, os marcadores do estresse oxidativo, que podem ser identificados e quantificados. Esses marcadores são derivados, principalmente, da oxidação de lipídeos, proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA), sendo os primeiros os de maior expressão. Outra forma de abordar a avaliação do estresse oxidativo é a que emprega métodos indiretos, baseados na capacidade antioxidante (Huang, Ou et al. 2005).

## 1.5 Treinamento Intervalado de Alta Intensidade (HIIT)

Já está bem consolidado na literatura que o exercício físico, realizado de forma adequada e orientada por um professor de educação física, traz vários benefícios à saúde, como melhora do sistema imunológico, prevenção de doenças crônicas como as cardiopatias, diabetes mellitus tipo 2, osteoporose, moderam o colesterol e ajuda na prevenção da obesidade que, atualmente, se tornou epidêmica (Hu, Manson et al. 2001). Infelizmente o exercício físico não é uma atividade presente na maior parte da população, pois perdeu-se o hábito de praticar exercícios físicos na infância e adolescência, tornando-se cada vez mais difícil a sua implementação na vida adulta. Consequentemente, aumenta-se cada vez mais o número de sedentários na população. Os efeitos deletérios do sedentarismo para a saúde humana já são bem conhecidos: maior risco de aterosclerose e seus desdobramentos como angina, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral, aumento do índice de obesidade que gera hipertensão arterial, diabetes mellitus do tipo 2, osteoporose, dislipidemia, doença pulmonar obstrutiva crônica, asma, depressão, ansiedade, alguns tipos de câncer, além de aumentar o risco de lesões osteomusculares e redução da qualidade de vida (Bogdanis, Stavrinou et al. 2013).

O treinamento intervalado de alta intensidade, conhecido como HIIT (*High Intensity Interval Training*) vem sendo uma alternativa para os treinamentos contínuos que necessitam de uma duração na sessão de treinamento maior e, também, maior volume de sessões de treinamento semanais. O HIIT utiliza sessões de treinamento com curta duração, compreendendo esforços de forma intervalada, ou seja, durante um curto período de tempo realiza-se um esforço de alta intensidade e em outro intervalado de tempo realiza-se o descanso com uma atividade de baixa intensidade, constituindo-se determinado número de séries (Gibala, Little et al. 2012). Esse sistema de treinamento intervalado proporciona uma melhora na capacidade física, principalmente cardiovasculares, metabolismo da glicose, composição corporal e perfil oxidativo (Bogdanis, Stavrinou et al. 2013; Moholdt, Madssen et al. 2013). Devido a melhora da qualidade de vida e redução do tempo gasto no treinamento, programas de exercício de alta intensidade vem se tornando bem popular nos dias de hoje (Gibala, Little et al. 2012).

Sabendo-se que, objetivando o aumento do sistema antioxidante, a melhor estratégia pode, realmente, ser a exposição do organismo a momentos de estresse oxidativo fisiológicos (Finkel and Holbrook 2000). Dentro deste contexto, o exercício físico aparece como a melhor forma de expor o corpo ao estresse oxidativo de forma controlada e adaptável, pois o efeito agudo do treinamento é gerar o estresse oxidativo, e o volume desse estresse está diretamente relacionado a intensidade do treinamento, mas lembrando, que o protocolo deve ser elaborado de forma a não gerar uma sobrecarga crônica no sistema antioxidante (Bogdanis, Stavrinou et al. 2013).



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Analisar os efeitos na massa corporal, pressão arterial, perfil lipídico e estresse oxidativo, do treinamento intervalado de alta intensidade em camundongos fêmeas castradas com obesidade induzida por dieta.

### **2.2 Específicos**

Analisar os efeitos do treinamento intervalado de alta intensidade sobre:

- a) Ingestão alimentar e energética e massa corporal;
- b) Níveis plasmáticos de triglicerídeos e colesterol total;
- c) Pressão arterial;
- d) Biomarcadores de estresse oxidativo.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais e dieta

Os protocolos utilizados e o experimento foram submetidos e aprovados ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (**CEUA/072/2012**). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os preceitos da "*Guide for the use o laboratory animal care*" (*NIH Publication No. 85-23, revised in 1996, EUA*). Os animais foram mantidos em um sistema ventilado (NexgenEcoflo, Allentown, Inc., EUA) e temperatura controlada ( $21 \pm 2^\circ \text{C}$ ), umidade ( $60 \pm 10\%$ ), e ciclos de 12 horas de claro e escuro (claro 00:00 as 12:00).

Foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6 (N = 80) com 12 semanas de idade. Os animais passaram pela castração (ooforectomia), descrita a seguir, sendo divididos em dois grupos principais, Controle (SHAM) n=40 e Ooforectomizada (OVX) n=40.

#### 3.2 Cirurgia

Todos os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal da associação de 10 mg/kg MC de cloridrato de xilazina 2% (20mg/ml) +80mg/kg MC de cloridrato de cetamina 10% (100mg/ml). Ambos os compostos foram diluídos na proporção de 1:10 em solução estéril de cloreto de sódio a 0,9%.

Após adequadamente anestesiados os animais foram posicionados em decúbito dorsal, membros anteriores e posteriores abduzidos e fixados com fita adesiva, expondo amplamente a parede anterior do tronco, realizando-se uma tricotomia na região abdominal com posterior aplicação de Polvidine (Iodo Polvidona). Campos cirúrgicos foram posicionados isolando a parede anterior do abdome e laparotomia mediana comprometendo pele, tela subcutânea, linha alba e peritônio parietal anterior foi realizada para acesso a toda a cavidade peritoneal.

Grupo castrado: Os ovários foram identificados *in situ* e gentilmente tracionados lateralmente para adequada exposição do pedículo ovariano. Artéria e veia *ováricas* foram cauterizadas com bisturi elétrico e os ovários foram liberados e removidos por dissecação romba com tesoura curva. Em sequência, procedeu-se à revisão da hemostasia da cavidade peritoneal e da parede abdominal e ao fechamento da ferida operatória com sutura contínua (VYCRIL<sup>®</sup>000). Ao final do fechamento, nova aplicação de Polvidine foi realizada sobre a linha de incisão.

Grupo Sham: Os ovários foram identificados *in situ* e gentilmente tracionados lateralmente para adequada exposição do pedículo ovariano. Em sequência, procedeu-se à revisão da hemostasia da cavidade peritoneal e da parede abdominal e ao fechamento da ferida operatória com sutura contínua. Ao final do fechamento, nova aplicação de Polvidine foi realizada sobre a linha de incisão. Após a cirurgia os animais foram condicionados em caixas individuais por 24 horas.

Exame citológico de esfregaço vaginal foi realizado por duas vezes durante 7 dias no experimento: inicialmente após 2 semanas do período de descanso com o objetivo de verificar se o processo cirúrgico induziu a menopausa e novamente, na véspera da eutanásia para garantir que todos os animais estavam sendo sacrificados na mesma fase do ciclo estral. A massa uterina foi mensurada após a eutanásia para assegurar que a cirurgia de ooforectomia induziu com sucesso a menopausa (Belchetz 1994).

Após 1 semana de descanso da cirurgia, o grupo OVX foi dividido aleatoriamente em dois grupos: animais alimentados com dieta padrão (OVX-SC; n = 20) e animais alimentados com dieta hiperlipídica (OVX-HF, n = 20). O grupo SHAM também foi dividido aleatoriamente em 2 grupos: animais alimentados com dieta padrão (SH-SC; n = 20) e animais alimentados com dieta hiperlipídica (SH-HF; n = 20). As dietas foram produzidas pela PragSoluções de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition 93M* (Reeves, Nielsen et al. 1993). As quantidades de vitaminas e minerais foram idênticas nas duas dietas. A composição das dietas está descrita na Tabela 1.

Após 13 semanas da administração das dietas experimentais, os grupos foram novamente divididos aleatoriamente para iniciar o treinamento durante 8 semanas:

- a) SH-SC-NT (sham – dieta padrão – não treinado)
- b) SH-SC-T (sham – dieta padrão – treinado)

- c) SH-HF-NT (sham – dieta hiperlipídica – não treinado)
- d) SH-HF-T (sham – dieta hiperlipídica – treinado)
- e) OVX-SC-NT (ooforectomizado – dieta padrão – não treinado)
- f) OVX-SC-T (ooforectomizado – dieta padrão – treinado)
- g) OVX-HF-NT (ooforectomizado – dieta hiperlipídica – não treinado)
- h) OVX-HF-T (ooforectomizado – dieta hiperlipídica – treinado)

A massa corporal foi mensurada semanalmente durante o experimento. O experimento teve duração de 21 semanas.

Tabela 1 - Composições das dietas.

<b>Nutrientes (g/kg)</b>	<b>SC</b>	<b>HF</b>
Caseína	190.00	230.00
Amido de milho	539.50	299.50
Sacarose	100.00	100.00
Óleo de soja	70.00	70.00
Banho de porco	-	200.00
Fibras	50.00	50.00
Mistura vitaminas (mg)	10.00	10.00
Mistura mineral (mg)	35.00	35.00
L-cistina	3.00	3.00
Cloreto de colina	2.50	2.50
Antioxidantes	0.01	0.01
Massa total (g)	1.00	1.00
Energia (kcal/kg)	3.95	4.95
Carboidratos (%)	64.00	32.00
Proteínas (%)	19.00	19.00
Lipídeos (%)	17.00	49.00

Nota: mistura vitaminas e de minerais segundo recomendações da AIN-93M.  
 Legenda: SC, dieta padrão; HF, dieta hiperlipídica.  
 Fonte: Reeves, Nielsen *et al.*, 1993.

