IRIS CALLADO SANCHES

**Controle cardiovascular em fêmeas ooforectomizadas diabéticas:
efeitos do treinamento físico dinâmico aeróbio, resistido ou combinado**

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Kátia De Angelis Lobo
D'Ávila

São Paulo

2012

IRIS CALLADO SANCHES

**Controle cardiovascular em fêmeas ooforectomizadas diabéticas:
efeitos do treinamento físico dinâmico aeróbio, resistido ou combinado**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade São Paulo para obtenção do título de
Doutora em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Kátia De Angelis Lobo
D'Ávila

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Sanches, Iris Callado

Controle cardiovascular em fêmeas ooforectomizadas diabéticas : efeitos do
treinamento físico dinâmico aeróbico, resistido ou combinado / Iris Callado
Sanches. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São
Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Kátia De Angelis Lobo D'Ávila.

Descritores: 1.Diabetes mellitus experimental 2.Ovariectomia 3.Doenças
cardiovasculares 4.Treinamento físico

USP/FM/DBD-174/12

Dedicatória

Dedico esta tese aos meus pais, **Estanislao Callado Pérez** e **Roseli Giro Sanches**... Por terem me proporcionado absolutamente tudo o que precisei para que pudesse chegar até aqui... E para continuar caminhando!

Dedico à Profa. Dra. **Kátia De Angelis**, por ter acreditado em mim desde o começo... E, mesmo depois de ter enlouquecido me orientando na iniciação científica e no mestrado, ainda acredita. Foi uma honra ser sua primeira orientanda de doutorado!

Dedico à minha irmãzinha **Iara Callado Sanches**... Para quem me esforço para servir de exemplo!

Dedico aos meus amigos **Angelitos**: Catarina Andrade, Christiane Malfitano, Danielle Dias, Diego Figueroa, Filipe Fernandes Conti, Jacqueline Freire, Janaina Brito, Leidoca, Michelle Sartori, Nathalia Bernardes, Renata Juliana e Sebastião de Brito. Juntos à quase 10 anos, transformando sonhos em realidade!

Dedico esta dissertação à minha avó, meus tios, tias, primos, primas, ex-professores, amigos e alunos. Aqueles que passam por nós não vão sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós!

Agradecimentos

À Profa. Dra. **Kátia De Angelis**, por todos os dedos que ela já colocou no fogo por mim!

À Profa. Dra. **Maria Cláudia Irigoyen**, por nos enriquecer com seu conhecimento e sua humanidade!

Aos profissionais responsáveis pelos laboratórios e equipamentos da Universidade São Judas Tadeu, em especial à **Leidoca**, pela disposição em nos ajudar e pela amizade verdadeira!

Aos colegas **Kleiton Augusto** e **Raquel Sirvente**, pela imensa colaboração!

À Universidade de São Paulo e todos os professores, coordenadores, secretários e funcionários que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

*“Viva de forma simples, ame generosamente,
importe-se profundamente, fale educadamente...”*

A felicidade te mantém doce.

Dores te mantêm humano.

Quedas te mantêm humilde.

Sucesso te mantém brilhando!

E provações te mantêm forte.”

[autor desconhecido]

Sumário

Sumário

	Resumo	
	Abstract	
1.....	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	Menopausa e risco cardiovascular.....	2
1.2.	Diabetes mellitus e risco cardiovascular: o impacto da menopausa....	5
1.3.	Benefícios do treinamento físico: impacto nos fatores de risco associados à menopausa e ao diabetes.....	9
2.....	OBJETIVOS.....	18
2.1.	Objetivo geral.....	19
2.2.	Objetivos Específicos.....	19
3.....	MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1.	Sequência experimental.....	25
3.2.	Ooforectomia bilateral.....	26
3.3.	Indução do diabetes.....	27
3.4.	Dosagem de glicemia.....	27
3.5.	Determinação da capacidade máxima de exercício.....	28
3.6.	Protocolo de treinamento.....	31
3.7.	Avaliações ecocardiográficas.....	33
3.8.	Canulação.....	35
3.9.	Identificação da fase do ciclo estral.....	36
3.10.	Registro de pressão arterial.....	37
3.11.	Avaliações da sensibilidade barorreflexa.....	38
3.12.	Avaliação da modulação autonômica cardiovascular no domínio do tempo e da frequência (análise espectral).....	40
3.13.	Sacrifício dos animais.....	41
3.14.	Determinação dos níveis de estradiol plasmático.....	41
3.15.	Avaliação da mortalidade.....	41
3.16.	Análise estatística.....	42
4.....	RESULTADOS.....	43
	<u>PROTOCOLO 1</u>	
4.1.	Peso corporal.....	44
4.2.	Dosagem de estradiol plasmático.....	46
4.3.	Glicemia.....	46
4.4.	Teste de esforço máximo.....	47
4.5.	Teste de carga máxima.....	48
4.6.	Avaliações ecocardiográficas.....	49
4.6.1.	Avaliação morfométrica cardíaca.....	50
4.6.2.	Avaliação da função cardíaca.....	51
4.6.3.	Avaliação da função global.....	52
4.7.	Avaliações hemodinâmicas.....	53
4.8.	Sensibilidade barorreflexa.....	56
4.9.	Modulação autonômica cardiovascular.....	57
4.9.1	Variabilidade da frequência cardíaca.....	57
4.9.1.1	Domínio do tempo.....	57
4.9.1.2.	Domínio da frequência.....	57
4.9.2.	Variabilidade da pressão arterial sistólica.....	59
4.9.2.1	Domínio do tempo.....	59

4.9.2.2.	Domínio da frequência.....	59
4.10.	Mortalidade.....	61
	<u>PROTOCOLO 2</u>	
4.11.	Teste de carga máxima (resistido dinâmico).....	63
4.12.	Prescrição do treinamento físico resistido.....	66
	<u>PROTOCOLO 3</u>	
4.13.	Peso corporal.....	70
4.14.	Dosagem de estradiol plasmático.....	72
4.13	Glicemia.....	72
4.14.	Teste de esforço máximo.....	73
4.15.	Teste de carga máxima.....	74
4.16.	Avaliações ecocardiográficas.....	76
4.16.1.	Avaliação morfométrica cardíaca.....	76
4.16.2.	Avaliação da função cardíaca.....	77
4.16.3.	Avaliação da função global.....	79
4.17.	Avaliações hemodinâmicas.....	80
4.18.	Sensibilidade barorreflexa.....	82
4.19.	Modulação autonômica cardiovascular.....	83
4.19.1.	Variabilidade da frequência cardíaca.....	83
4.19.1.1.	Domínio do tempo.....	83
4.19.1.2.	Domínio da frequência.....	83
4.19.2.	Variabilidade da pressão arterial sistólica.....	85
4.19.2.1.	Domínio do tempo.....	85
4.19.2.2.	Domínio da frequência.....	85
4.20.	Mortalidade.....	88
5.....	DISCUSSÃO.....	89
	<u>PROTOCOLO 1</u>	90
	<u>PROTOCOLO 2</u>	102
	<u>PROTOCOLO 3</u>	107
6.....	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	115
7.....	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120
8.....	ANEXOS.....	134
8.1.	Aprovação do comitê de ética.....	135
8.2.	Artigo da tese submetido.....	136

Resumo

Resumo

Sanches IC. *Controle cardiovascular em fêmeas ooforectomizadas diabéticas: efeitos do treinamento físico dinâmico aeróbio, resistido e combinado* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

O treinamento físico aeróbico induz atenuação de disfunções cardiometabólicas que acometem mulheres menopausadas e/ou diabéticas. Entretanto, estudos envolvendo treinamento resistido ou combinado (aeróbio + resistido) são escassos e controversos. Dessa forma, os objetivos do presente estudo foram avaliar os efeitos metabólicos, cardiovasculares e autonômicos da privação dos hormônios ovarianos na presença ou não de diabetes induzido por estreptozotocina em ratas, bem os efeitos do treinamento físico aeróbio dinâmico, resistido dinâmico, ou combinado nesta condição. Ratas Wistar (200-220g) foram divididas em um grupo controle sedentário (ES), um grupo diabético sedentário (DS) e 5 grupos ooforectomizados (retirada bilateral dos ovários) (n=8), sendo um euglicêmico sedentário (EOS) e os demais diabéticos (estreptozotocina, 50 mg/kg, iv): sedentário (DOS), submetido a treinamento físico (TF) aeróbio em esteira (DOTA), a TF resistido em escada (DOTR), ou a TF combinado, em escada e esteira em dias alternados (DOTC). Após as 8 semanas de TF, a função e a morfometria cardíaca foram avaliadas pelo ecocardiograma e, no dia seguinte, os animais foram canulados para registro da pressão arterial (PA) e avaliação da sensibilidade barorreflexa (SB). A análise da variabilidade da frequência cardíaca (FC) e da PA sistólica (PAS) foi realizada no domínio do tempo e da frequência. Os resultados demonstraram aumento de 9% no peso corporal e 10% na PA, e redução de SB (21% nas respostas taquicárdicas) no grupo EOS. Os animais diabéticos apresentaram redução de 19% no peso corporal e na capacidade física (22% no teste máximo em esteira e 19% na carga máxima na escada); redução de 8% na massa e 18% na espessura relativa da parede do ventrículo esquerdo (VE), aumento de 11% na cavidade do VE, de 31% no tempo de relaxamento isovolumétrico e 34% no índice de desempenho miocárdico; além de redução de na PA, na FC, na SB e na banda AF-IP. A associação de diabetes com ooforectomia induziu exacerbação de algumas disfunções, como aumento de 9% na glicemia e de 20% no índice de desempenho miocárdico (IDM); redução de 14% na velocidade de encurtamento do VE e 14% na FC (DOS vs. DS). O treinamento induziu aumento de 77% na capacidade de corrida no grupo DOTA, aumento de 60% na carga máxima no DOTR, e aumento em ambos os parâmetros no DOTC (75% na corrida e 58% na carga máxima). Todos os animais treinados apresentaram reversão da hipotensão e da bradicardia de repouso, associadas a aumento na VAR-IP (DOTA: 79%, DOTR: 79%, DOTC: 65%), normalização da banda de BF-IP, e redução no índice de desempenho miocárdico (DOTA: 16%, DOTR: 15%, DOTC: 31%) (vs. DOS). Os grupos DOTA e DOTC (mas não o DOTR)

apresentaram maior SB (respostas taquicárdicas e bradicárdicas), atenuação das alterações morfométricas do VE, e na variabilidade da PA sistólica (vs. DOS). Além disso, o grupo DOTR apresentou aumento de 14% na massa, e redução de 14% na velocidade de encurtamento do VE e de 15% no IDM em relação ao grupo DOS. O grupo DOTC demonstrou redução adicional de 18% no IDM e em relação ao DOTA. A mortalidade foi maior no grupo DOS em comparação aos grupos treinados. Concluindo, os resultados evidenciam que o treinamento físico dinâmico aeróbio, resistido ou combinado induziu benefícios na capacidade física, cardíacos, hemodinâmicos e autonômicos após a privação dos hormônios ovarianos em ratas diabéticas. No entanto, o treinamento físico combinado promoveu efeitos adicionais em relação aos treinamentos aeróbio ou ao resistido nesta condição.

Descritores: 1. Diabetes mellitus experimental, 2. Ovariectomia, 3. Doenças cardiovasculares, 4. Treinamento físico

Abstract

Abstract

Sanches IC. *Cardiovascular control in female diabetic ovariectomized rats: effects of dynamic aerobic, resistance and combined exercise training* [thesis]. Sao Paulo: Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, 2012.

Aerobic exercise training induces attenuation of cardiometabolic disorders that affect postmenopausal and/or diabetic women. However, there few and controversial studies involving resistance or combined training (aerobic + resistance) in these conditions. Thus, the objectives of this study were to evaluate the metabolic, cardiac, hemodynamic and autonomic effects of ovarian hormones deprivation in the healthy and streptozotocin-induced diabetic rats, as well as the effects of dynamic aerobic, resistance or combined exercise training in this condition. Female Wistar rats (200-220g) were divided into (n = 8 each group) a sedentary control group (ES), a sedentary diabetic group (SD) and 5 ovariectomized groups (bilateral ovaries removal): sedentary euglycemic (EOS), sedentary diabetic (DOS), trained diabetic by an aerobic protocol on a treadmill (DOTA), by a resistance protocol in ladder (DOTR), or by a combined protocol in ladder+treadmill on alternate days (DOTC). After 8 weeks of training, cardiac morphometric and function were evaluated by echocardiography. On the next day, the animals were cannulated to arterial pressure (AP) recording and baroreflex sensitivity (BS) evaluation. Heart rate (HR) and systolic AP variability were analyzed in the time and frequency domains. The results showed increased of 9% in body weight and 10% in AP, and BS (21% in tachycardic responses) reduction in the EOS group. Diabetic animals showed a reduction of 19% in body weight and in physical capacity (22% in the maximal test on a treadmill and 19% in the maximum load on the ladder), reduction of 8% in mass and of 18% in relative wall thickness of the left ventricle (LV), increase of 11% in LV cavity, 31% in the isovolumetric relaxation time and 34% in myocardial performance index (MPI); in addition to reduction in AP, in HR, BS, and in PI-HF band. The association of diabetes with ovariectomy induced exacerbation of some dysfunctions, such as increased of 9% in blood glucose and 20% in MPI, reduction of 14% in the LV velocity of shortening and 14% in HR (DOS vs. DS). Exercise training induced an increase of 77% in the run capacity in the DOTA group, 60% in the maximum load in DOTR group, and increases in both parameters in DOTC (75% in run and 58% in the maximum load). All trained animals showed reversal of hypotension and bradycardia at rest DOTA: 79%, DOTR: 79%, DOTC: 65%), associated with increased HR variance and normalization of the LF band of pulse interval (PI), and reduced MPI (DOTA: 16%, DOTR: 15%, DOTC: 31%) (vs. DOS). The DOTA and DOTC groups (but not DOTR) had higher BS (tachycardic and bradycardic responses), and attenuation in the LV morphometric changes and in SAP variability (vs. DOS). Furthermore, the DOTR group showed an increase of 14% in mass and a reduction of 14% in LV velocity of shortening and of 15% in MPI

in relation to DOS group. The DOTC group showed additional reduction of 18% in MPI and in relation to DOTA. Mortality was higher in DOS group when compared to trained group. In conclusion, the results showed that dynamic aerobic, resistance or combined exercise training induced benefits in physical capacity, cardiac, hemodynamic and autonomic parameters after ovarian hormone deprivation in diabetic rats. However, the combined exercise training promoted additional effects than aerobic or resistance training in this condition.

Descriptors: 1. Diabetes mellitus experimental, 2. Ovariectomy, 3. Cardiovascular diseases, 4. Exercise training

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Menopausa e risco cardiovascular

As doenças cardiovasculares constituem a mais importante causa de morte em ambos os sexos em todas as regiões do país e no mundo ocidental (Castanho et al., 2001; NAHAS, 2001; Bouchard, 2003). Além disso, muitos estudos têm demonstrado que a incidência de doenças cardiovasculares aumenta significativamente em mulheres após a menopausa (Sowers & La Pietra, 1995; Rossi et al., 2002).

Dentre as alterações que ocorrem com o advento da menopausa, observa-se redução na capacidade de exercício, na força muscular e na massa óssea da mulher, bem como aumento do peso corporal e da prevalência de diabetes mellitus (DM), de osteoporose e de doenças cardiovasculares, conforme já citado (Sowers & La Pietra, 1995). Após a menopausa, a pressão arterial (PA), particularmente a sistólica, aumenta nas mulheres e a hipertensão torna-se mais prevalente (Stamler et al., 1976) ou pelo menos igualmente prevalente em homens e mulheres, sugerindo que os hormônios ovarianos podem ser responsáveis pela pressão arterial mais baixa em mulheres pré-climatério e a sua falta pelo aumento da pressão arterial em mulheres menopausadas (Staessen et al., 1997).

Embora os mecanismos pelos quais os hormônios sexuais femininos promovam essas alterações ainda não estejam bem estabelecidos, alguns trabalhos têm sugerido que a proteção cardiovascular observada na mulher durante a pré-

menopausa está associada às ações do estrógeno sobre a modulação de fatores envolvidos no desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

O controle autonômico cardiovascular também se altera com o envelhecimento e a menopausa (Kuo et al., 1999). Sabe-se que a manutenção da função cardíaca normal é obtida através da regulação neural cardíaca pela integração da atividade do sistema nervoso simpático e parassimpático. Além disso, o controle da homeostase cardiovascular é dependente da atuação dos reflexos originados pelos pressorreceptores arteriais (barorreflexo), pelos cardiopulmonares e por sua integração central (Mancia et al., 1994).

A avaliação da sensibilidade dos pressorreceptores (barorreflexo) e a análise das variabilidades da frequência cardíaca e da pressão arterial são excelentes medidas de função autonômica (De Angelis et al., 2004b). Os pressorreceptores arteriais são mecanorreceptores sensíveis às deformações da parede vascular responsáveis pelo controle da PA em curto prazo, ou seja, momento a momento (Irigoyen et al., 2003). Além do controle reflexo da atividade autonômica, os pressorreceptores também exercem controle tônico sobre a atividade simpática (inibição) e parassimpática (estimulação). Assim o comprometimento da função dos pressorreceptores pode atuar como elemento permissivo ao estabelecimento de alterações primárias de outros mecanismos de controle da função cardiovascular, por não modular a atividade simpática e parassimpática adequadamente (Irigoyen et al., 1995). Tem sido observado na literatura que a sensibilidade dos pressorreceptores apresenta uma menor eficiência quando comparamos mulheres

menopausadas às pré-menopausadas ou até mesmo a homens (Huikuri et al., 1996; Laitinen et al., 1998).

O estudo da variabilidade da frequência cardíaca (FC), outra forma de avaliar o controle autonômico, reflete a interação de diversos fatores que, em sua maioria, envolvem uma influência do sistema nervoso autônomo sobre o aparelho cardiovascular (Joaquim et al, 2005). Hoje se sabe que irregularidades nas variabilidades da FC e da PA significam algum tipo de anormalidade, e que a diminuição da variabilidade da FC é um mau prognóstico (Ribeiro & Moraes, 2005). De fato, estudos experimentais e clínicos vêm demonstrando que a disautonomia (disfunções no sistema nervoso autônomo) está presente em uma série de patologias, tais como a hipertensão arterial, a insuficiência cardíaca, o DM e outras alterações metabólicas (De Angelis et al., 2004b). Dessa forma, intervenções no sentido de detectar, prevenir e/ou atenuar a disfunção autonômica cardiovascular tem sido vistas como importantes estratégias no manejo das doenças cardiovasculares (La Rovere et al., 2002).

Além das alterações cardiovasculares, é frequente também em mulheres menopausadas a presença de intolerância a glicose, resistência à insulina e DM tipo 2 (Sowers & La Pietra, 1995). Somado a isso, na sociedade moderna é cada vez mais prevalente a coexistência de DM e hipertensão arterial, sendo que mais de 60 % das pessoas que têm DM tipo 2 apresentam hipertensão arterial sistêmica (American Diabetes Association, 2003, Schaan et al., 2002).

Esses dados, em conjunto, confirmam que a idade e o gênero têm uma significativa importância na incidência de risco cardiovascular. Em um estudo

recente, Vittinghoff e colaboradores (2003) demonstraram a importância de 11 fatores de risco para evento cardiovascular em mulheres pós-menopausa, entre eles: a redução dos níveis de atividade física, a resistência à insulina e o DM, os níveis de pressão arterial, o perfil lipídico e a obesidade.

1.2. Diabetes mellitus e risco cardiovascular: o impacto da menopausa

A definição de diabetes mais abrangente é sugerida pelo American Diabetes Association (2006): “diabetes mellitus é o nome dado a um conjunto de distúrbios metabólicos caracterizados pela hiperglicemia resultante da deficiência na secreção de insulina, na ação da insulina, ou ambos”. A hiperglicemia crônica do diabetes está associada a danos em longo prazo, e falência de órgãos importantes como olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos.

Estima-se que a prevalência da população diabética poderá chegar aos 300 milhões até o ano de 2025, equivalendo a 5,4% da população mundial (King et al., 1998). No Brasil, foi conduzido um censo entre 1986 e 1988 em uma amostra da população adulta entre 30 e 69 anos de idade de 9 capitais. A média geral da prevalência do DM para essas áreas foi de 7,6%, sendo maior nas regiões mais industrializadas, como Sudeste e Sul. Na cidade de São Paulo, a taxa de prevalência foi de 9,7% na população entre 30 e 69 anos (Malerbi & Franco, 1992). O aumento na prevalência de DM vem crescendo em decorrência de vários fatores, tais como processo de modernização, maior taxa de urbanização, industrialização, hábitos

alimentares inadequados, inatividade física, obesidade, estresse, aumento da expectativa de vida e maior sobrevida das pessoas com DM, além de fatores genéticos (Zanetti, 1996; Tavares, 1997; Muir et al., 1992).

O DM é uma doença metabólica geralmente acompanhada de complicações crônicas características, genericamente denominadas de doença microvascular, doença macrovascular e doença neuropática. O DM provoca complicações nos vasos capilares (nefropatia diabética e retinopatia diabética), nos vasos arteriais (arteriosclerose e gangrena) e nas vias do sistema nervoso (neuropatia diabética) (Junod, 1967; Yagihashi, 1995). De fato, o sistema nervoso periférico está frequentemente comprometido em pacientes diabéticos (Pickup, 1994). Muir e colaboradores (1992) demonstraram que indivíduos diabéticos apresentam maior risco de lesões coronarianas, insuficiência cardíaca congestiva, infartos recorrentes, arritmias e choque cardiogênico, quando comparados à população não diabética. Vale ressaltar que a causa mais frequente de mortalidade em DM é a doença cardiovascular, sendo a principal responsável pela diminuição da sobrevida nesses pacientes.

De fato, indivíduos diabéticos são mais predispostos à insuficiência cardíaca congestiva, independentemente da presença de doença coronariana ou hipertensão. Isto é devido a presença da chamada cardiomiopatia diabética, evidenciada por estudos experimentais, clínicos e epidemiológicos. Essa disfunção provoca mudanças estruturais e funcionais em sujeitos diabéticos. Assim, estudos demonstram que cerca de 60% dos pacientes diabéticos normotensos têm

disfunção sistólica, diastólica e redução do consumo máximo de oxigênio (VO_2 máx.) (Zaslavsky et al., 2005; Brandenburg et al., 1999).

Além disso, o DM é um fator de risco mais importante para mulheres do que para homens (Rossi, 2002), já que alguns estudos demonstraram que a hiperglicemia diabética dobra o risco de desenvolvimento de doenças cardiocirculatórias nos homens e triplica nas mulheres (Muir, 1992). De fato, mulheres com DM tendem a ser mais obesas, hipertensas e com menores índices de HDL que as mulheres não diabéticas (Krolewski, 1987). É importante ressaltar que após a menopausa as alterações impostas pela idade associadas à deficiência estrogênica agem negativamente na secreção pancreática e no fluxo sanguíneo para o músculo esquelético (Gaspar, 1995). Esses efeitos associados ao aumento do tecido adiposo abdominal e declínio do tecido muscular aumentam o risco de desenvolvimento de resistência à insulina e mudanças no metabolismo da glicose após a menopausa, tornando maior o risco de desenvolvimento de DM nesse período (Samsioe, 1998).

Grande parte dos avanços obtidos no entendimento, não só da fisiopatologia como também de complicações do DM, foram obtidos através de estudos em animais. Modelos experimentais como o de ratos geneticamente diabéticos (ratos Bio-Breeding BB) ou aqueles induzidos por aloxano e estreptozotocina (STZ) têm sido amplamente utilizados, sendo a injeção da STZ um dos métodos mais utilizados no estudo do DM em cães e ratos (Yagihashi, 1995; De Angelis et al., 2008).