### **3.3 Protocolo de treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT)**

Os animais foram adaptados para a piscina (15 min/dia durante dois dias alternados) sem carga, antes do início do protocolo de treinamento (um tanque de vidro 40x30x80cm com a temperatura da água controlada,  $32 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Os animais não treinados foram submetidos à mesma forma de adaptação mas não seguiram com o protocolo de treinamento.

Foi realizado um teste máximo de repetições que consistia em 20 segundos de esforço, com uma carga de 10% da massa corporal de cada animal fixada em sua calda, por 20 segundos de descanso passivo. O tempo máximo de natação consistiu no momento em que o animal ficava 10 cm abaixo da água e incapaz de voltar para a superfície para respirar depois de 10s. (Casimiro-Lopes, Alves et al. 2008).

O treinamento consistiu em 50% do número máximo de séries, com 3 sessões de treinamento semanais, durante 8 semanas, sendo que a cada 2 semanas foi incrementado o percentual da carga sobre a massa corporal, começando com 10% e terminando com 14%.

### **3.4 Pressão arterial**

Os animais foram adaptados durante duas semanas ao aparelho utilizado para aferir a pressão arterial (PA) para minimizar o estresse. No final do experimento, a PA sistólica foi mensurada pelo pletismógrafo fixado a cauda com o camundongo consciente. (StoragePressure Meter model LE 5002, Panlab Harvard Apparatus, Barcelona, Espanha).

### 3.5 Eutanásia

Após 72 horas da última sessão de treinamento, os animais com 6 horas de jejum foram anestesiados com pentobarbital sódio (0,42mg/g, i.p.) e o sangue coletado por punção cardíaca em tubos contendo heparina. O sangue coletado foi centrifugado (Centrifuge 5804R, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha, 120g durante 15 minutos) para a obtenção do plasma, este foi armazenado a -80°C até a realização de outras análises. O músculo gastrocnêmico foi dissecado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido -80°C para futuras análises.

### 3.6 Bioquímica do plasma e Estresse oxidativo nos eritrócitos

O colesterol total e triglicerídeos no plasma foram mensurados pelo método de calorimetria enzimática usando um espectrofotômetro automático e com seus respectivos kits para análises (Bioclin, Quibasa, Belo Horizonte, Brasil).

Os eritrócitos foram isolados do plasma por centrifugação (Centrifuge 5804R, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha a 2400 rpm durante 20 minutos) e em seguida foram suspensas em solução salina (mM: 145 NaCl, 1 CaCl, 5 glicose 10 MOPS, pH 7,4) para conseguir valores de hematócrito entre 5 e 10%. O hematócrito e a hemoglobina foram determinados por um contador de células (Sysmex XT-2000i, Sysmex Corporation, Hyogo, Japão).

O dano em lipídios da membrana foi determinado pela formação de subprodutos da peroxidação lipídica (malondialdeído – MDA), que são substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O MDA reage com o ácido tiobarbitúrico, obtendo-se um produto de cor-de-rosa ao ler espectrofotômetro. Este ensaio foi realizado utilizando a técnica descrita previamente (Draper, Squires et al. 1993) e adaptado para os eritrócitos. Foram utilizados 50ul da suspensão de células e adicionados em 1000ul de 10% de ácido tricloroacético. As amostras foram sonicadas (MaxiClean 1400, Unique, Brasil) durante 15 minutos e centrifugadas (5417 C Centrifuge, Eppendorf AG, Alemanha) a 7000 rpm, com temperatura de 4C durante 10 segundos. O sobrenadante foi misturado com 0,67% de ácido

tiobarbitúrico e aquecido durante 30 minutos em banho seco a 100°C. Os níveis de TBARS foram determinados com absorvância de 532 nm (AmershamBiotrak II Visible Plate Reader, GE Healthcare, Uppsala, Suécia), usando 1,1,3,3 – tetrametoxi propano como padrão. A concentração de TBARS foi expressa em nM / g de hemoglobina.

### 3.7 *Western blots* (músculo esquelético)

A expressão da superóxidodismutase (SOD - Santa Cruz Biotechnology, sc-30080, CA, EUA ), glutadionaperoxidase (GPx – Santa Cruz Biotechnology, sc-133160, CA, EUA ), glutadionaredutase (GR – Santa Cruz Biotechnology, sc-133245, CA, EUA ) e catalase (Santa Cruz Biotechnology sc-50508, CA, EUA ) foi detectado por imunotransferência utilizando anticorpos policlonais de coelho. Aproximadamente 150mg do musculo esquelético foram homogeneizados em tampão de lise (pH 6,4) contendo inibidores de proteases. A concentração de proteína no sobrenadante foi determinada com Kit de ensaio de proteínas BCA (ThermoScientific, Rockford, IL, EUA). Trinta microgramas de proteína foram separados por electroforese num gel de poliacrilamida a 10% (SDS-PAGE) e transferidos para uma membrana de PVDF (GE HealthcareBioSciences). As membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em solução salina tamponada com Tris (TBS) (Amershan Biosciences, Uppsala, Suécia) contendo 0,05% Tween-20 (BioRad, CA, EUA) e em seguida, incubadas durante a noite a 4 ° C com anti-SOD, anti-GPx, anti-GR e anti-catalase. Subsequentemente, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS contendo 0,05% Tween-20 e incubado com anticorpo secundário durante 1 hora. A proteína estrutural  $\beta$ -actina (Santa Cruz Biotechnology, code sc-81178, CA, EUA) foi obtida por extração das proteínas da membrana de PVDF do músculo e foi utilizado para corrigir a expressão das proteínas mencionadas. As bandas foram detectadas por quimiluminescência utilizando o kit de reagente ECL (GE Healthcare BioSciences) e obtidas pelo sistema de imagem ChemiDoc (BioRad, EUA). A densidade dos sinais foi analisada utilizando o programa ImageJ versão 1.47q (WyneRasband, National Institutes of Health, EUA).

### 3.8 RT-qPCR (músculo esquelético)

O RNA foi extraído de aproximadamente 30mg de músculo esquelético usando reagente Trizol (Invitrogen, CA, EUA). A quantidade de RNA foi determinada usando espectroscopia Nanovue (GE Life Sciences), e 1mg de RNA foi tratado com DNase I (Invitrogen, CA, EUA). A síntese da primeira cadeia de cDNA foi realizada usando Oligo (dT) primers para mRNA e Superscript III transcriptase-reversa (Invitrogen, CA, EUA). O PCR em tempo real foi realizado utilizando o termociclador Biorad CFX96 e mix SYBR Green (Invitrogen, CA, EUA). Os *primers* foram gerados utilizando o software online Primer3, e estão indicados na Tabela 2. O controle endógeno  $\beta$ -actina foi utilizado para corrigir a expressão dos genes-alvo. A eficiência da corrida dos genes-alvo e dos genes endógenos foram aproximadamente iguais, sendo calculada através de diluições em série do cDNA. As reações de PCR foram realizadas depois de um programa de desnaturação e ativação da polimerase (4min a 95°C), foram realizados 44 ciclos e cada ciclo consistindo em 95°C durante 10s e 60°C durante 15s, seguidos por uma curva de *melting* (60 a 95°C, com taxa de aquecimento de 0,1°C/s). Os controles negativos consistiram de poços em que cDNA foi substituído por água deionizada. A razão de expressão relativa (QR) de RNAm foi calculada pela equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , em que  $\Delta Ct$  expressa a diferença entre o número de ciclos (TC) dos genes-alvo e da média dos controles endógenos.



Tabela 2 - RT-qPCR *primers* e respectivas sequências.

Nome	5-3'	Primers
MnSOD	FW	GGTCTCCAACATGCCTCTCT
MnSOD	RV	AACCATCCACTTCGAGCAGA
GPx1	FW	TCTGCAGATCGTTCATCTCG
GPx1	RV	GTCCACCGTGTATGCCTTCT
CAT	FW	CAAGTTTTTGGATGCCCTGGGT
CAT	RV	ACATGGTCTGGGACTTCTGG
GR	FW	CAGCATAGACGCCTTTGACA
GR	RV	CACGACCATGATTCCAGATG
Beta-actin	FW	CTCCGGCATGTGCAA
Beta-actin	RV	CCCACCATCACACCCT

Legenda: Magnésio Superóxido Dismutase (MnSOD); Glutadiona peroxidase (GPx1); Catalase (CAT); Glutadiona redutase (GR); Sequência *forward* 5'-3' (FW); Sequência *reverse* 5'-3' (RV).

Fonte: O Autor, 2014.

### 3.9 Análise estatística

Os dados obtidos foram apresentados em forma de média e erro padrão da média (EPM). A diferença estatística entre os grupos foi avaliada por análise de variância de uma entrada (ANOVA) de um fator (*one-way*), seguida pelo pós-teste de Holm Sidak. Em todos os casos, o valor de *P* menor ou igual a 0,05 foi aceito como estatisticamente significativo.

As análises e o preparo dos gráficos foram realizados no programa de análise estatística *GraphPad Prism* versão 6.05 para Windows, *GraphPad Inc.* CA, EUA). A análise estatística também foi realizada por ANOVA de três fatores (*three-way*) (2 x 2 x 2, fatorial) analisando as interações entre os efeitos (ooforectomia, dieta e treinamento) (Statística, versão 10; StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Massa do Útero

A confirmação do sucesso da supressão de estrogênio endógeno induzido pela ooforectomia foi feita comparando-se a massa do útero entre os grupos SHAM (618.8 g  $\pm$  44.9g) e OVX (166.8 g  $\pm$  14.6 g) que mostraram uma redução significativa de 270% ( $P < 0.0001$ ).