Ratos submetidos à administração de STZ e não tratados com insulina apresentam desde as alterações mais comuns vistas em humanos com DM

descontrolada, tais como hiperglicemia, polidipsia, poliúria e perda de peso (Junod, 1967; Yagihashi, 1995) até cardiomiopatia e neuropatia diabética (Junod, 1969; Vadlamudi, 1983; De Angelis et al., 2000; De Angelis et al., 2002; Wichi et al., 2007; De Angelis et al., 2008). O comprometimento do sistema nervoso autônomo pode levar a várias alterações funcionais particularmente observáveis no sistema cardiovascular (Junod, 1967; Yagihashi, 1995; De Angelis et al., 2002; De Angelis et al., 2008). De fato, o achado mais frequente com relação à frequência cardíaca de repouso no curso do DM experimental tem sido a bradicardia detectada precocemente (5, 15 e 30 dias) (De Angelis, 2002) ou tardiamente (5 e 48 semanas) (Jackson, 1983; Chang, 1986) após a administração de STZ. Além disso, queda de PA (Maeda, 1995a, 1995b; Dall'ago, 1997), redução da variabilidade da FC (Fazan, 1995; Farah et al., 2007), alterações na frequência cardíaca intrínseca, no tônus vagal e no controle reflexo cardiovascular (barorreflexo e quimiorreflexo) (De Angelis, 2002) parecem indicar alterações consistentes no sistema cardiovascular. Essas alterações podem estar ainda relacionadas às mudanças desfavoráveis na morfometria e função ventricular observadas “in vivo” e “in vitro” em ratos diabéticos (De Angelis et al., 2000; Wichi et al., 2007).

Em razão do aumentado risco de desenvolvimento do DM próximo ao período da menopausa (Samsioe, 1998) e do aumento da prevalência dessa patologia em mulheres menopausadas (Khoo & Perera, 2005), a atenção da comunidade científica tem se voltado para essa população. Recentemente, verificou-se que ratas menopausadas diabéticas por STZ submetidas à reposição hormonal com estradiol apresentaram atenuação da hiperglicemia, da

hiperalbuminúria, do volume urinário e da perda de peso (Riazi et al., 2006). Entretanto, os efeitos colaterais da terapia de reposição hormonal são altamente controversos (Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators, 1996). Por conta disso, estratégias alternativas não-farmacológicas, como o exercício físico, têm sido amplamente utilizadas para o manejo dos fatores de risco em mulheres menopausadas.

1.3. Benefícios do treinamento físico: impacto nos fatores de risco associados à menopausa e ao diabetes

O sedentarismo, que é mais prevalente entre as mulheres após a menopausa (Sowers & La Pietra, 1995), duplica o risco de doença coronariana, efeito esse similar em magnitude ao do tabagismo, da hipertensão ou da hipercolesterolemia (Nieman, 1999). Além disto, a inatividade física parece ser um dos mais importantes fatores de risco cardiovascular nas sociedades modernas, sendo mais prevalente no Município de São Paulo (69%) do que o fumo (38%), a hipertensão (22%), a obesidade (18%) e o alcoolismo (8%) (Rego et al., 1990).

Neste aspecto, as constantes evidências dos benefícios cardiovasculares, metabólicos e autonômicos após o exercício físico agudo e crônico têm levado muitos pesquisadores a sugerir o treinamento físico como uma conduta não farmacológica importante na prevenção e no tratamento da hipertensão, bem como em diferentes situações associadas como DM, resistência à insulina e

obesidade (Hargberg et al., 2000; Tuomilehto et al., 2001; Pedersen & Saltin, 2006). Neste aspecto, o estudo de Fernandes e Zanesco demonstra uma relação positiva entre atividade física na infância e adolescência e menores taxas de ocorrência de doenças endócrinas e cardiovasculares na idade adulta (Fernandes et al., 2010).

De fato, uma revisão de estudos randomizados e controlados em mulheres na menopausa mostrou os benefícios do exercício no peso corporal, na massa óssea, na força e na resistência muscular, na flexibilidade, no consumo de oxigênio, na pressão arterial e no controle metabólico (Asikainen et al., 2004).

Experimentos de nosso grupo evidenciaram que 10 semanas de treinamento físico aeróbio normalizam a hipotensão, a bradicardia, a disfunção ventricular e os reflexos pressorreceptor e quimiorreceptor em ratos machos sedentários diabéticos por STZ (Parente Costa et al., 2004; De Angelis et al., 2000; De Angelis et al., 2002a; Harthmann et al., 2007; Mostarda et al., 2008). Em pacientes diabéticos do tipo 2, Loimaala e colaboradores (2003) mostraram que o treinamento físico aeróbio por 12 meses atenuou a disfunção barorreflexa. Em pacientes com DM tipo 1, Howorka e colaboradores (1997) verificaram que a prática de exercício aeróbio durante 12 semanas induziu aumento na variabilidade da FC, devido a uma melhora autonômica com e sem neuropatia autonômica leve e moderada.

Existem também evidências dos benefícios do treinamento físico após a privação dos hormônios ovarianos. Latour e colaboradores (2001) evidenciaram que o treinamento físico aeróbio por 8 semanas melhorou a resposta da insulina estimulada pelo teste de tolerância a glicose, sem alterar os níveis reduzidos de estradiol observados em ratas submetidas à privação dos hormônios ovarianos.

Estudo de nosso laboratório demonstrou que o treinamento físico aeróbio em um modelo experimental de menopausa em ratas induziu redução do peso corporal, bradicardia de repouso, normalização dos valores de pressão arterial (que estavam elevados nas ratas submetidas à privação estrogênica) e melhora da sensibilidade dos pressorreceptores (Irigoyen et al., 2005). Davy e colaboradores (1996) mostraram que mulheres menopausadas fisicamente ativas têm melhor sensibilidade barorreflexa e variabilidade da frequência cardíaca quando comparadas a mulheres menopausadas menos ativas. Além disso, o treinamento físico aeróbio dinâmico atenuou a disfunção autonômica e reduziu a mortalidade de ratas diabéticas ooforectomizadas (Souza et al., 2007).

Vale destacar que até pouco tempo atrás apenas os exercícios aeróbios eram recomendados, enquanto os exercícios resistidos eram ignorados quando a preocupação estava voltada para o sistema cardiovascular. Devido a esse fato, por muitos anos, pouquíssimos estudos foram realizados para avaliar os efeitos do exercício resistido - no qual a contração muscular é realizada contra uma força que se opõe ao movimento (Fleck & Kraemer, 1999) - para a função cardiovascular. Todavia, recentemente o interesse científico tem crescido em relação a esse tipo de exercício (Forjaz et al., 2006). Atualmente, o treinamento resistido tem sido reconhecido como importante componente do programa de condicionamento físico para adultos devido à promoção de diversos benefícios à saúde (Patê et al., 1995). Há fortes indícios de que altos níveis de força muscular podem estar associados à diminuição dos fatores de risco da síndrome metabólica (Jurca et al., 2004).

Após a menopausa, a mulher apresenta redução na capacidade de exercício, na força muscular e na massa óssea, bem como aumento do peso corporal e da prevalência de DM, de osteoporose e de doenças cardiovasculares (Sowers & La Pietra, 1995). Somado a isso, pacientes em situações especiais normalmente são idosos e sedentários, possuindo força e resistência muscular reduzida (Forjaz et al., 2006). Nesse contexto, o treinamento resistido promove melhoras na força e resistência muscular e na capacidade funcional, contribuindo para a saúde geral e qualidade de vida (ACSM, 2000; Fleck & Kraemer, 1999), podendo também reduzir fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Willians et al., 2007), como a resistência à insulina e a obesidade, muito comuns em pacientes diabéticos do tipo 2 (Pollock et al., 2000).

Praet e colaboradores (2008) submeteram indivíduos diabéticos tipo 2 com polineuropatia a um treinamento resistido intervalado progressivo. Após 10 semanas de treinamento, os indivíduos apresentaram aumento da força muscular, da capacidade máxima de exercício, redução da pressão arterial média (5,5mmHg), da glicemia de jejum e da necessidade de insulina exógena. Em outro estudo, redução no colesterol, associada à redução nas concentrações de LDL e dos triglicérides, foi observada em indivíduos diabéticos tipo 2 após treinamento resistido de intensidade moderada (Honkola et al., 1997). Além desses achados, o treinamento resistido promoveu aumento da força muscular e melhora da sensibilidade à insulina em jovens (15 anos) com sobrepeso (Shaibi et al., 2006).

Baseado nestas evidências, o Colégio Americano de Ciências do Esporte tem recomendado os exercícios resistidos em complemento aos aeróbios dinâmicos

para indivíduos com hipertensão arterial, doença vascular periférica, DM tipo 2, obesidade e outras condições de doenças (ACSM, 2000). A literatura internacional tem adotado com frequência os termos *treinamento combinado* ou *concorrente* para se referir aos programas que combinam treinamento aeróbio dinâmico com treinamento resistido num mesmo período de tempo (Maiorana et al., 2002; Paulo et al., 2005). Vale destacar que as respostas adaptativas ao treinamento físico combinado, tendo sessões aeróbias e resistidas no mesmo dia e em dias alternados, ainda foram pouco estudadas.

Hickson e colaboradores (1988) demonstraram que o treinamento físico combinado permitiu aos sujeitos suportar por mais tempo uma atividade aeróbia no cicloergômetro sem o aumento concomitante do $\text{VO}_{2\text{máx}}$, sugerindo que um aumento na força dos membros inferiores poderia aumentar o tempo para atingir a exaustão. Esses resultados indicam que os fatores limitantes do desempenho da resistência aeróbia podem ser mais fortemente relacionados com fatores periféricos e neurais do que com fatores centrais como o $\text{VO}_{2\text{máx}}$. Todavia, uma questão que surge é como deve ser realizada a combinação dos treinamentos resistido e aeróbio. Sale e colaboradores (1990) mostraram que o treinamento combinado no mesmo dia pode causar prejuízo no desenvolvimento da força, concluindo que os treinamentos (resistido e aeróbio) devem ser realizados em dias alternados para obtenção de melhores resultados.

Considerando que a mortalidade no DM está fortemente associada a complicações macro vasculares (aterosclerose), enquanto a disfunção microvascular (retinopatia, neuropatia e nefropatia) contribui significativamente para a

morbidade, o treinamento físico combinado pode ser uma importante estratégia no manejo da disfunção endotelial, a qual é um componente integral na patogênese da doença cardiovascular (Maiorana et al., 2001). De fato, o treinamento aeróbio realizado concomitantemente ao treinamento resistido de moderada-baixa intensidade pode ajudar a prevenir os efeitos de “endurecimento” vascular (*stiffening*) causados pelo treinamento resistido em remadores (Cook et al., 2006).

Ao analisar os efeitos do treinamento físico combinado em indivíduos diabéticos tipo 2, Maiorana e colaboradores (2002) observaram redução da FC submáxima de exercício, do limiar ventilatório, do percentual de gordura corporal, da relação cintura-quadril, da glicemia de jejum e da hemoglobina glicada, aumento da força muscular, da massa magra e do VO_2 máx, melhora da capacidade funcional e do controle glicêmico após 8 semanas de treinamento. Carrier e colaboradores (2008) compararam os efeitos dos treinamentos físico aeróbio, resistido e combinado, e demonstraram que o controle glicêmico (redução da hemoglobina glicada) foi melhor nos indivíduos diabéticos tipo 2 submetidos ao treinamento físico combinado em relação aos outros treinamentos.

De acordo com uma meta-análise realizada por Snowling e Hopkins (2006), a literatura apresenta estudos suficientes que nos levam a concluir que o treinamento aeróbio, resistido ou combinado possuem benefício moderado no controle glicêmico de pacientes DM 2, todavia são muito pouco os estudos que avaliaram os efeitos benéficos do treinamento físico nas complicações e fatores de risco do DM. Nesse contexto, faz-se necessário um considerável adicional número de estudos para estabelecimento da intensidade mais apropriada do treinamento físico para

tratamento de pacientes com DM, principalmente no climatério, em uma fase da vida em que há aumento da prevalência dessa doença.

Além disto, vale destacar que apesar das evidências cada vez mais consistentes do treinamento físico aeróbico dinâmico em modelos animais de diabetes, não há um protocolo preciso de determinação de carga máxima, bem como de prescrição de treinamento resistido para ratos. Os estudos publicados com treinamento físico resistido em ratos (Barauna et al., 2005; Barauna et al., 2007) ou mesmo em ratas ooforectomizadas (Silveira et al., 2011; Prestes et al., 2012; De Deus et al., 2012) realizaram protocolos de treino em muitos casos sem avaliação de carga máxima e aparentemente em alta intensidade, sem uma preocupação com o risco cardiovascular. Neste sentido, seria importante o desenvolvimento/aprimoramento de um protocolo de avaliação de carga máxima em ratos que permitisse uma prescrição de treinamento físico baseada em intensidade relativas, o que permitiria trabalhar com modelos animais de doenças em intensidades (40-60% da carga máxima) semelhantes às recomendadas para humanos acometidos por doenças como o diabetes (Willians, 2007), possibilitando uma melhor translação do conhecimento.

Considerando a associação de vários fatores de risco na mulher após o advento da menopausa, agravado pelo estilo de vida sedentário e o aumento na prevalência de DM nessa população (Khoo & Perera, 2005), intervenções, farmacológicas e não farmacológicas, no sentido de prevenir ou minimizar a morbimortalidade nessa população têm sido amplamente estudadas por pesquisadores. As grandes associações mundiais de profissionais da área da

cardiologia, como o *American Heart Association* (AHA), o *American College of Cardiology* (ACC) e o *European Society of Cardiology* (ESC) têm lançado campanhas de conscientização e auxílios especiais (como o *Red Dress* do AHA) para pesquisas que busquem o entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da doença cardiovascular especificamente na mulher. Recentemente, o AHA publicou um consenso que recomenda a prática da atividade física regular como forma de prevenção e controle dos efeitos adversos de doenças para mulheres saudáveis ou que já apresentem disfunções ou fatores de risco (Mosca et al., 2007). Apesar do consenso da importância da recomendação da prática de exercícios regulares para a mulher, os benefícios desta abordagem na presença de diferentes fatores de risco cardiovascular ainda não foram comprovados e os mecanismos fisiológicos envolvidos nesses benefícios foram pouco estudados no sexo feminino. De fato, a prática regular de exercícios físicos (treinamento físico) induz efeitos benéficos sobre a função cardiovascular e redução dos fatores de risco para doenças cardiovasculares. Entretanto, esses benefícios têm sido observados, principalmente, em decorrência da atividade regular de física aeróbia dinâmica, enquanto resultados de estudos envolvendo outros tipos de exercícios são escassos e controversos (Forjaz et al., 2006). Os dados disponíveis na literatura indicam uma associação inversa entre condicionamento cardiorrespiratório e prevalência de fatores de risco (Jurca et al., 2004). Este trabalho pretende comparar os efeitos do treinamento aeróbico, resistido e combinado nas disfunções metabólicas, cardiovasculares e autonômicas relacionadas à morbimortalidade na associação da privação dos hormônios ovarianos e DM. Para tanto, será necessária a padronização

de um teste de carga máxima em escada para a prescrição do treinamento resistido de intensidade moderada para ratos. Dessa forma, os resultados obtidos no presente projeto podem embasar uma melhor utilização do treinamento físico como uma forma não farmacológica de tratamento do DM em mulheres após a menopausa.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Os objetivos do presente estudo foram avaliar os efeitos metabólicos, cardiovasculares, autonômicos e na mortalidade da privação dos hormônios ovarianos na presença ou não de diabetes induzido por estreptozotocina em ratas, bem os efeitos do treinamento físico aeróbio dinâmico, resistido dinâmico, e combinado (aeróbio + resistido) nesta condição.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do presente estudo foram:

- 1) avaliar os efeitos metabólicos, cardíacos, hemodinâmicos, autonômicos e na mortalidade da privação dos hormônios ovarianos na presença ou não de diabetes induzido por estreptozotocina em ratas;
- 2) padronizar um teste de carga máxima em escada para avaliação da carga máxima e para prescrição de treinamento físico resistido para ratos;
- 3) comparar os efeitos do treinamento físico aeróbio dinâmico, resistido dinâmico, ou combinado (aeróbio + resistido) na capacidade de exercício e na carga máxima, bem como sobre parâmetros metabólicos, de morfometria e função cardíaca, hemodinâmicos, autonômicos e na mortalidade em ratas ooforectomizadas diabéticas.

Materiais e métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade São Judas Tadeu (COEP-USJT) conforme o parecer 056/08, e pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq) conforme o parecer 0984/08.

Foram utilizadas 56 ratas Wistar fêmeas, pesando entre 200 e 220 gramas provenientes do biotério da Faculdade Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos agrupados, em ambiente com temperatura controlada (22^0 - 24^0C) e com luz controlada em ciclo de 12 horas (claro: escuro). Água e comida foram oferecidas de modo irrestrito.

Para cumprir os três objetivos propostos, este trabalho foi dividido em 3 protocolos.

PROTOCOLO 1

Para avaliar os efeitos metabólicos, cardíacos, hemodinâmicos e autonômicos da privação dos hormônios ovarianos na presença ou não de diabetes induzido por estreptozotocina em ratas foram comparados os seguintes grupos (n=8 em cada grupo):

- **Euglicêmicas sedentárias (ES):** foram acompanhadas durante 8 semanas.
- **Diabéticas sedentárias (DS):** foram submetidas à indução do diabetes por STZ e acompanhadas durante 8 semanas.
- **Euglicêmicas ooforectomizadas sedentárias (EOS):** foram submetidas à cirurgia de ooforectomia bilateral e acompanhadas durante 8 semanas.
- **Diabéticas ooforectomizadas sedentárias (DOS):** foram submetidas à cirurgia de ooforectomia bilateral e, após 5 dias, à indução do diabetes por STZ.

PROTOCOLO 2

Para padronizar um teste de carga máxima em escada para avaliação da carga máxima e para prescrição de treinamento físico resistido de intensidade moderada (40-60% da carga máxima) para ratos, foram utilizados os seguintes grupos (n=8 em cada grupo)* :

- **Euglicêmicas sedentárias (ES):** foram acompanhadas durante 8 semanas.

- **Diabéticas ooforectomizadas sedentárias (DOS):** foram submetidas à cirurgia de ooforectomia bilateral e, após 5 dias, à indução do diabetes por STZ.
- **Diabéticas ooforectomizadas submetidas a treinamento físico resistido (DOTR):** foram submetidas à cirurgia de ooforectomia bilateral; após 5 dias, à indução do diabetes por STZ e, após 7 dias da ooforectomia iniciaram um protocolo de treinamento físico resistido em escada durante 8 semanas.

**os animais que constituem estes grupos são os mesmos dos protocolos 1 e 3.*

PROTOCOLO 3

Para comparar os efeitos do treinamento físico (intensidade moderada) aeróbio dinâmico, resistido dinâmico, ou combinado (aeróbio + resistido) na capacidade de exercício e na carga máxima, bem como sobre parâmetros metabólicos, de morfometria e função cardíaca, hemodinâmicos e autonômicos em ratas ooforectomizadas diabéticas, foram avaliados os seguintes grupos (n=8 em cada grupo):

- **Diabéticas ooforectomizadas sedentárias (DOS):** foram submetidas à cirurgia de ooforectomia bilateral e, após 5 dias, à indução do diabetes por STZ.

- **Diabéticas ooforectomizadas submetidas a treinamento físico aeróbio (DOTA):** foram submetidas à cirurgia de ooforectomia bilateral; após 5 dias, à indução do diabetes por STZ e, após 7 dias da ooforectomia iniciaram um protocolo de treinamento físico em esteira ergométrica rolante de intensidade moderada (40-60% da velocidade máxima do teste de esforço) durante 8 semanas.
- **Diabéticas ooforectomizadas submetidas a treinamento físico resistido (DOTR):** foram submetidas à cirurgia de ooforectomia bilateral; após 5 dias, à indução do diabetes por STZ e, após 7 dias da ooforectomia iniciaram um protocolo de treinamento físico resistido em escada de intensidade moderada (40-60% da carga máxima) durante 8 semanas.
- **Diabéticas ooforectomizadas submetidas a treinamento físico combinado (DOTC):** foram submetidas à cirurgia de ooforectomia bilateral; após 5 dias, à indução do diabetes por STZ e, após 7 dias da ooforectomia iniciaram um protocolo de treinamento físico combinado de intensidade moderada (aeróbio e resistido) durante 8 semanas.

3.1 Sequência Experimental

A Figura 1 ilustra a sequência experimental do presente estudo.

Figura 1: Sequência experimental do presente estudo

3.2 Ooforectomia bilateral

As ratas foram anestesiadas (i.p.) com cloridrato de cetamina (50mg/Kg, Ketalar, Parke-Davis) e cloridrato de xilazina (12mg/Kg, Rompum, Bayer) e colocadas em decúbito dorsal para que se realizasse uma pequena incisão (1 cm) em paralelo com a linha do corpo na pele e na musculatura no terço inferior na região abdominal. Os ovários foram localizados e foi realizada a ligadadura dos ovidutos, incluindo os vasos sanguíneos. Os ovidutos foram seccionados e os ovários removidos. A musculatura e a pele foram suturadas e uma dose de antibiótico (i.m.) foi administrada (Benzetacil, 40 000 U/Kg) (Latour et al., 2001; Irigoyen et al., 2005; Sanches et al., 2011). Os animais foram avaliados 9 semanas após a ooforectomia em função de trabalhos prévios de nosso grupo terem demonstrado que este tempo induz alterações que podem ser atenuadas pelo treinamento físico aeróbico dinâmico em ratas normais e diabéticas (Irigoyen et al., 2005; Souza et al., 2007) (Figura 2).

Figura 2: Etapas de realização da ooforectomia bilateral em ratas.

3.3 Indução do diabetes

Cinco dias após a ooforectomia, o DM foi induzido por uma única injeção endovenosa (e.v.) de estreptozotocina (STZ, 50 mg/Kg, ev, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) pela veia da cauda (Rerup, 1970). A STZ foi dissolvida em tampão citrato (0,01M, pH 4,5) e injetada cerca de 5 minutos após a diluição. Os animais foram mantidos em jejum por 6 horas antes da indução. Os grupos ES e EOS foram injetados endovenosamente somente com tampão citrato.

3.4 Dosagem da glicemia

As concentrações sanguíneas de glicose foram determinadas em jejum de 4 horas no início (2 dias após a indução do diabetes) e ao final do protocolo por meio do aparelho Advantage® da Roche® e suas fitas reagentes (Figura 3). A avaliação final dos animais foi realizada 8 semanas após a indução do diabetes em função deste tempo induzir complicações crônicas decorrentes da hiperglicemia (De Angelis et al., 2000, 2002 e 2009; Harthmann et al., 2007; Souza et al., 2007; Sanches et al., 2011).

Figura 3: Aparelho utilizado para análises das concentrações sanguíneas de glicose.

3.5 Determinação da capacidade máxima de exercício

Antes dos testes de esforço para determinação da capacidade máxima de exercício, todos os animais foram submetidos a um período de adaptação por 5 dias na esteira e na escada.

Para a adaptação à esteira, os animais realizaram corrida a 0,3km/h durante 10 minutos por 5 dias. Durante o período de adaptação ao exercício em escada, os animais foram colocados nos degraus inferiores e adaptados ao ato de escalar, sem nenhuma carga. Nenhuma recompensa ou alimento foi oferecido, tampouco foram utilizados incentivos como estimulação elétrica para que os animais executassem o exercício. O único incentivo para o exercício, quando necessário, foi um toque da mão na base da cauda do animal. No topo da escada, os animais encontravam uma gaiola (20 x 20 x 20 cm) onde descansavam por 120 segundos. Este procedimento foi repetido até que os animais subissem a escada voluntariamente 3 vezes consecutivas.

- **Teste de esforço máximo (aeróbio dinâmico)**

Todos os grupos estudados foram submetidos a um protocolo de teste de esforço máximo (TE) em esteira ergométrica no início (antes da 1ª semana de treinamento físico), ao final da 4ª e da 8ª semanas de protocolo. Os resultados desses testes serviram de base para prescrição do treinamento físico para os grupos treinados, bem como para evidenciar melhora na capacidade de exercício após o período de treinamento físico, em comparação com os grupos sedentários. Para

adaptação, os animais realizaram corrida leve (0,3km/h) durante 10 minutos por 5 dias.

O teste consistiu em colocar o animal correndo na esteira a 0,3 km/h por 3 minutos, sendo esta carga incrementada em 0,3 km/h a cada 3 minutos até que o animal atingisse a exaustão (Brooks & White, 1987). Este protocolo de teste de esforço apresenta correlação significativa com a medida do consumo direto de oxigênio (VO_2) em ratos machos, conforme evidenciado por Rodrigues et al. (2007) o que nos confere validade e fidedignidade para prescrição e controle do treinamento físico por meio desta avaliação (Irigoyen et al., 2005; Flues et al., 2010; Flores et al., 2010; Sanches et al., 2011). A Figura 4 apresenta a correlação entre o VO_2 e a velocidade do teste de esforço em ratas ooforectomizadas ($r=0,92$, dados não publicados).