### 4.2 Massa Corporal

#### 4.2.1 Antes do HIIT

Na fig. 1, observa-se a evolução da MC nos grupos. Até a semana 14, os animais foram mantidos com dietas e sem treinamento (quatro grupos). O HIIT começou na semana 13 e descobriu-se os seus efeitos desde a semana 14. No período anterior ao HIIT, os grupos eram diferentes em relação às dietas e à ooforectomia. O grupo OVX-HF-NT apresentou maior evolução MC que o grupo OVX-SC-NT (+18% na semana 12,  $P < 0,0001$ ). Os dois grupos ooforectomizados mostraram maior evolução da MC do que os grupos SHAM. Na semana 12 a MC apresentou-se: OVX-SC-NT vs. SHAM-SC-NT (+14%;  $P = 0,007$ ) e OVX-HF-NT vs. SHAM-HF-NT (+28%;  $P < 0,0001$ ).

#### 4.2.2 Depois do HIIT

O início do HIIT produziu uma grande mudança na tendência da evolução da MC nos animais. Quase que instantaneamente (na semana após o início da HIIT)

todos os grupos treinados apresentaram uma tendência decrescente da MC em relação a contrapartes não treinados. Vale ressaltar que a MC do grupo OVX-SC-T rapidamente tornou-se igual aos grupos SHAM-SC-NT e SHAM-SC-T. Ao mesmo tempo, os grupos NT continuaram com uma tendência crescente na MC.

Importante salientar que o HIIT durou apenas oito semanas (35% da duração do experimento). A observação da figura 1 permite imaginar que a continuação de HIIT causaria uma redução maior na MC, e reconhece que esta é uma grande vantagem para o sobrepeso ou obesidade, reduzindo fortemente o risco de doença cardiovascular e metabólica.

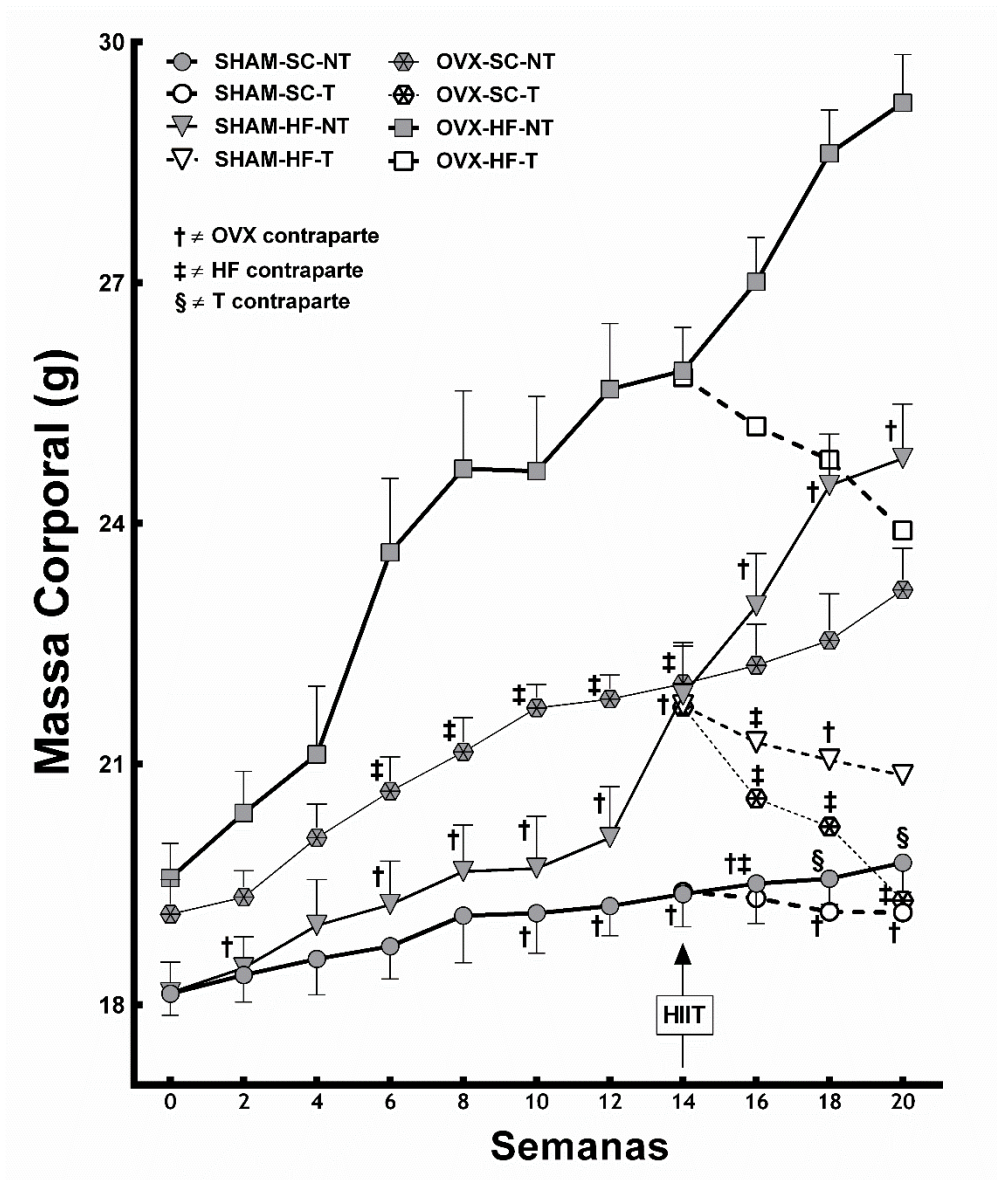
O *three-way* ANOVA demonstrou que a ooforectomia, a dieta hiperlipídica e o HIIT influenciaram os resultados do estudo ( $P < 0,0001$ ). A análise observou-se uma interação significativa entre OVX vs. dieta ( $P = 0,01$ ), OVX vs. HIIT ( $P = 0,003$ ), e dieta vs. HIIT ( $P = 0,002$ ), mas não considerando as três variáveis em conjunto.

#### 4.3 Ingestão alimentar e ingestão de energia

As diferenças na ingestão em gramatura não foram significativas entre os grupos. No entanto, os grupos alimentados com uma dieta hiperlipídica mostraram um aumento no consumo de energia independentemente OVX e / ou HIIT (Tabela 3).

O consumo de energia foi mais elevado no grupo SHAM-HF-NT comparado ao grupo SHAM-SC-NT (26%,  $P = 0,004$ ), mais elevada no grupo SHAM-HF-T do que no grupo SHAM-SC-T (28%,  $P = 0,002$ ); maior no grupo OVX-HF-NT que no grupo OVX-SC-NT (36%,  $P < 0,0001$ ), e maior no grupo OVX-HF-T do que o grupo OVX-SC-T (32%,  $P < 0,0001$ ).

Figura 1 - Massa corporal (média e erro padrão da média).



Nota: Diferenças significativas estão indicadas com símbolos diferentes (ANOVA one-way e o pós-teste de Holm-Sidak).

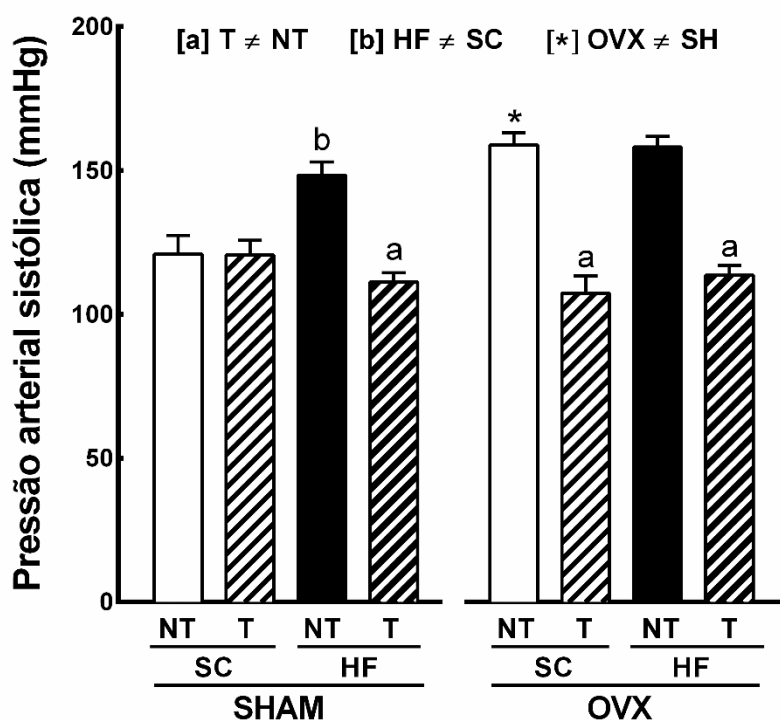
Legenda: SHAM, procedimento simulado; OVX, ooforectomia; SC, dieta padrão; HF, dieta hiperlipídica; T, treinados; NT, não-treinados.

Fonte: O Autor, 2014.

#### 4.4 Pressão arterial

Após 21 semanas do experimento, os animais que sofreram ooforectomia e / ou receberam a dieta hiperlipídica apresentaram um aumento na pressão arterial em comparação com o grupo controle SH-SC-NT (o grupo SH-HF-NT mostrou um aumento 23%,  $P=0,001$ ; o grupo OVX-SC-NT revelou um aumento de 31%,  $P<0,0001$ ; e o grupo OVX-HF-NT apresentou um aumento de 31%,  $P<0,0001$ ). Os grupos que receberam o treinamento atingiram uma redução da pressão arterial, igualando o grupo controle (Figura 2). A análise do *three-way* ANOVA mostrou o efeito dos três fatores do estudo: ooforectomia ( $P<0,0001$ ), dieta ( $P=0,01$ ) e HIIT ( $P<0,0001$ ). Quando o item foi a interação entre os fatores, o HIIT influenciou tanto a ooforectomia ( $P<0,0001$ ) quanto a dieta ( $P=0,004$ ), e não houve nenhuma relação entre a cirurgia e a dieta. Também há interação entre os três fatores juntos

Figura 2 – Pressão arterial (média e erro padrão da média).



Nota: Diferenças significativas estão indicadas com símbolos diferentes (ANOVA one-way e o pós-teste de Holm-Sidak).

Legenda: SHAM, procedimento simulado; OVX, ooforectomia; SC, dieta padrão; HF, dieta hiperlipídica; T, treinados; NT, não-treinados. Símbolos: [a] diferente da contraparte não-treinado; [b] diferente da contraparte SC; [\*] diferente da contraparte SHAM.

Fonte: O Autor, 2014.

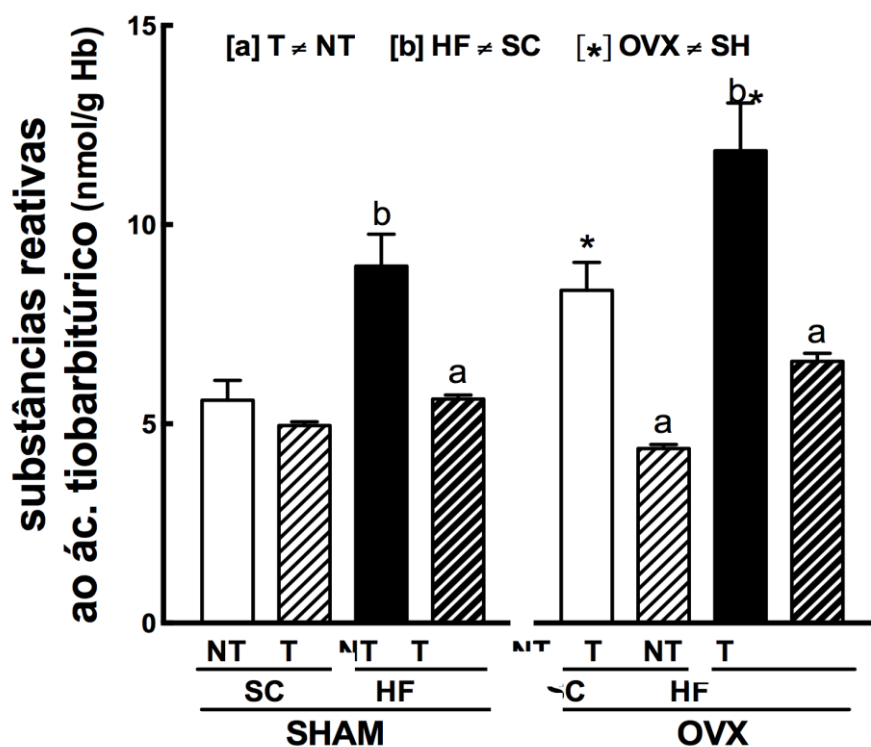
#### 4.5 Bioquímica do plasma e estresse oxidativo nos eritrócitos

A Tabela 3 apresenta os resultados. O colesterol total foi maior: no grupo SHAM-HF-NT comparado ao grupo SHAM-SC-NT (22%,  $P=0,005$ ), OVX-HF-NT comparado ao OVX-SC-NT (21%,  $P=0,0001$ ), SHAM-HF-T comparado ao grupo SHAM-SC-T (22%,  $P=0,04$ ), OVX-HF-T em comparação com OVX-SC-T (24%,  $P=0,01$ ), OVX-SC-NT em comparação com SHAM-SC-NT (18%,  $P=0,02$ ), OVX-HF-NT comparado ao grupo SHAM-HF-NT (21%,  $P=0,0008$ ). Além disso, o HIIT diminuiu o colesterol total em todos os grupos treinados. O colesterol total foi menor nos grupos SHAM-SC-T comparado ao grupo SHAM-SC-NT (-23%,  $P=0,004$ ), SHAM-HF-T comparado ao grupo SHAM-HF-NT (-23%,  $P=0,0003$ ), OVX-SC-T em comparação com OVX-SC-NT (-32%,  $P<0,0001$ ) e OVX-HF-T em comparação com OVX-HF-NT (-32%,  $P<0,0001$ ).

O three-way ANOVA mostrou que os três fatores OVX, dieta e HIIT são relevantes nos níveis de colesterol total ( $P<0,0001$ ). Houve interação entre OVX vs. HIIT ( $P=0,004$ ), mas não entre os três fatores juntos. Os níveis de triglicerídeos não foram significativamente diferentes entre os grupos.

Como mostrado na fig. 3, os níveis de TBARS foram maiores nos grupos SHAM-HF-NT comparado ao grupo SHAM-SC-NT (60%,  $P=0,007$ ), OVX-HF-NT comparado ao OVX-SC-NT (42%,  $P=0,005$ ), OVX-SC-NT comparado ao grupo SHAM-SC-NT (49%,  $P=0,04$ ) e OVX-HF-NT comparado ao grupo SHAM-HF-NT (32%,  $P<0,0001$ ). Os níveis de TBARS foram menores nos grupos SHAM-HF-T comparado ao grupo SHAM-HF-NT (-37%,  $P=0,008$ ), OVX-SC-T em relação ao grupo OVX-SC-NT (-48%,  $P=0,001$ ), OVX-HF-T em comparação com OVX-HF NT (-45%,  $P<0,0001$ ). O *three-way* ANOVA sinalizou que a OVX, dieta e HIIT tiveram influência sobre os níveis de TBARS ( $P<0,0001$ ). Houve interação entre HIIT vs. OVX ( $P=0,003$ ) e HIIT vs. dieta ( $P=0,02$ ), mas não entre OVX vs. dieta. Não houve interação entre os três fatores juntos.

Figura 3 – Ácido tiobarbitúrico (média e erro padrão da média).



Nota: Diferenças significativas estão indicadas com símbolos diferentes (ANOVA one-way e o pós-teste de Holm-Sidak).

Legenda: SHAM, procedimento simulado; OVX, ooforectomia; SC, dieta padrão; HF, dieta hiperlipídica; T, treinados; NT, não-treinados. Símbolos: [a] diferente da contraparte não-treinado; [b] diferente da contraparte SC; [\*] diferente da contraparte SHAM.

Fonte: O Autor, 2014.

## 4.6 Western Blot (músculo esquelético)

### 4.6.1 SOD

Observou-se menor conteúdo proteico da enzima SOD muscular comparando o grupo SHAM-HF-NT com o grupo SHAM-SC-NT (-51%,  $P < 0,0001$ ), e comparando o grupo OVX-HF-NT com OVX-SC-NT (-67%,  $P = 0,02$ ). O conteúdo proteico da enzima SOD foi diminuída nos grupos OVX-SC-NT comparado ao grupo SHAM-SC-NT (-52%,  $P < 0,0001$ ), OVX-HF-NT comparado ao grupo SHAM-HF-NT (-67%,  $P = 0,01$ ), OVX-SC-T em relação ao SHAM-SC-T (-26%.  $P = 0,04$ ). Além disso,

observou-se maior conteúdo proteico da enzima SOD nos grupos SHAM-HF-T comparado ao grupo SHAM-HF-NT (76%,  $P=0,04$ ), OVX-SC-T em comparação com OVX-SC-NT (63%,  $P=0,03$ ), OVX-HF-T em comparação com OVX-HF-NT (+336%,  $P<0,0001$ ).

O *three-way* ANOVA sinalizou que a OVX, HF e HIIT tiveram influência sobre o conteúdo proteico da enzima SOD ( $P<0,0001$ ). Houve interação entre HIIT vs. OVX ( $P= 0,04$ ) e HIIT vs. HF ( $P= 0,006$ ), mas não entre OVX vs. HF. Não houve interação entre os três fatores juntos (Fig. 4A).

#### 4.6.2 GPX and GR

GPx e GR são parte do ciclo redox da glutadiona, com resultados semelhantes. Observou-se maior nível de proteína das enzimas nos grupos OVX-SC-T em comparação com OVX-SC-NT (GPx 182%,  $P= 0,02$ ; GR 122%,  $P= 0,02$ ), OVX-HF-T em comparação com OVX-HF-NT (GPx 250%,  $P= 0,03$ ; GR 188%,  $P= 0,04$ ). Observou-se menor nível de proteína das enzimas nos grupos OVX-SC-NT comparado ao grupo SHAM-SC-NT (GPx -70%,  $P= 0,001$ ; GR -65%,  $P= 0,0002$ ), OVX-HF-NT em comparação com SHAM-HF-NT (GPx -70%,  $P= 0,04$ ; GR -68,  $P= 0,02$ ) (Figuras 4B e C).

O *three-way* ANOVA sinalizou que OVX, HF e HIIT tiveram influência sobre os conteúdos proteicos da enzima: OVX (GPx,  $P<0,0001$ ; GR,  $P<0,0001$ ), HF (GPx,  $P= 0,02$ ; GR,  $P= 0,001$ ) e HIIT (GPx,  $P<0,0001$ ; GR,  $P<0,0001$ ). Houve interação entre OVX vs. HIIT (GPx,  $P= 0,003$ ; GR,  $P= 0,02$ ), mas não entre OVX vs. HF, e HIIT vs. HF. Não houve interação entre os três fatores juntos.

#### 4.6.3 Catalase

O conteúdo proteico da enzima catalase foi menor: nos grupos OVX-HF-NT comparado ao OVX-SC-NT (-82%,  $P<0,02$ ), OVX-HF-NT comparado ao SHAM-HF-



NT (-83%,  $P<0,01$ ). Observou-se maior conteúdo proteico da enzima catalase nos grupos OVX-HF-T vs. OVX-HF-NT (431%,  $P<0,03$ ) (Fig. 4D).