Figura 4: Correlação entre o consumo de oxigênio (VO_2) e a velocidade no teste de esforço (km/h) em ratas ooforectomizadas ($n=6$).

- **Teste de carga máxima (resistido dinâmico)**

Para padronizar o teste de carga máxima, uma escada adaptada para ratos foi utilizada (Figura X). A escada possui 54 degraus verticais, com 0,5cm de distância entre cada degrau, e uma pequena caixa de acrílico no topo, que era coberta com um pano para que ficasse escura e atrativa para os animais descansarem entre as subidas. Os pesos utilizados como carga foram montados a partir de pesos para iscas de pesca, sendo suas variadas formas e tamanhos aproveitados como diferentes cargas (intensidades). Esses pesos eram fixados na base da cauda do animal em um aparato preso com esparadrapo (Figura 5).

O teste consistiu em uma escalada com carga inicial de 75% do peso corporal. Após 2 minutos de descanso, um peso adicional de 30 gramas foi aplicado no aparato da cauda, e assim sucessivamente com descansos de 2 minutos entre cada escalada, até que o animal não conseguisse completar a subida.

No grupo ES, imediatamente após cada escalada, uma gota de sangue da ponta da cauda foi coletada para dosagem do lactato sanguíneo (Accutrend Plus, Roche Diagnostics), a fim de identificarmos o limiar de lactato.

Figura 5: Fotografia de rato realizando a escalada na escada com peso fixado a cauda.

3.6 Protocolo de treinamento físico

- **Aeróbio dinâmico**

Após a realização do TE, o grupo DOTA foi submetido a um protocolo de treinamento físico em esteira ergométrica com velocidade e carga progressivas durante 8 semanas, 5 dias por semana, e intensidade de 40 a 60% da velocidade máxima no TE inicial, conforme previamente descrito (Irigoyen et al., 2005; Souza et al., 2007; Flues et al., 2010; Sanches et al., 2011). O Quadro 1 apresenta um resumo da prescrição do treinamento físico aeróbio. Vale ressaltar que, ao atingir o platô de 60 minutos com intensidade a 60%, a progressão do treinamento foi baseada no aumento da duração da corrida na velocidade-alvo, ou seja, 60% da máxima obtida no teste de esforço. Ao final da 4ª semana, realizou-se um novo teste de esforço

máximo (intermediário) para reajuste da velocidade de treinamento, em função do novo nível de condicionamento físico (Figura 6).

Quadro 1: Resumo da prescrição do treinamento físico aeróbio dinâmico em esteira.

Semana	Duração	Intensidade
1	45 min	40%
2	60 min	40-50%
3	60 min	50-60%
4	60 min	50-60%
5	60 min	50-60%
6	60 min	50-60%
7	60 min	60%
8	60 min	60%

Figura 6: Ratos correndo na esteira ergométrica.

- **Resistido dinâmico**

O protocolo de treinamento físico resistido foi realizado durante 8 semanas, 5 dias por semana, baseado no protocolo de treinamento físico aeróbico utilizado pelo nosso grupo nos últimos anos (Flores et al., 2010; Flues et al., 2010; Irigoyen et al., 2005; Sanches et al., 2009; Souza et al., 2007), com intensidade moderada (40-60% da carga máxima) conforme recomendado para pacientes diabéticos (Sigal et al., 2004; Williams et al., 2007).

- **Combinado**

A prescrição do treinamento físico combinado seguiu os mesmos critérios do aeróbio e do resistido (5 dias por semana, durante 8 semanas), com intensidade moderada, tendo alternância diária da modalidade de treino, ou seja, um dia de corrida na esteira, outro dia de escalada na escada. A opção por realizar as sessões em dias alternados justifica-se pela tentativa de equalização do volume, e devido a estudos (Sale et al., 1990) alertarem que o treinamento combinado realizado no mesmo dia pode causar prejuízo no desenvolvimento da força muscular.

3.7 Avaliações ecocardiográficas

As medidas ecocardiográficas foram realizadas ao final do protocolo no Laboratório de Hipertensão Experimental do InCor – HCFMUSP e seguiram as recomendações do Comitê de Padronização do Modo M da Sociedade Americana de Ecocardiografia (Sahn et al., 1978). Os exames foram realizados por um único observador e em cada exame foi coletado um total de cinco medidas para cada

variável, sendo calculados posteriormente, a média, o desvio padrão da média e o erro padrão da média dessas medidas.

O exame ecocardiográfico foi realizado com os animais anestesiados (i.p.) com cloridrato de cetamina (50mg/Kg, Ketalar) e cloridrato de xilazina (12mg/Kg, Rompum, Bayer). O equipamento SEQUOIA 512 (ACUSON Corporation, Mountain View, CA) foi utilizado com um transdutor de 15 MHz. As imagens foram feitas a uma frequência de 13,0 MHz, para otimização da resolução e a penetração do animal. Para registro das imagens foi utilizado gel de transmissão para ultrassom de viscosidade média/alta (General Imaging Gel, ATL, Reedsville, USA). As imagens foram armazenadas em fitas de videocassete (Sony SVO-9500 MD), em discos ópticos (Sony 128Mb).

A partir da visualização do ventrículo esquerdo (corte transversal) ao nível dos músculos papilares foi realizado: diâmetro diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do ventrículo esquerdo e a espessura do septo interventricular (SIV) e da parede posterior do ventrículo esquerdo (PP) em sístole e diástole. Após a realização das medidas foi calculada a massa do ventrículo esquerdo segundo orientação da Sociedade Americana de Ecocardiografia, que estima a massa do ventrículo esquerdo através da utilização da seguinte fórmula matemática: $LVM = [(DDVE + SIV + PP)^3 - (DDVE)^3] \times 1,047$, onde 1,047 (mg/mm^3) corresponde a densidade do miocárdio. Além da massa do ventrículo esquerdo foi calculada a força de encurtamento do ventrículo esquerdo ($D\% = [(DDVE - DSVE) / DDVE] \times 100$). Os valores absolutos da massa do ventrículo esquerdo foram normalizados pelo peso corporal.

Além disso, foi calculado o índice de hipertrofia cardíaca através da divisão da massa do ventrículo esquerdo pelo peso corporal.

As imagens obtidas através do Doppler foram utilizadas para se calcular os parâmetros da função diastólica do ventrículo esquerdo. Os picos de velocidade da onda E, os picos de velocidade da onda A, o tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) e o tempo de desaceleração foram medidos e foi calculada a relação onda E / onda A. Utilizando ainda o tempo de ejeção (TE) do fluxo de via de saída do ventrículo esquerdo foi calculada a velocidade de encurtamento circunferencial da fibra miocárdica ($VCF = [(DDVE-DSVE)/DDVE]/TE$). Embora o VCF seja sensível a mudanças agudas da pressão arterial na sobrecarga hemodinâmica, em condições basais, na ausência de mudanças agudas da pressão arterial, o cálculo do VCF fornece informações quanto à contratilidade miocárdica.

3.8 Canulação

Ao final do protocolo os animais foram anestesiados (i.p.) com uma solução de cloridrato de cetamina (50mg/Kg, Ketalar) e cloridrato de xilazina (12mg/Kg, Rompum), e colocados em decúbito dorsal para que se realizasse uma pequena incisão no pescoço por onde foram implantados cateteres de polietileno (cânulas; tygon P50) preenchidos com soro fisiológico. Essas cânulas foram posicionadas no interior da artéria carótida e da veia jugular para registro de PA, frequência cardíaca (FC) e administração de drogas, respectivamente. Após a correta e firme implantação das cânulas na artéria carótida e veia jugular, estas foram exteriorizadas no dorso do animal na região cervical e fixadas com fio de algodão na

pele (DE ANGELIS et al., 1997, 1999; IRIGOYEN et al., 2005) (Figura 7). Cada animal foi mantido em uma caixa individual padrão durante a realização das avaliações hemodinâmicas sistêmicas que iniciaram 24h após a canulação.

Figura 7: Esquema do local da canulação da artéria carótida e veia jugular.

3.1 Identificação da fase do ciclo estral

A fim de evitarmos qualquer influência da oscilação dos hormônios sexuais femininos nos resultados observados nos grupos ES e DS, foi realizada a identificação da fase do ciclo estral das ratas antes do registro de pressão arterial e da avaliação da sensibilidade barorreflexa.

A secreção vaginal foi coletada com uma pipeta plástica com 10µL de solução salina (NaCl 0,9%) introduzida superficialmente na vagina da ratas. O fluido vaginal foi colocado em uma lâmina de vidro para a observação do material em um microscópio óptico, nos aumentos de 10x e 40x. A caracterização da fase do ciclo

estral foi baseada na proporção de três tipos de células na secreção vaginal: células epiteliais, células corneificadas e leucócitos. As avaliações foram realizadas em fases não-ovulatórias do ciclo estral das ratas: diestro (predominância de leucócitos) e metaestro (igual proporção de leucócitos, células epiteliais e corneificadas) (Marcondes et al., 2002) (Figura 8).

Figura 8: Tipos de células encontradas em cada ciclo estral: (A) diestro, (B) proestro, (C) estro e (D) metaestro (Marcondes et al., 2002).

3.2 Registro da pressão arterial

Com o animal acordado, a cânula arterial foi conectada a uma extensão de 20cm, permitindo livre movimentação do animal pela caixa, durante todo o período do experimento. Esta extensão foi conectada a um transdutor eletromagnético de pressão (Kent Instruments) que, por sua vez, estava conectado a um pré-amplificador (Stemtech) (Figura 9). Sinais de PA foram gravados durante um período de 30 minutos em um microcomputador equipado com um sistema de aquisição de dados (CODAS, DATAQ Instruments), permitindo análise dos pulsos de pressão, batimento-a-batimento, com uma frequência de amostragem de 2KHz por canal

para estudo dos valores de PA e FC (De Angelis et al., 1997; De Angelis et al., 1999; De Angelis et al., 2000; De Angelis et al., 2004; Irigoyen et al., 2005; Sousa et al., 2007).

Figura 9: Sistema de registro de pressão arterial. Em detalhe, fotografia mostrando conexão entre a cânula exteriorizada no dorso do animal e o transdutor de pressão arterial.

3.3 Avaliações da sensibilidade barorreflexa

Após o registro basal da PA e da FC, uma extensão de aproximadamente 20 cm (P10) foi conectada na cânula venosa para posterior injeção de drogas vasoativas.

Fenilefrina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA), um potente estimulador α_1 cuja ação predominante se dá nas arteríolas periféricas causando vasoconstrição, foi usada para provocar aumento da PA. Esse aumento da PA é seguido de bradicardia reflexa comandada pelos pressorreceptores.

Nitroprussiato de sódio (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA), um potente vasodilatador tanto de arteríolas como de veias e cuja ação se dá por meio da ativação da guanilato ciclase e aumento da síntese de 3', 5'- guanosina monofosfato (GMP cíclico) na musculatura lisa de vasos e outros tecidos, foi usado para provocar queda da PA. Essa queda é seguida por uma resposta taquicárdica reflexa comandada pelos pressorreceptores.

Após os animais terem permanecido em condições de repouso por 15 minutos, a sensibilidade dos pressorreceptores foi testada através da injeção de doses crescentes de fenilefrina (2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml, 32 µg/ml) e nitroprussiato de sódio (5 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml). Essas drogas foram injetadas randomicamente entre os animais, iniciando-se a sessão com um ou outro fármaco (Figura 10).

Figura 10: Registro da pressão arterial e frequência cardíaca antes e após a administração de drogas vasoativas. Observe a resposta reflexa dos pressorreceptores.

A sensibilidade barorreflexa foi avaliada pelo índice calculado através da divisão de variação da FC pela variação da PAM (De Angelis et al., 1997; De Angelis et al., 1999; De Angelis et al., 2004; Sousa et al., 2007). Para esse cálculo, o pico máximo ou mínimo da PAM foi comparado aos valores de PAM do período controle. Da mesma forma, a variação máxima da FC foi comparada com os valores de FC do período controle, imediatamente antes da injeção das drogas, para posterior quantificação das respostas.