O three-way ANOVA sinalizou que a OVX, HF tiveram influência sobre o conteúdo proteico da enzima catalase, mas não HIIT. Houve interação entre HF vs. HIIT ( $P=0,005$ ) e não foi observada interação levando os três fatores juntos.

#### 4.7 RT-qPCR (músculo esquelético)

##### 4.7.1 SOD

Observou-se redução na expressão de mRNA SOD nos grupos SHAM-HF-NT comparado ao grupo SHAM-SC-NT (-45%,  $P=0,0009$ ), OVX-HF-NT comparado ao OVX-SC-NT (-100%,  $P=0,004$ ), OVX-SC-NT comparado ao grupo SHAM-SC-NT (-60%,  $P<0,0001$ ), OVX-HF-NT comparado ao grupo SHAM-HF-NT (-100%,  $P<0,0001$ ), OVX-SC-T comparado ao grupo SHAM-SC-T (-40%,  $P=0,0009$ ). Além disso, observou-se aumento na expressão de mRNA SOD nos grupos SHAM-HF-T comparado ao grupo SHAM-HF-NT (70%,  $P=0,006$ ), OVX-SC-T em comparação com OVX-SC-NT (80%,  $P=0,02$ ), e OVX-HF-T em comparação com OVX-HF-NT (65%,  $P<0,0001$ ).

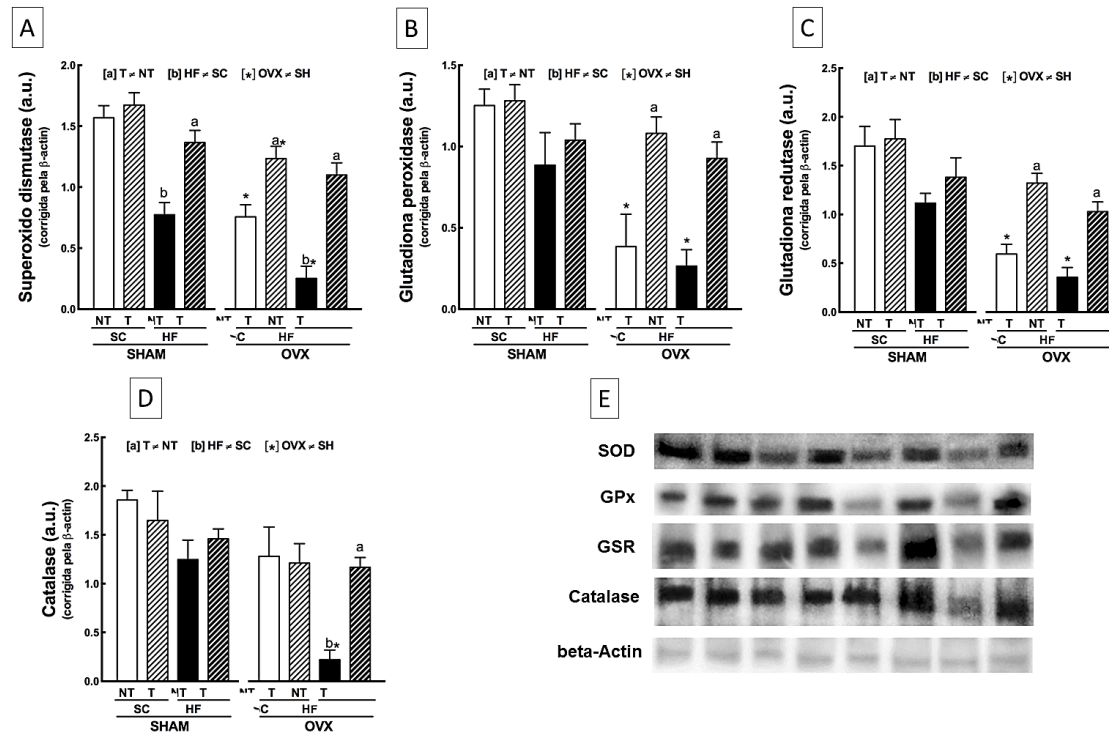
##### 4.7.2 GPX and GR

A expressão de mRNA de ambos GPx e GR foi maior nos grupos OVX-SC-T em comparação com OVX-SC-NT (GPx 1170%,  $P<0,0001$ ; GR 1165%,  $P<0,0001$ ), OVX-HF-T comparado ao OVX-HF-NT (GPx 890%,  $P<0,0001$ ; GR 885%,  $P<0,0001$ ). Observou-se que a expressão de mRNA de ambos GPx e GR foi diminuída nos grupos SHAM-SC-T comparado ao grupo SHAM-SC-NT (GPx -90%,  $P<0,0001$ ; GR -90%,  $P<0,0001$ ), OVX-HF-NT comparado ao grupo SHAM-HF-NT (GPx e GR -90%,  $P<0,0001$ ) (Fig. 4B e C).

### 4.7.3 Catalase

A expressão de mRNA catalase foi diminuída nos grupos OVX-HF-NT comparado ao grupo SHAM-HF-NT (-80%,  $P<0,007$ ), OVX-HF-NT em comparação com OVX-SC-NT (-80%,  $P<0,005$ ). Enquanto isso, a expressão da catalase mRNA foi maior em animais do grupo OVX-HF-T em relação ao OVX-HF-NT (+430%,  $P<0,02$ ) (Fig. 4D).

Figura 4 – A expressão relativa da proteína da superóxido dismutase, da glutadiona peroxidase, da glutadiona redutase e da catalase no músculo esquelético (média e erro padrão da média).

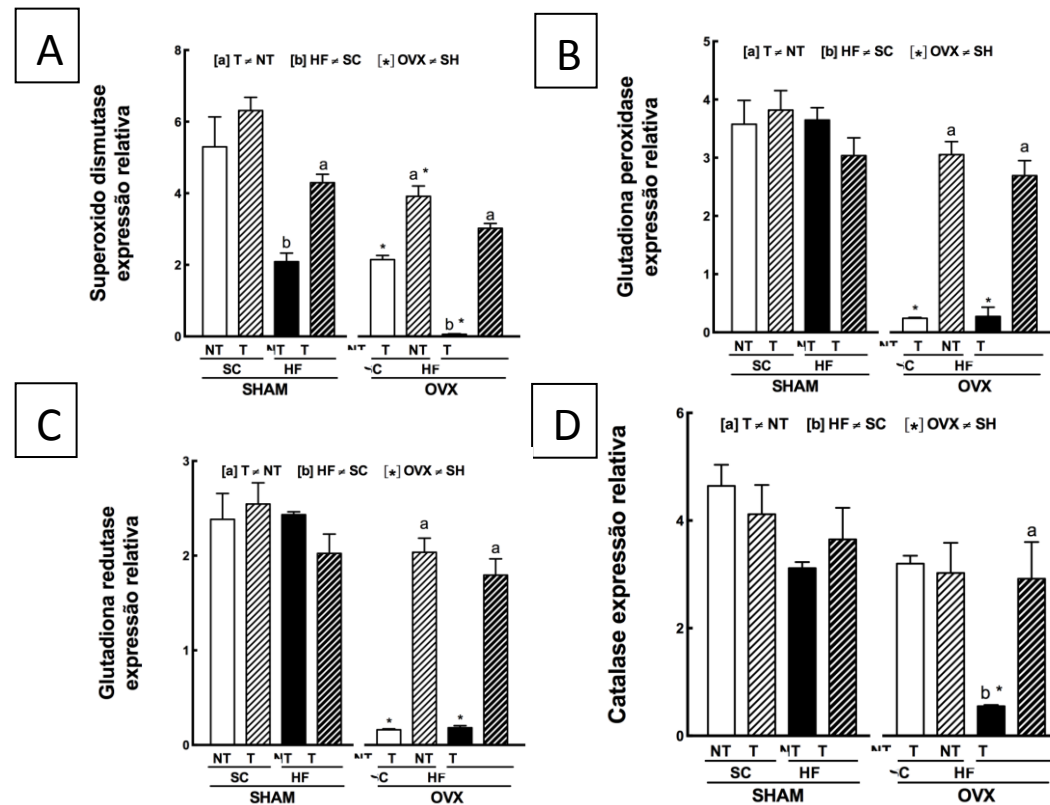


Nota: Um controle endógeno (beta-actina) foi utilizado para normalizar a expressão das proteínas. Um controle endógeno (beta-actina) foi utilizado para normalizar a expressão das proteínas. Diferenças significativas estão indicadas com símbolos diferentes (ANOVA one-way e o pós-teste de Holm-Sidak).

Legenda: SHAM, procedimento simulado; OVX, ooforectomia; SC, dieta padrão; HF, dieta hiperlipídica; T, treinados; NT, não-treinados. Símbolos: [a] diferente da contraparte não-treinado; [b] diferente da contraparte SC; [\*] diferente da contraparte SHAM. (A) Expressão relativa da superóxido dismutase; (B) Expressão relativa da glutadiona peroxidase; (C) Expressão relativa da glutadiona redutase; (D) Expressão relativa da Catalase; (E) bandas representativas correspondentes aos grupos (expressa em unidades arbitrárias).

Fonte: O Autor, 2014.

Figura 5 – A expressão relativa de RNAm da superóxido dismutase, da glutadiona peroxidase, da glutadiona redutase e da catalase no músculo esquelético (média e erro padrão da média).



Nota: Um controle endógeno (beta-actina) foi utilizado para normalizar a expressão das proteínas. Um controle endógeno (beta-actina) foi utilizado para normalizar a expressão das proteínas. Diferenças significativas estão indicadas com símbolos diferentes (ANOVA one-way e o pós-teste de Holm-Sidak).

Legenda: SHAM, procedimento simulado; OVX, ooforectomia; SC, dieta padrão; HF, dieta hiperlipídica; T, treinados; NT, não-treinados. Símbolos: [a] diferente da contraparte não-treinado; [b] diferente da contraparte SC; [\*] diferente da contraparte SHAM. (A) Expressão relativa da superóxido dismutase; (B) Expressão relativa da glutadiona peroxidase; (C) Expressão relativa da glutadiona redutase; (D) Expressão relativa da Catalase; (E) bandas representativas correspondentes aos grupos (expressa em unidades arbitrárias).

Fonte: O Autor, 2014.

Tabela 3 – Consumo alimentar e consumo energético; Colesterol total e triglicerídeo no plasma sanguíneo (média e erro padrão da média).

Dados	Grupos							
	SHAM				OVX			
	SC-NT	SC-T	HF-NT	HF-T	SC-NT	SC-T	HF-NT	HF-T
Consumo alimentar, g/dia/animal	1.9±0.08	1.9±0.12	1.8±0.05	1.9±0.07	2.0±0.05	2.1±0.06	2.1±0.11	2.1±0.08
Consumo energético, kJ/dia/animal	30.5±1.3	30.1±2.1	38.5±1.3 <sup>[b]</sup>	38.9±1.7 <sup>[b]</sup>	31.8±0.8	32.6±1.7	43.5±2.1 <sup>[b]</sup>	43.1±1.7 <sup>[b]</sup>
Colesterol total, mg/dL	101.9±3.1	78.7±4.2 <sup>[a]</sup>	124.3±4.3 <sup>[b]</sup>	95.7±3.6 <sup>[a][b]</sup>	120.5±6.7 <sup>[*]</sup>	82.4±1.7 <sup>[a]</sup>	150.8±1.5 <sup>[b][*]</sup>	102.3±4.3 <sup>[a][b]</sup>
Triglicerídeo, mg/dL	53.8±1.4	49.3±1.2	60.1±2.5	53.8±0.9	57.9±1.3	54.4±0.5	57.6±1.7	54.0±0.9

Nota: Diferenças significativas estão indicadas com símbolos diferentes (ANOVA one-way e o pós-teste de Holm-Sidak).

Legenda: SHAM, procedimento simulado; OVX, ooforectomia; SC, dieta padrão; HF, dieta hiperlipídica; T, treinados; NT, não-treinados. Símbolos: [a] diferente da contraparte não-treinado; [b] diferente da contraparte SC; [\*] diferente da contraparte SHAM.

Fonte: O Autor, 2014.

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou os efeitos benéficos do HIIT (natação) em camundongos fêmeas submetidas à dieta hiperlipídica e / ou ooforectomia. Vários efeitos benéficos foram observados incluindo a diminuição da massa corporal, da pressão arterial, dos níveis de colesterol total e a melhora da resposta do estresse oxidativo em camundongos obesos e / ou ooforectomizados, mas os camundongos não treinados nenhum dos efeitos benéficos. Este é um forte indicador de que o HIIT foi responsável pelos efeitos benéficos observados. Isso está de acordo com vários protocolos de treinamento demonstrando uma redução na MC e lipídios plasmáticos em animais castrados alimentados com uma dieta hiperlipídica e treinados de forma contínua em esteira (Zoth, Weigt et al. 2012) ou natação (Melton, Hegsted et al. 2000). Além disso, camundongos com obesidade induzida por dieta submetidos a treinamento de intensidade moderada e intensa demonstraram normalização da função ventricular e mecanoenergéticas (Hafstad, Lund et al. 2013).

É sabido o quanto é deletério uma dieta hiperlipídica a uma pessoa saudável (Aguila and Mandarim-De-Lacerda 2003; Adeghate, Christopher Howarth et al. 2006; Baumgarner, Setti et al. 2014); (Kang 2013); (Niehues, Gonzales et al. 2014). Nas mulheres, a obesidade induzida por uma dieta rica em gordura promove a resistência à insulina nos ovários e a hiperinsulinemia (Akamine, Marcal et al. 2010), o que pode ser a via de ligação da hiperinsulinemia com hiperandrogenismo ovariano e infertilidade devido a obesidade (Wu, Divall et al. 2014). Além disso, a ausência de estrogênios tem um efeito significativo sobre a obesidade em mulheres na pós-menopausa (Lizcano and Guzman 2014). Estudos experimentais consideram que a ooforectomia associada com a dieta hiperlipídica mimetiza a menopausa, e os resultados se assemelham com as alterações metabólicas observadas nas mulheres (Camporez, Jornayvaz et al. 2013; Faria Tda, Correia et al. 2013).

O declínio nos níveis de estrogênio observados nas mulheres pós-menopausa, e em animais ooforectomizados, elevam a pressão arterial (Reckelhoff and Fortepiani 2004). O estrogênio regula a produção da síntese do óxido nítrico (ON), cuja função é liberar o ON que age como um potente vasodilatador reduzindo a pressão arterial. Além disso, o estrogênio preserva a função endotelial, agindo como um antioxidante que reduz a peroxidação lipídica (Malone, Schuler et al.

2014). Além disso, a hipótese que sustenta a associação da obesidade com a hipertensão pode estar relacionada à disfunção do tecido adiposo, que gera citocinas inflamatórias que aumentam o perfil inflamatório (Catta-Preta, Martins et al. 2012).

No presente estudo, foi observado o aumento significativo da pressão arterial, especialmente em animais OVX que foram alimentados com dieta hiperlipídica. Estudos tem demonstrado que o treinamento contínuo pode ser responsável pela redução da pressão arterial em ratas OVX devido a redução do estresse oxidativo que está associado ao aumento da biodisponibilidade do ON (Irigoyen, Paulini et al. 2005). Em humanos obesos, o HIIT é responsável pela redução da pressão arterial (Tjonna, Lee et al. 2008). Portanto, é aceitável a hipótese de que o mesmo ocorre no presente estudo.

O estresse oxidativo é responsável pela fisiopatologia de numerosas doenças crônicas, incluindo arterosclerose, diabetes mellitus tipo 2, desordens neurodegenerativas e câncer (Green, Brand et al. 2004). Devido a redução da síntese de estrogênio, a menopausa é acompanhada pelo aumento do estresse oxidativo (Bittner 2009). Várias estratégias terapêuticas são usadas para reduzir os efeitos deletérios da obesidade e da menopausa, incluindo dieta de baixa caloria, fármacos e exercícios (Jimenez-Pavon, Sese et al. 2013).

A instalação do quadro de estresse oxidativo proveniente da dieta hiperlipídica pode causar a redução das enzimas antioxidantes e o aumento dos níveis de TBARS (Jayakumar, Pugalendi et al. 2014). O presente estudo demonstrou o aumento dos níveis de TBARS nos eritrócitos nos grupos que foram alimentados com dieta hiperlipídica, que sofreram a ooforectomia e na combinação desses dois insultos. Os animais revelaram o aumento da peroxidação lipídica sistêmica, e o grupo que sofreu os dois insultos apresentou um forte aumento na peroxidação lipídica.

O músculo esquelético é submetido a altos níveis de estresse oxidativo durante o exercício quando comparados a outros órgãos (fígado e coração, por exemplo), devido ao aumento da produção das espécies reativas de oxigênio. Portanto, os músculos necessitam de uma grande proteção antioxidante contra o potencial dano oxidativo que ocorre durante e logo após o exercício (Ji 1995). No presente estudo, foi observado baixa expressão proteica dos níveis das enzimas antioxidantes nos grupos alimentados com dieta hiperlipídica, ooforectomizados e na

associação desses. A dieta HF levou a baixa expressão proteica da SOD no grupo SHAM, ao qual foi mais baixa em comparação a associação da dieta HF e a ooforectomia. Esta redução da expressão proteica da SOD pode ser devido a SOD representar a primeira barreira contra o aumento da produção de radicais livres, sendo responsável por catalisar a conversão do radical superóxido ( $O_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Powers and Jackson 2008).

O ciclo redox da glutadiona (enzimas GPx e GR) tiveram baixa expressão proteica nos grupos com a ooforectomia e na associação da ooforectomia com a dieta HF. A GPx catalisa a reação entre um  $H_2O_2$  livre e o radical  $O_2^-$ . É a enzima antioxidante mais importante envolvida na remoção do  $H_2O_2$ , pois apresenta maior afinidade ao  $H_2O_2$  do que a enzima catalase, agindo em baixas concentrações desse peróxido (Powers and Jackson 2008). Similar a SOD, a GPx pode ser induzida no músculo esquelético, e é relatado para melhora nas fibras musculares esqueléticas que estão ativamente recrutadas durante o exercício regular (Hellsten, Apple et al. 1996). É importante ressaltar que a ação das enzimas antioxidantes no estresse oxidativo é variável, e depende diretamente do órgão analisado porque algumas enzimas apresentam diferentes resultados em diferentes órgãos (Noeman, Hamooda et al. 2011).

Estudos têm demonstrado que a ooforectomia é responsável pela geração do estresse oxidativo em diferentes órgãos pelo aumento da peroxidação lipídica e a redução das enzimas antioxidantes (Muthusami, Ramachandran et al. 2005; Kaur, Mishra et al. 2007; Evsen, Ozler et al. 2013). Isso ocorre devido a redução do estrogênio, que gera um aumento no estresse oxidativo sendo dependente da estrutura química e da concentração do estrogênio. Especialmente, em altas concentrações, o estrogênio tende a ter um efeito antioxidante benéfico pela inibição do 8-hidroxilação das bases de guanina no DNA. Entretanto, em baixas concentrações, o estrogênio tem efeito pró-oxidante, particularmente quando sua estrutura química contém um catecol. Esses efeitos incluem quebra no material genético, na formação de DNA, e na oxidação de bases (Wang, Chandrasena et al. 2010). Adicionalmente, há um aumento das concentrações séricas das citocinas inflamatórias e fatores pró-oxidantes devido a menopausa, sugerindo, novamente, o estresse oxidativo (Signorelli, Neri et al. 2006; McLean 2009).