3.4 Avaliação da modulação autonômica cardiovascular no domínio do tempo e da frequência (análise espectral)

A partir do registro basal dos animais acordados, foi possível utilizar a ferramenta de análise tempo-frequência da VPAS e da VFC. Os parâmetros para análise no domínio do tempo consistiram em calcular os valores médios da PAS e FC, sendo as suas variabilidades quantificadas pela média dos desvios padrão. A análise no domínio da frequência constituiu da decomposição do sistograma pela Transformada Rápida de Fourier. Após esse remodelamento matemático, foram obtidas as potências absolutas da banda de baixa frequência (BF, 0,20-0,75 Hz) (Soares et al., 2004). A variabilidade do intervalo de pulso foi obtida pela análise do tacograma a partir do registro da PAS, onde a frequência dos batimentos foi determinada pelo intervalo entre dois picos sistólicos. Para essa análise foram utilizados registros estáveis de, no mínimo, 5 minutos e com frequência de amostragem de 2000 Hz. Além do componente de baixa frequência, outro

componente foi obtido na análise espectral: alta frequência (AF, 0,75-3,0 Hz). O componente BF é usado como um índice da atividade simpática. O componente AF é usado como um índice da atividade parassimpática. A relação BF/AF indica o balanço simpato-vagal (Soares et al., 2004; Ishise & Asanoi et al., 1998).

3.5 Sacrifício dos animais

No dia seguinte ao término das avaliações hemodinâmicas, os animais de ambos os grupos foram sacrificados por decapitação e os tecidos foram pesados e armazenados para futuras análises em projetos subsequentes do grupo.

3.6 Determinação dos níveis de estradiol plasmático

Para dosagem dos níveis plasmáticos de estradiol foram coletados 2ml de sangue no momento do sacrifício. O sangue foi centrifugado e o plasma separado para dosagem dos níveis de 17 beta-estradiol através do kit comercial para radioimunoensaio.

3.7 Avaliação da mortalidade

Os animais foram acompanhados diariamente a partir da data da indução do diabetes para registro da mortalidade. Ao final do protocolo, realizou-se a análise

segundo o método de Kaplan-Meier para comparação da mortalidade entre os grupos (Souza et al., 2007).

3.8 Análise estatística

Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Os testes de Levene e de Mauchly foram utilizados para verificar a homogeneidade e esfericidade das variâncias. O teste de análise de variância (ANOVA) de um caminho [Protocolos 2 e 3], de dois caminhos (two way) [Protocolo 1], ou para medidas repetidas (peso corporal, glicemia, teste de esforço máximo e teste de carga máxima), seguidos do teste complementar de Student Newman-Keuls foram devidamente aplicados para comparação dos dados. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

Resultados

4. RESULTADOS

PROTOCOLO 1

O objetivo do protocolo 1 foi avaliar em ratas os efeitos metabólicos, cardiovasculares e autonômicos da privação dos hormônios ovarianos na presença ou não de diabetes induzido por estreptozotocina.

4.1. Peso corporal

A Figura 11 ilustra o acompanhamento do peso corporal ao longo das 10 semanas de experimento.

No início do protocolo, quando os animais foram divididos em seus respectivos grupos para posterior realização da cirurgia de ooforectomia e da indução do diabetes por meio da injeção de estreptozotocina, o peso corporal foi semelhante entre os grupos. Ao final do protocolo, os grupos euglicêmicos sedentário (ES) e ooforectomizado sedentário (EOS) apresentaram ganho de peso em relação à avaliação inicial. Além disso, os animais submetidos à privação dos hormônios ovarianos (EOS) apresentaram maior ganho de peso corporal do que seus pares com ciclo estral intacto (ES). Os grupos diabético sedentário (DS) e diabético ooforectomizado sedentário (DOS) apresentaram peso corporal menor quando comparados aos seus pares euglicêmicos (ES e EOS) (Figura 12).

Figura 11: Peso corporal dos grupos euglicêmico sedentário (ES), euglicêmico ooforectomizado sedentário (EOS), diabético sedentário (DS) e diabético ooforectomizado sedentário (DOS) ao longo do protocolo. Os números no eixo x representam a semana de protocolo.

Figura 12: Peso corporal dos grupos euglicêmico sedentário (ES), euglicêmico ooforectomizado sedentário (EOS), diabético sedentário (DS) e diabético ooforectomizado sedentário (DOS) no início e ao final do protocolo. As cores claras representam os respectivos valores iniciais. * $p < 0,05$ vs. ES; # $p < 0,05$ vs. EOS; † $p < 0,05$ vs. DS; ‡ $p < 0,05$ vs. mesmo grupo no início.

4.2. Dosagem de estradiol plasmático

A dosagem de estradiol plasmático foi realizada para verificar a eficácia da ooforectomia, bem como comparar os efeitos do diabetes sobre a privação dos hormônios ovarianos. Os grupos ooforectomizados (EOS: $11,6 \pm 1,61$ e DOS: $7,19 \pm 2,44$ pg/ml) apresentaram, como esperado, redução nos níveis de estradiol em comparação aos seus respectivos controles (ES: $33,0 \pm 1,67$ e DS: $19,86 \pm 1,92$ pg/ml).

4.3. Glicemia

A Figura 13 apresenta os valores da glicemia dos animais, dosados 2 dias depois da indução do diabetes por estreptozotocina, após jejum de 4 horas, no início e ao final do protocolo.

Os animais diabéticos (DS e DOS) apresentaram maior glicemia do que os euglicêmicos (ES e EOS) durante todo o protocolo. Além disso, o grupo que associou a privação dos hormônios ovarianos com o diabetes (DOS) apresentou aumento adicional da glicemia, quando comparado ao grupo somente com diabetes (DS), e quando comparado aos seus valores no início do protocolo.

Figura 13: Glicemia dos grupos euglicêmico sedentário (ES), euglicêmico ooforectomizado sedentário (EOS), diabético sedentário (DS) e diabético ooforectomizado sedentário (DOS) no início e ao final do protocolo. As cores claras representam os respectivos valores iniciais. * $p < 0,05$ vs. ES; # $p < 0,05$ vs. EOS; † $p < 0,05$ vs. DS; ¥ $p < 0,05$ vs. mesmo grupo no início.

4.4. Teste de esforço máximo

A Figura 14 apresenta o tempo de corrida no teste de esforço máximo realizado em esteira no início e ao final do protocolo.

No início do protocolo não foram observadas diferenças entre os grupos. Os grupos diabético sedentário (DS) e diabético ooforectomizado sedentário (DOS) apresentaram redução da capacidade de exercício ao final do protocolo, quando comparados aos seus respectivos valores iniciais, e quando comparados aos animais euglicêmicos (ES e EOS).

Teste de esforço máximo

Figura 14: Tempo máximo de corrida no teste de esforço máximo em esteira dos grupos euglicêmico sedentário (ES), euglicêmico ooforectomizado sedentário (EOS), diabético sedentário (DS) e diabético ooforectomizado sedentário (DOS) no início e ao final do protocolo. As cores claras representam os respectivos valores iniciais. * $p < 0,05$ vs. ES; # $p < 0,05$ vs. EOS; † $p < 0,05$ vs. DS; ¥ $p < 0,05$ vs. mesmo grupo no início.

4.5. Teste de carga máxima

A Figura 15 apresenta o peso máximo de subida normalizado pelo peso corporal no teste de carga máxima realizado na escada no início e ao final do protocolo.

Não foram observadas diferenças no desempenho neste teste no início do protocolo. Ao final do protocolo, todos os animais apresentaram ganho de força em relação aos seus valores iniciais, o que já era esperado devido ao ganho de peso e, conseqüentemente, aumento da massa muscular.

Entretanto, o diabetes atenuou o ganho de força nos grupos diabéticos (DS e DOS) em relação aos seus pares euglicêmicos (ES e EOS).

Teste de carga máxima

Figura 15: Peso máximo de subida normalizado pelo peso corporal no teste de carga máxima em escada dos grupos euglicêmico sedentário (ES), euglicêmico ooforectomizado sedentário (EOS), diabético sedentário (DS) e diabético ooforectomizado sedentário (DOS) no início e ao final do protocolo. As cores claras representam os respectivos valores iniciais. * $p < 0,05$ vs. ES; # $p < 0,05$ vs. EOS; † $p < 0,05$ vs. DS; ¥ $p < 0,05$ vs. mesmo grupo no início.

4.6. Avaliações ecocardiográficas

As avaliações ecocardiográficas foram realizadas em todos os animais ao final das 8 semanas de acompanhamento, antes das avaliações hemodinâmicas. No entanto, houve perda de alguns registros, dessa forma, nestas avaliações o número

de animais por grupo foi reduzido (ES n=8; EOS n=6, DS n=6, DOS n=4). Os resultados são apresentados a seguir.

4.6.1. Avaliações morfométrica cardíaca

A Tabela 1 apresenta os parâmetros morfométricos do ventrículo esquerdo (VE) nos grupos ES, EOS, DS e DOS. A massa do ventrículo esquerdo (MVE) foi menor nos grupos diabéticos (DS e DOS) quando comparados aos animais controles (ES). Quando avaliada a cavidade do VE em diástole (VEDIA), observou-se que os animais diabéticos (DS e DOS) apresentaram menor VEDIA do que os animais euglicêmicos (ES e EOS). A espessura relativa da parede (ERP) do VE também foi menor nos animais diabéticos (vs. ES), com redução adicional na associação do diabetes com ooforectomia (DOS) em relação aos animais somente ooforectomizados (EOS).

Tabela 1. Parâmetros ecocardiográficos de morfometria cardíaca nos grupos euglicêmico sedentário (ES), euglicêmico ooforectomizado sedentário (EOS), diabético sedentário (DS) e diabético ooforectomizado sedentário (DOS).

	ES	EOS	DS	DOS
MVE (g)	1,06±0,02	1,05±0,02	0,97±0,01 *	0,97±0,03 *
VEDIA (cm)	0,64±0,01	0,65±0,01	0,72±0,01 *#	0,72±0,01 *#
ERP	0,44±0,02	0,42±0,01	0,36±0,02 *	0,34±0,01 *#

Dados representam média±erro padrão. VEDIA: cavidade do VE na diástole; ERP: espessura relativa da parede do VE; MVE: massa do VE. * p<0,05 vs. ES; # p<0,05 vs. EOS; † p<0,05 vs. DS.

4.6.2. Avaliações da função cardíaca

A avaliação da função cardíaca é apresentada na Tabela 2. Os índices de função sistólica avaliados foram a fração de ejeção (FE), a fração de encurtamento (FEnc) e a velocidade de encurtamento circunferencial (VEC) do VE. Não foram observadas diferenças na FE e na FEnc entre os grupos. Os animais diabéticos apresentaram redução na VEC em comparação aos controles, sendo que a associação de diabetes com ooforectomia provocou uma redução adicional no grupo DOS em relação ao DS.

Os parâmetros de função diastólica avaliados foram o tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) e o tempo da desaceleração do pico E (Desac E). O TRIV foi maior nos animais diabéticos (DS e DOS) em relação aos euglicêmicos (ES e EOS).

Tabela 2. Parâmetros ecocardiográficos de função cardíaca nos grupos euglicêmico sedentário (ES), euglicêmico ooforectomizado sedentário (EOS), diabético sedentário (DS) e diabético ooforectomizado sedentário (DOS).

	ES	EOS	DS	DOS
FE (%)	80±2	80±2	76±2	79±4
FEnc (%)	43±2	44±2	40±2	40±3
VEC (circ/seg)	0,0054±0,0002	0,0057±0,0002	0,0048±0,0002 *#	0,0041±0,0001 *†
TRIV (ms)	23,5±0,91	25,4±1,15	30,8±1,59 *#	30,2±1,53 *#
Desac E (ms)	40,7±1,50	40,1±2,60	45,0±1,56	45,0±0,87

Dados representam média±erro padrão. FE: fração de ejeção; FEn: fração de encurtamento; VEC: velocidade de encurtamento; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; Desac E: desaceleração do pico E. * p<0,05 vs. ES; # p<0,05 vs. EOS; † p<0,05 vs. DS.

4.6.3. Avaliações da função global

A avaliação da função global do coração foi feita através do índice de desempenho miocárdico (IDM). A Figura 16 mostra que os grupos diabéticos (DS e DOS) apresentaram maior IDM do que os euglicêmicos (ES e EOS). A associação do diabetes com ooforectomia provocou aumento adicional no IDM no DOS em relação ao DS.