O HIIT melhorou a condição do estresse oxidativo que foi desenvolvido devido a OVX e a dieta HF. Assim, essa melhora foi caracterizada pela redução dos níveis



de TBARS, aumento dos níveis das expressões proteicas das enzimas antioxidantes no músculo e, por consequente, aumento da expressão de mRNA das enzimas antioxidantes nos animais treinados. A melhor estratégia para se aumentar os níveis endógenos de antioxidantes pode realmente ser a exposição fisiológica de impulsos transientes do próprio estresse oxidativo (Finkel and Holbrook 2000). O HIIT tem como efeito agudo o aumento do estresse oxidativo, mas apresenta como efeito crônico a adaptação do sistema a esse estímulo (Bogdanis, Stavrinou et al. 2013). Embora alguns estudos têm confirmado a melhora do perfil oxidante com o treinamento (Irigoyen, Paulini et al. 2005; Karolkiewicz, Michalak et al. 2009), outros estudos têm encontrado pouca contribuição do treinamento na melhora do perfil oxidativo (Macedo, Martins et al. 2013; Al-Nakkash, Janjulia et al. 2014). No presente estudo, o HIIT alterou positivamente a expressão proteica e gênica de várias enzimas antioxidantes, que está de acordo com a literatura (Mahoney, Parise et al. 2005; Domingos, Rodrigues et al. 2012).

## CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a obesidade resultante do consumo da dieta hiperlipídica maximiza os efeitos deletérios da menopausa cirúrgica, cuja é usada a fim de mimetizar a menopausa em modelos experimentais. Entre os diversos efeitos deletérios o estresse oxidativo, que é o desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade de oxidação do organismo, foi o melhor demonstrado no presente estudo.

O estresse oxidativo foi confirmado pela redução do conteúdo proteico e da expressão gênica das enzimas antioxidantes no músculo gastrocnêmico, juntamente com o aumento das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico nos eritrócitos, demonstrando aumento da peroxidação lipídica. Sabe-se que o estresse oxidativo é responsável por várias doenças como, câncer, diabetes tipo 2, hipertensão, doenças cardiovasculares entre outros.

Como terapia para esses efeitos deletérios, os autores do estudo utilizam o treinamento intervalado de alta intensidade (natação) devido a uma menor duração de sessão de treinamento e menor número de sessões semanais, quando comparado com o treinamento contínuo de baixo ou moderada intensidade. Após 7 semanas o treinamento apresentou efeitos benéficos tais como a redução do estresse oxidativo, da obesidade através da redução da massa corporal, além da melhora da pressão arterial.

Uma vez que a principal causa do sedentarismo é a falta de tempo para as pessoas se exercitarem, o treinamento intervalado de alta intensidade apresenta-se como um sistema de treinamento alternativo e viável por que não necessita de uma sessão de treinamento com duração longa, entretanto possui efeitos benéficos na melhoria da saúde e qualidade de vida da sociedade. Um recente estudo demonstrou que é possível a aplicação desse sistema de treinamento em mulheres pós-menopausa com efeitos benéficos nos parâmetros avaliados (Klonizakis, Moss et al. 2014)

## REFERÊNCIAS

- Adeghate, E., F. Christopher Howarth, et al. (2006). "The effect of a fat-enriched diet on the pattern of distribution of pancreatic islet cells in the C57BL/6J mice." Ann N Y Acad Sci **1084**: 361-70.
- Aguila, M. B. and C. A. Mandarim-De-Lacerda (2003). "Effects of chronic high fat diets on renal function and cortical structure in rats." Exp Toxicol Pathol **55**(2-3): 187-95.
- Akamine, E. H., A. C. Marcal, et al. (2010). "Obesity induced by high-fat diet promotes insulin resistance in the ovary." J Endocrinol **206**(1): 65-74.
- Al-Nakkash, L., T. Janjulia, et al. (2014). "Genistein and exercise do not improve cardiovascular risk factors in the ovariectomized rat." Climacteric **17**(2): 136-47.
- Barry, S. M., H. Mueller-Bunz, et al. (2012). "Investigating the oxidation of alkenes by non-heme iron enzyme mimics." Org Biomol Chem **10**(36): 7372-81.
- Bastard, J. P., M. Maachi, et al. (2002). "Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro." J Clin Endocrinol Metab **87**(5): 2084-9.
- Baumgarner, K. M., S. Setti, et al. (2014). "Diet-induced obesity attenuates cytokine production following an immune challenge." Behav Brain Res **267**: 33-41.
- Bedard, K. and K. H. Krause (2007). "The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology." Physiol Rev **87**(1): 245-313.
- Belchetz, P. E. (1994). "Hormonal treatment of postmenopausal women." N Engl J Med **330**(15): 1062-71.
- Bittner, V. (2005). "Perspectives on dyslipidemia and coronary heart disease in women." J Am Coll Cardiol **46**(9): 1628-35.
- Bittner, V. (2009). "Menopause, age, and cardiovascular risk: a complex relationship." J Am Coll Cardiol **54**(25): 2374-5.
- Bogdanis, G. C., P. Stavrinou, et al. (2013). "Short-term high-intensity interval exercise training attenuates oxidative stress responses and improves antioxidant status in healthy humans." Food Chem Toxicol **61**: 171-7.
- Butera, P. C. (2010). "Estradiol and the control of food intake." Physiol Behav **99**(2): 175-80.
- Camporez, J. P., F. R. Jornayvaz, et al. (2013). "Cellular mechanism by which estradiol protects female ovariectomized mice from high-fat diet-induced hepatic and muscle insulin resistance." Endocrinology **154**(3): 1021-8.

- Carr, M. C. (2003). "The emergence of the metabolic syndrome with menopause." J Clin Endocrinol Metab **88**(6): 2404-11.
- Casimiro-Lopes, G., S. B. Alves, et al. (2008). "Maximum acute exercise tolerance in hyperthyroid and hypothyroid rats subjected to forced swimming." Horm Metab Res **40**(4): 276-80.
- Catta-Preta, M., M. A. Martins, et al. (2012). "Modulation of cytokines, resistin, and distribution of adipose tissue in C57BL/6 mice by different high-fat diets." Nutrition **28**(2): 212-9.
- Chang, S. H., T. S. Beason, et al. (2012). "A systematic review of body fat distribution and mortality in older people." Maturitas **72**(3): 175-91.
- Diaz Brinton, R. (2012). "Minireview: translational animal models of human menopause: challenges and emerging opportunities." Endocrinology **153**(8): 3571-8.
- Domingos, M. M., M. F. Rodrigues, et al. (2012). "Resistance training restores the gene expression of molecules related to fat oxidation and lipogenesis in the liver of ovariectomized rats." Eur J Appl Physiol **112**(4): 1437-44.
- Draper, H. H., E. J. Squires, et al. (1993). "A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials." Free Radic Biol Med **15**(4): 353-63.
- Espiritu, D. J. and T. Mazzone (2008). "Oxidative stress regulates adipocyte apolipoprotein e and suppresses its expression in obesity." Diabetes **57**(11): 2992-8.
- Evsen, M. S., A. Ozler, et al. (2013). "Effects of estrogen, estrogen/progesterone combination and genistein treatments on oxidant/antioxidant status in the brain of ovariectomized rats." Eur Rev Med Pharmacol Sci **17**(14): 1869-73.
- Faria Tda, S., A. L. Correia, Jr., et al. (2013). "Adverse association between obesity and menopause in mice treated with bezafibrate, a pan peroxisome proliferator-activated receptor agonist." Menopause **20**(12): 1264-74.
- Finkel, T. and N. J. Holbrook (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." Nature **408**(6809): 239-47.
- Fraulob, J. C., R. Ogg-Diamantino, et al. (2010). "A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet." J Clin Biochem Nutr **46**(3): 212-23.
- Gibala, M. J., J. P. Little, et al. (2012). "Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease." J Physiol **590**(Pt 5): 1077-84.
- Green, K., M. D. Brand, et al. (2004). "Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes." Diabetes **53** Suppl 1: S110-8.
- Gurevich-Panigrahi, T., S. Panigrahi, et al. (2009). "Obesity: pathophysiology and clinical management." Curr Med Chem **16**(4): 506-21.

- Hafstad, A. D., J. Lund, et al. (2013). "High- and moderate-intensity training normalizes ventricular function and mechanoenergetics in mice with diet-induced obesity." Diabetes **62**(7): 2287-94.
- Halliwell, B. and M. Whiteman (2004). "Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?" Br J Pharmacol **142**(2): 231-55.
- Heeren, M. V., L. E. De Sousa, et al. (2009). "Exercise improves cardiovascular control in a model of dislipidemia and menopause." Maturitas **62**(2): 200-4.
- Hellsten, Y., F. S. Apple, et al. (1996). "Effect of sprint cycle training on activities of antioxidant enzymes in human skeletal muscle." J Appl Physiol (1985) **81**(4): 1484-7.
- Higashi, Y., M. Sanada, et al. (2001). "Effect of estrogen replacement therapy on endothelial function in peripheral resistance arteries in normotensive and hypertensive postmenopausal women." Hypertension **37**(2 Pt 2): 651-7.
- Hu, F. B., J. E. Manson, et al. (2001). "Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women." N Engl J Med **345**(11): 790-7.
- Huang, D., B. Ou, et al. (2005). "The chemistry behind antioxidant capacity assays." J Agric Food Chem **53**(6): 1841-56.
- Irigoyen, M. C., J. Paulini, et al. (2005). "Exercise training improves baroreflex sensitivity associated with oxidative stress reduction in ovariectomized rats." Hypertension **46**(4): 998-1003.
- Jayakumar, P., K. V. Pugalendi, et al. (2014). "Attenuation of hyperglycemia-mediated oxidative stress by indole-3-carbinol and its metabolite 3, 3'-diindolylmethane in C57BL/6J mice." J Physiol Biochem **70**(2): 525-34.
- Jeong, S. and M. Yoon (2012). "Swimming's prevention of ovariectomy-induced obesity through activation of skeletal-muscle PPARalpha." Int J Sport Nutr Exerc Metab **22**(1): 1-10.
- Ji, L. L. (1995). "Exercise and oxidative stress: role of the cellular antioxidant systems." Exerc Sport Sci Rev **23**: 135-66.
- Jimenez-Pavon, D., M. A. Sese, et al. (2013). "Dietary and lifestyle quality indices with/without physical activity and markers of insulin resistance in European adolescents: the HELENA study." Br J Nutr **110**(10): 1919-25.
- Juan, Y. S., S. M. Chuang, et al. (2012). "Green tea catechins decrease oxidative stress in surgical menopause-induced overactive bladder in a rat model." BJU Int **110**(6 Pt B): E236-44.
- Kang, Y. S. (2013). "Obesity associated hypertension: new insights into mechanism." Electrolyte Blood Press **11**(2): 46-52.

- Karolkiewicz, J., E. Michalak, et al. (2009). "Response of oxidative stress markers and antioxidant parameters to an 8-week aerobic physical activity program in healthy, postmenopausal women." Arch Gerontol Geriatr **49**(1): e67-71.
- Kastorini, C. M. and D. B. Panagiotakos (2012). "The obesity paradox: methodological considerations based on epidemiological and clinical evidence--new insights." Maturitas **72**(3): 220-4.
- Kaur, G., S. Mishra, et al. (2007). "Retention of ovaries and oxidative stress of surgery." Int J Gynaecol Obstet **97**(1): 40-3.
- Khalil, R. A. (2005). "Sex hormones as potential modulators of vascular function in hypertension." Hypertension **46**(2): 249-54.
- Klonizakis, M., J. Moss, et al. (2014). "Low-volume high-intensity interval training rapidly improves cardiopulmonary function in postmenopausal women." Menopause **21**(10): 1099-105.
- Lizcano, F. and G. Guzman (2014). "Estrogen Deficiency and the Origin of Obesity during Menopause." Biomed Res Int **2014**: 757461.
- Ludgero-Correia, A., Jr., M. B. Aguila, et al. (2012). "Effects of high-fat diet on plasma lipids, adiposity, and inflammatory markers in ovariectomized C57BL/6 mice." Nutrition **28**(3): 316-23.
- Macedo, U. B., R. R. Martins, et al. (2013). "Oophorectomy hinders antioxidant adaptation promoted by swimming in Wistar rats." Appl Physiol Nutr Metab **38**(2): 148-53.
- Mahoney, D. J., G. Parise, et al. (2005). "Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise." FASEB J **19**(11): 1498-500.
- Malone, L., C. Schuler, et al. (2014). "Effect of estrogen and ovariectomy on response of the female rabbit urinary bladder to two forms of in vitro oxidative stress." Int Urogynecol J **25**(6): 791-8.
- Manson, J. E., P. J. Skerrett, et al. (2004). "The escalating pandemics of obesity and sedentary lifestyle. A call to action for clinicians." Arch Intern Med **164**(3): 249-58.
- Mayne, S. T. (2003). "Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research." J Nutr **133 Suppl 3**: 933S-940S.
- McLean, R. R. (2009). "Proinflammatory cytokines and osteoporosis." Curr Osteoporos Rep **7**(4): 134-9.
- Melton, S. A., M. Hegsted, et al. (2000). "Swimming eliminates the weight gain and abdominal fat associated with ovariectomy in the retired breeder rat despite high-fat diet selection." Appetite **35**(1): 1-7.

- Miquel, J., A. Ramirez-Bosca, et al. (2006). "Menopause: a review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants." Arch Gerontol Geriatr **42**(3): 289-306.
- Moholdt, T., E. Madssen, et al. (2013). "The higher the better? Interval training intensity in coronary heart disease." J Sci Med Sport.
- Muthusami, S., I. Ramachandran, et al. (2005). "Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats." Clin Chim Acta **360**(1-2): 81-6.
- Ng, M., T. Fleming, et al. (2014). "Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013." Lancet **384**(9945): 766-81.
- Niehues, J. R., A. I. Gonzales, et al. (2014). "Prevalence of overweight and obesity in children and adolescents from the age range of 2 to 19 years old in Brazil." Int J Pediatr **2014**: 583207.
- Noeman, S. A., H. E. Hamooda, et al. (2011). "Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats." Diabetol Metab Syndr **3**(1): 17.
- Powers, S. K. and M. J. Jackson (2008). "Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production." Physiol Rev **88**(4): 1243-76.
- Reckelhoff, J. F. and L. A. Fortepiani (2004). "Novel mechanisms responsible for postmenopausal hypertension." Hypertension **43**(5): 918-23.
- Reeves, P. G., F. H. Nielsen, et al. (1993). "AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet." J Nutr **123**(11): 1939-51.
- Ristow, M., D. Muller-Wieland, et al. (1998). "Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation." N Engl J Med **339**(14): 953-9.
- Shi, H. and D. J. Clegg (2009). "Sex differences in the regulation of body weight." Physiol Behav **97**(2): 199-204.
- Signorelli, S. S., S. Neri, et al. (2001). "Duration of menopause and behavior of malondialdehyde, lipids, lipoproteins and carotid wall artery intima-media thickness." Maturitas **39**(1): 39-42.
- Signorelli, S. S., S. Neri, et al. (2006). "Behaviour of some indicators of oxidative stress in postmenopausal and fertile women." Maturitas **53**(1): 77-82.
- Soules, M. R., S. Sherman, et al. (2001). "Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW)." J Womens Health Gend Based Med **10**(9): 843-8.
- Stefanovic, A., J. Kotur-Stevuljevic, et al. (2008). "The influence of obesity on the oxidative stress status and the concentration of leptin in type 2 diabetes mellitus patients." Diabetes Res Clin Pract **79**(1): 156-63.

Steppan, C. M. and M. A. Lazar (2002). "Resistin and obesity-associated insulin resistance." Trends Endocrinol Metab **13**(1): 18-23.

Tjonna, A. E., S. J. Lee, et al. (2008). "Aerobic interval training versus continuous moderate exercise as a treatment for the metabolic syndrome: a pilot study." Circulation **118**(4): 346-54.

Valko, M., D. Leibfritz, et al. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." Int J Biochem Cell Biol **39**(1): 44-84.

Vaziri, N. D. and B. Rodriguez-Iturbe (2006). "Mechanisms of disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension." Nat Clin Pract Nephrol **2**(10): 582-93.

Wang, Y., B. Li, et al. (2013). "Impaired PI3 K Akt expression in liver and skeletal muscle of ovariectomized rats." Endocrine **44**(3): 659-65.

Wang, Z., E. R. Chandrasena, et al. (2010). "Redox cycling of catechol estrogens generating apurinic/aprimidinic sites and 8-oxo-deoxyguanosine via reactive oxygen species differentiates equine and human estrogens." Chem Res Toxicol **23**(8): 1365-73.

Welch, K. D., T. Z. Davis, et al. (2002). "Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules." Free Radic Biol Med **32**(7): 577-83.

Wu, S., S. Divall, et al. (2014). "Obesity-induced infertility and hyperandrogenism are corrected by deletion of the insulin receptor in the ovarian theca cell." Diabetes **63**(4): 1270-82.

Zoth, N., C. Weigt, et al. (2012). "Metabolic effects of estrogen substitution in combination with targeted exercise training on the therapy of obesity in ovariectomized Wistar rats." J Steroid Biochem Mol Biol **130**(1-2): 64-72.



**ANEXO A** - Termo de submissão do artigo científico à publicação

**MENO Submission Confirmation for Diet-induced obesity in ovariectomized mice: the effects of high intensity interval training (swimming) on body mass, blood pressure, and oxidative stress**

Sep 25 2014 04:19PM

Dear Professor Mandarin-de-Lacerda,

Your submission entitled "**Diet-induced obesity in ovariectomized mice: the effects of high intensity interval training (swimming) on body mass, blood pressure, and oxidative stress**" has been received by the journal editorial office.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author.

<http://meno.edmgr.com/>

Your username is: Prof Mandarin

Your password is: xxxxxxx

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind Regards,

Menopause - The Journal of The North American Menopause Society

**ANEXO B - Certificado da Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais**



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



**COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/072/2012 sobre “Efeito do treinamento intervalo na obesidade induzida pela dieta em camundongos ooforectomizadas”, sob a responsabilidade de **Carlos Alberto Mandarin de Lacerda**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA), em **21/12/2012**. Este certificado expira em **21/12/2016**.

Rio de Janeiro, 21 de Dezembro de 2012.

*Israel*

*Patricia Lisboa*

Profa. Patricia Cristina Lisboa  
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof. Israel Felzenszwalb  
CEUA/IBRAG/UERJ

*Profª Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva*  
*Profª Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ*  
*Matrícula 34765-8*

/ass

☎ (21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748  
biologia@uerj.br