Índice de desempenho miocárdico

Figura 16: Índice de desempenho miocárdico nos grupos euglicêmico sedentário (ES), euglicêmico ooforectomizado sedentário (EOS), diabético sedentário (DS) e diabético ooforectomizado sedentário (DOS). * $p < 0,05$ vs. ES; # $p < 0,05$ vs. EOS; † $p < 0,05$ vs. DS.

4.7. Avaliações hemodinâmicas

Os parâmetros hemodinâmicos obtidos após a canulação e análise do registro de pressão arterial estão apresentados na Tabela 3.

A privação dos hormônios ovarianos (EOS) induziu aumento da pressão arterial em relação aos animais controles (ES). Além disso, a pressão arterial foi menor nos animais diabéticos (DS e DOS) do que nos animais euglicêmicos (ES e EOS), conforme ilustrado nas Figuras 17.

A Figura 18 apresenta os valores de frequência cardíaca. Os animais diabéticos (DS e DOS) apresentaram redução na frequência cardíaca quando comparados aos seus pares euglicêmicos (ES e EOS). Além disso, a associação

de diabetes com a privação dos hormônios ovarianos ocasionou uma redução adicional na frequência cardíaca no grupo DOS em relação ao grupo somente diabético (DS).

Tabela 3. Parâmetros hemodinâmicos nos grupos euglicêmico sedentário (ES), euglicêmico ooforectomizado sedentário (EOS), diabético sedentário (DS) e diabético ooforectomizado sedentário (DOS).

	ES	EOS	DS	DOS
PAS (mmHg)	129±2,5	139±2,1*	122±2,2*#	114±1,6*#†
PAD (mmHg)	97±2,2	107±2,1*	95±2,0#	90±2,1*#
PAM (mmHg)	113±1,4	125±1,7*	109±2,0#	102±1,6*#†
FC (bpm)	351±8,3	357±7,9	293±8,5*#	250±5,7*#†

Dados representam média±erro padrão. PAD: pressão arterial diastólica; PAS: pressão arterial sistólica; PAM: pressão arterial média; FC: frequência cardíaca. * p<0,05 vs. ES; # p<0,05 vs. EOS; † p<0,05 vs. DS.

Pressão arterial média

Figura 17: Pressão arterial média dos grupos euglicêmico sedentário (ES), euglicêmico ooforectomizado sedentário (EOS), diabético sedentário (DS) e diabético ooforectomizado sedentário (DOS). * $p < 0,05$ vs. ES; # $p < 0,05$ vs. EOS; † $p < 0,05$ vs. DS.

Frequência cardíaca

Figura 18: Frequência cardíaca dos grupos euglicêmico sedentário (ES), euglicêmico ooforectomizado sedentário (EOS), diabético sedentário (DS) e diabético ooforectomizado sedentário (DOS). * $p < 0,05$ vs. ES; # $p < 0,05$ vs. EOS; † $p < 0,05$ vs. DS.

4.8. Sensibilidade barorreflexa

A figura 19 apresenta o índice de sensibilidade barorreflexa. Todos os grupos experimentais (EOS, DS e DOS) apresentaram redução na sensibilidade barorreflexa para respostas taquicárdicas em comparação ao controle (ES). Os grupos diabéticos tiveram redução na resposta bradicárdica em relação aos euglicêmicos (ES e EOS).

Figura 19: Sensibilidade barorreflexa dos grupos euglicêmico sedentário (ES), euglicêmico ooforectomizado sedentário (EOS), diabético sedentário (DS) e diabético ooforectomizado sedentário (DOS). * $p < 0,05$ vs. ES; # $p < 0,05$ vs. EOS; † $p < 0,05$ vs. DS.

4.9. Modulação autonômica cardiovascular

4.9.1. Variabilidade da frequência cardíaca

As avaliações da modulação autonômica da frequência cardíaca (FC) são apresentadas na Tabela 4.

4.9.1.1. Domínio do tempo

O desvio padrão do intervalo de pulso (DP-IP) foi menor nos grupos diabéticos (DS e DOS) em relação aos animais euglicêmicos (ES e EOS). Não foram observadas diferenças no RMSSD (raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre os intervalos R-R normais sucessivos), indicador de modulação parassimpática, entre os grupos. A variância do intervalo de pulso (VAR-IP) foi reduzida após a privação dos hormônios ovarianos (EOS), e mais atenuada ainda na presença do diabetes (DS e DOS) em relação aos animais controles (ES) (Figura 20).

4.9.1.2. Domínio da frequência

A banda de baixa frequência do intervalo de pulso (BF-IP), representativa de modulação simpática cardíaca, foi maior nos animais ooforectomizados (EOS) em relação aos demais grupos (ES, DS e DOS). A banda de alta frequência do intervalo de pulso (AF-IP), representativa de modulação parassimpática cardíaca, foi menor nos animais diabéticos (DS e DOS) em relação aos controles (ES).

Tabela 4. Variabilidade da frequência cardíaca (FC) nos grupos euglicêmico sedentário (ES), euglicêmico ooforectomizado sedentário (EOS), diabético sedentário (DS) e diabético ooforectomizado sedentário (DOS).

	ES	EOS	DS	DOS
DP (ms)	8,65±0,40	7,63±0,34	5,88±0,49*#	5,57±0,21*#
RMSSD (ms)	7,48±0,46	6,61±0,33	6,04±0,35	6,85±0,35
VAR-IP (ms²)	78,30±4,5	56,72±4,6*	35,81±4,5*#	36,91±2,65*#
BF-IP (ms²)	4,70±0,56	7,83±0,86*	2,62±0,44#	2,77±0,31#
AF-IP (ms²)	17,24±1,41	13,78±1,35	11,44±1,66 *	10,77±1,04 *

Dados representam média±erro padrão. DP: desvio padrão do intervalo de pulso; RMSSD: raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre os intervalos R-R normais sucessivos; VAR-IP: variância do intervalo de pulso; BF: banda de baixa frequência do intervalo de pulso; AF: banda de alta frequência do intervalo de pulso. * p<0,05 vs. ES; # p<0,05 vs. EOS; † p<0,05 vs. DS.

Variância do intervalo de pulso

Figura 20: Variância do intervalo de pulso dos grupos euglicêmico sedentário (ES), euglicêmico ooforectomizado sedentário (EOS), diabético sedentário (DS) e diabético ooforectomizado sedentário (DOS). * p<0,05 vs. ES; # p<0,05 vs. EOS; † p<0,05 vs. DS.

4.9.2. Variabilidade da pressão arterial sistólica

As avaliações da modulação autonômica da pressão arterial sistólica (PAS) são apresentadas na Tabela 5.

4.9.2.1. Domínio do tempo

O desvio padrão da pressão arterial sistólica (DP-PAS) foi reduzido no grupo DS em relação ao grupo ES. A associação de diabetes com privação dos hormônios ovarianos induziu uma redução adicional no DP-PAS no grupo DOS em relação aos demais grupos. A variância da pressão arterial sistólica (VAR-PAS) foi maior após a privação dos hormônios ovarianos (EOS) em comparação ao grupo ES. Além disso, tal variável foi reduzida nos grupos diabéticos (DS e DOS) em relação aos animais controles (ES) (Figura 21).

4.9.2.2. Domínio da frequência

A banda de baixa frequência da PAS (BF-PAS) foi maior após a privação dos hormônios ovarianos (EOS) em comparação ao grupo ES. Além disso, tal variável foi reduzida nos grupos diabéticos (DS e DOS) em relação aos animais controles (ES) (Figura 22).

Tabela 5. Variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) nos grupos euglicêmico sedentário (ES), euglicêmico ooforectomizado sedentário (EOS), diabético sedentário (DS) e diabético ooforectomizado sedentário (DOS).

	ES	EOS	DS	DOS
DP- PAS (mmHg)	4,12±0,21	4,79±0,23	3,06±0,19#	2,74±0,16*#
VAR-PAS (mmHg²)	16,13±1,28	25,54±2,26*	7,90±0,99*#	7,41±0,85*#
BF-PAS (mmHg²)	3,81±0,39	7,94±0,93*	1,64±0,27*#	1,04±0,07*#

Dados representam média±erro padrão. DP-PAS: desvio padrão da pressão arterial sistólica; VAR-PAS: variância da pressão arterial sistólica; BF-PAS: banda de baixa frequência da pressão arterial sistólica. * p<0,05 vs. ES; # p<0,05 vs. EOS; † p<0,05 vs. DS.

Variância da pressão arterial sistólica

Figura 21: Variância da pressão arterial sistólica dos grupos euglicêmico sedentário (ES), euglicêmico ooforectomizado sedentário (EOS), diabético sedentário (DS) e diabético ooforectomizado sedentário (DOS). * p<0,05 vs. ES; # p<0,05 vs. EOS; † p<0,05 vs. DS.

Banda de baixa frequência da pressão arterial sistólica

Figura 22: Banda de baixa frequência da pressão arterial sistólica dos grupos euglicêmico sedentário (ES), euglicêmico ooforectomizado sedentário (EOS), diabético sedentário (DS) e diabético ooforectomizado sedentário (DOS). * $p < 0,05$ vs. ES; # $p < 0,05$ vs. EOS; † $p < 0,05$ vs. DS.

4.10. Mortalidade

A partir da indução do diabetes, durante as 8 semanas de acompanhamento, a mortalidade dos animais foi registrada para comparação entre os grupos, conforme a Figura 23. Nota-se maior mortalidade nos animais diabéticos (DS e DOS) do que nos euglicêmicos, sendo que as ratas diabéticas ooforectomizadas (DOS) morreram 14% a mais do que as controles (ES e EOS), enquanto o diabetes puro (DS) induziu uma mortalidade de 23% em relação às euglicêmicas.

Figura 23: Mortalidade dos grupos euglicêmico sedentário (ES), euglicêmico ooforectomizado sedentário (EOS), diabético sedentário (DS) e diabético ooforectomizado sedentário (DOS). * $p < 0,05$ vs. ES; # $p < 0,05$ vs. EOS; † $p < 0,05$ vs. DS.

PROTOCOLO 2

O objetivo do protocolo 2 foi padronizar um teste de carga máxima em escada para avaliação da carga máxima e prescrição de treinamento físico resistido para ratos. A seguir são apresentadas as etapas para a padronização do teste de carga máxima, bem como o protocolo de treinamento físico resistido elaborado a partir dos resultados do teste de carga máxima.

4.11. Teste de carga máxima (resistido dinâmico)

Na escalada inicial foi aplicada uma carga relativa a 75% do peso corporal do animal. Após completar a escalada carregando essa carga com sucesso, o animal descansava por 2 minutos antes de realizar a próxima subida, com um peso adicional de 30 gramas. Esse procedimento foi sucessivamente repetido até que o animal não conseguisse completar a escalada carregando o peso. Com base em estudos publicados sobre o treinamento de força em ratos (Silveira et al., 2011; Hornberger et al., 2004), para determinação da carga máxima, admitiu-se que os animais deviam realizar, no máximo, 6 escaladas, evitando, dessa forma, que a fadiga ocorresse devido ao número excessivo de escaladas, e não à carga propriamente dita.

A Figura X apresenta as concentrações de lactato sanguíneo durante o teste de carga máxima no grupo ES. A concentração de lactato foi constante nas 4 primeiras escaladas (75% do peso corporal, +30 gramas, +60 gramas, +90 gramas);

entretanto, foi observado um significativo incremento na 5ª escalada (+120 gramas), indicando a transição para o metabolismo predominantemente anaeróbico, o que possibilitou a identificação do limiar de lactato (LA, barra cinza na Figura 24).

Figura 24: Concentrações de lactato sanguíneo nas ratas euglicêmicas sedentária (ES) durante o teste de carga máxima (LA: limiar de lactato).

Devido às variações no valor de peso corporal entre os animais estudados, foi realizada uma normalização da carga máxima utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Carga máxima normalizada} = \left(\frac{\text{carga da última escalada completa}}{\text{peso corporal}} \right) \times 100$$

O teste de carga máxima foi realizado no início (1ª semana), no meio (4ª semana) e ao final do protocolo (8ª semana) em todos os grupos, com o objetivo de verificar a carga máxima dos animais, bem como para fornecer dados para a prescrição do treinamento físico resistido e/ou ajuste de carga durante (4ª semana) o treinamento (Protocolo 3).

Na 1ª semana, a carga máxima nos animais controles (ES) foi $128 \pm 5,9$ % do peso corporal. A carga máxima suportada pelos animais aumentou progressivamente na 4ª e 8ª semanas ($181 \pm 3,7$ % e $203 \pm 11,4$ de peso corporal, respectivamente) nos animais estudados (grupo ES). Vale ressaltar que, para manter o padrão estipulado de no máximo 6 escaladas durante o teste, o incremento de carga foi ajustado nos testes da 4ª e 8ª semanas de protocolo, sendo de 50 gramas e 100 gramas por escalada, respectivamente.

Os valores de carga máxima absoluta e normalizada foram reduzidos nos animais diabéticos ooforectomizados (DOS) em comparação com os animais controles (ES) (Figura 25). Essa redução de capacidade física foi acompanhada de redução na massa ventricular (14%), na massa do músculo plantar (36%) e sóleus (11%) (Figura 26).

4.12. Prescrição do treinamento físico resistido

A padronização do teste de carga máxima em escada para ratos teve importância fundamental neste estudo para possibilitar uma prescrição acurada do treinamento físico resistido no Protocolo 3. A prescrição do treinamento resistido foi realizada com base nos valores de carga máxima normalizados individualmente, e a carga de treino foi ajustada semanalmente, de acordo com as alterações de peso corporal de cada animal.

O protocolo de treinamento resistido foi realizado durante 8 semanas, 5 dias por semana, com intensidade moderada (40-60% da carga máxima normalizada), com 15 escaladas por sessão, com 1 minuto de descanso entre cada escalada.

Depois do teste intermediário (4ª semana), a prescrição foi ajustada de acordo com os novos valores obtidos no teste de carga máxima. O número de escaladas e o % de intensidade em cada dia do protocolo de treinamento resistido estão detalhados na Tabela 6.

Tabela 6. Prescrição detalhada do treinamento físico resistido.

1ª semana		2ª semana		3ª semana		4ª semana	
Número de escaladas*	% da carga máxima	Número de escaladas*	% da carga máxima	Número de escaladas*	% da carga máxima	Número de escaladas*	% da carga máxima
2	0	1	0	2	0	1	0
3	20%	1	20%	1	20%	1	20%
2	30%	4	30%	2	30%	1	30%
2	40%	3	40%	2	40%	2	40%
2	30%	4	30%	1	50%	2	50%
2	20%	1	20%	2	40%	2	40%
2	0	1	0	2	30%	2	30%
				1	20%	1	20%
				2	0	1	0
5ª semana		6ª semana		7ª semana		8ª semana	
Número de escaladas*	% da carga máxima	Número de escaladas*	% da carga máxima	Número de escaladas*	% da carga máxima	Número de escaladas*	% da carga máxima
1	0	1	0	2	0	1	0
1	20%	1	30%	2	40%	2	40%
2	30%	2	40%	3	50%	4	50%
2	40%	3	50%	3	60%	5	60%
3	50%	2	60%	3	50%	2	50%
2	40%	3	50%	1	40%	1	40%
2	30%	1	40%	1	0	1	0
1	20%	1	30%				
1	0	1	0				

* 1 minuto de descanso entre cada escalada

Os animais submetidos ao treinamento físico resistido (DOTR) apresentaram aumento da carga máxima quando comparados aos animais sedentários (ES e DOS) ao final da 4ª e da 8ª semanas do protocolo de treinamento resistido (Figura X). Embora o peso corporal, a massa do ventrículo esquerdo, do músculo sóleus e a glicemia não tenham sido diferente entre os grupos, os animais treinados (DOTR) apresentaram maior massa do músculo plantar quando comparados aos demais grupos (41% vs. ES e 89% vs. DOS) (Figura X).

Figura 25. Carga máxima (A) absoluta e (B) normalizada nos grupos euglicêmico sedentário (ES), diabético ooforectomizado sedentário (DOS) e diabético ooforectomizado submetido a treinamento físico resistido (DOTR). As cores claras representam os respectivos valores iniciais, e as listradas representam os respectivos valores intermediários. * $p < 0,05$ vs. ES; # $p < 0,05$ vs. DOS; † $p < 0,05$ vs. valores iniciais no mesmo grupo; ‡ $p < 0,05$ vs. valores intermediários no mesmo grupo.

Figura 26. (A) Massa do ventrículo esquerdo, (B) do músculo sóleus (C) e do músculo plantar nos grupos sedentário (ES), diabético ooforectomizado sedentário (DOS) e diabético ooforectomizado submetido a treinamento físico resistido (DOTR). * $p < 0.05$ vs. C; # $p < 0.05$ vs. DOS.

PROTOCOLO 3

O objetivo do protocolo 3 foi comparar os efeitos do treinamento físico (intensidade moderada) aeróbio dinâmico, resistido dinâmico, ou combinado (aeróbio + resistido) na capacidade de exercício e na carga máxima, bem como sobre parâmetros metabólicos, de morfometria e função cardíaca, hemodinâmicos e autonômicos em ratas ooforectomizadas diabéticas.

4.13. Peso Corporal

A Figura 27 ilustra o acompanhamento do peso corporal ao longo das 10 semanas de experimento.

No início do protocolo, quando os animais foram divididos em seus respectivos grupos para posterior realização da cirurgia de ooforectomia e da indução do diabetes por meio da injeção de estreptozotocina, o peso corporal foi semelhante entre os grupos. Nenhuma das modalidades de treinamento físico – aeróbio (DOTA), resistido (DOTR) ou combinado (DOTC) – influenciou no ganho de peso corporal dos animais ao longo do protocolo, sendo que não foram observadas diferenças entre os grupos no final do protocolo (Figura 28).

Figura 27: Peso corporal dos grupos diabéticos ooforectomizados sedentário (DOS), submetido ao treinamento físico aeróbio (DOTA), submetido ao treinamento físico resistido (DOTR) e submetido ao treinamento físico combinado (DOTC) ao longo do protocolo. O números no eixo x indicam as semanas de protocolo.

Peso corporal

Figura 28: Peso corporal dos grupos diabéticos ooforectomizados sedentário (DOS), submetido ao treinamento físico aeróbio (DOTA), submetido ao treinamento físico resistido (DOTR) e submetido ao treinamento físico combinado (DOTC) no início e ao final do protocolo. As cores claras representam os respectivos valores iniciais. * $p < 0,05$ vs. DOS; # $p < 0,05$ vs. DOTA; † $p < 0,05$ vs. DOTR; ¥ $p < 0,05$ vs. mesmo grupo no início.

4.14. Dosagem de estradiol plasmático

A dosagem de estradiol plasmático foi realizada nos grupos DOS, DOTA e DOTR. Não foi observada nenhuma diferença estatística entre os grupos (DOS: $7,19 \pm 2,44$; DOTA: $8,65 \pm 0,84$ e DOTR: $5,76 \pm 1,01$ pg/ml).

4.15. Glicemia

A Figura 29 apresenta os valores da glicemia dos animais, dosados 2 dias depois da indução do diabetes por estreptozotocina, após jejum de 4 horas, no início e ao final do protocolo.

Os grupos DOS, DOTR e DOTC apresentaram maiores valores de glicemia ao final do protocolo em comparação com seus valores iniciais. Nenhuma das modalidades de treinamento físico – aeróbio (DOTA), resistido (DOTR) ou combinado (DOTC) – alterou a glicemia dos animais, sendo que não foram observadas diferenças entre os grupos no final do protocolo (Figura 29).

Figura 29: Glicemia dos grupos diabéticos ooforectomizados sedentário (DOS), submetido ao treinamento físico aeróbio (DOTA), submetido ao treinamento físico resistido (DOTR) e submetido ao treinamento físico combinado (DOTC) no início e ao final do protocolo. As cores claras representam os respectivos valores iniciais. * $p < 0,05$ vs. DOS; # $p < 0,05$ vs. DOTA; † $p < 0,05$ vs. DOTR; ¥ $p < 0,05$ vs. mesmo grupo no início.

4.16. Teste de esforço máximo

A Figura 30 apresenta o tempo de corrida no teste de esforço máximo realizado em esteira no início e ao final do protocolo.

No início do protocolo não foram observadas diferenças entre os grupos. Os animais diabéticos ooforectomizados sedentários (DOS) e submetidos ao treinamento físico resistido (DOTR) apresentaram redução na capacidade de corrida ao final do protocolo em relação ao teste de esforço realizado no início do protocolo. Os grupos submetidos ao treinamento físico

aeróbio (DOTA) e combinado (DOTC) apresentaram maior tempo de corrida no teste de esforço máximo intermediário e ao final do protocolo, evidenciando a eficácia dos protocolos de treinamento físico prescritos.

Figura 30: Tempo máximo de corrida no teste de esforço máximo em esteira dos grupos diabéticos ooforectomizados sedentário (DOS), submetido ao treinamento físico aeróbio (DOTA), submetido ao treinamento físico resistido (DOTR) e submetido ao treinamento físico combinado (DOTC) no início e ao final do protocolo. As cores claras representam os respectivos valores iniciais, e as listradas representam os respectivos valores intermediários. * $p < 0,05$ vs. DOS; # $p < 0,05$ vs. DOTA; † $p < 0,05$ vs. DOTR; ¥ $p < 0,05$ vs. mesmo grupo no início; ‡ $p < 0,05$ vs. mesmo grupo intermediário.

4.17. Teste de carga máxima

A Figura 31 apresenta a carga máxima de subida normalizada pelo peso corporal no teste de carga máxima realizado na escada no início, no meio e ao final do protocolo.

Não foram observadas diferenças no desempenho neste teste no início do protocolo. Ao final do protocolo, todos os animais apresentaram ganho de força em relação aos seus valores iniciais, o que já era esperado devido ao ganho de peso e, conseqüentemente, aumento da massa muscular. Entretanto, os animais submetidos ao treinamento físico resistido (DOTR) e combinado (DOTC) apresentaram maior ganho de força do que os grupos que não realizaram o treinamento na escada (DOS e DOTA), evidenciando a eficácia dos protocolos de treinamento físico prescritos.

Figura 31: Peso máximo de subida normalizado pelo peso corporal no teste de carga máxima em escada dos grupos diabéticos ooforectomizados sedentário (DOS), submetido ao treinamento físico aeróbico (DOTA), submetido ao treinamento físico resistido (DOTR) e submetido ao treinamento físico combinado (DOTC) no início e ao final do protocolo. As cores claras representam os respectivos valores iniciais, e as listradas representam os respectivos valores intermediários. * $p < 0,05$ vs. DOS; # $p < 0,05$ vs. DOTA; † $p < 0,05$ vs. DOTR; ¥ $p < 0,05$ vs. mesmo grupo no início; ‡ $p < 0,05$ vs. mesmo grupo intermediário.

4.18. Avaliações ecocardiográficas

As avaliações ecocardiográficas foram realizadas em todos os animais ao final das 8 semanas de acompanhamento ou treinamento físico, antes das avaliações hemodinâmicas. No entanto, houve perda de alguns registros, dessa forma, nestas avaliações o número de animais por grupo foi reduzido (DOS n=4, DOTA n=6, DTOR n=4, DTOC n=4). Os resultados são apresentados a seguir.

4.18.1. Avaliação morfométrica cardíaca

Os parâmetros morfométricos do VE são apresentados na Tabela 7. A MVE foi maior em todos os animais treinados (vs. DOS). Os animais submetidos a treinamento físico resistido (DOTR) apresentaram maior hipertrofia do VE em relação aos treinados em outras modalidades (DOTA e DOTC). Os grupos que treinaram em esteira (DOTA e DOTC) apresentaram menor VEDIA e maior ERP quando comparados aos demais grupos estudados (DOS e DOTC).

Tabela 7. Parâmetros ecocardiográficos de morfometria cardíaca nos grupos diabéticos ooforectomizados sedentário (DOS), submetido ao treinamento físico aeróbio (DOTA), submetido ao treinamento físico resistido (DOTR) e submetido ao treinamento físico combinado (DOTC).

	DOS	DOTA	DOTR	DOTC
MVE (g)	0,97±0,01	1,05±0,04 *	1,12±0,06 *#	1,04±0,02 *†
VEDIA (cm)	0,72±0,01	0,68±0,02 *	0,75±0,01 #	0,65±0,01 *†
ERP	0,34±0,01	0,42±0,03 *	0,36±0,04	0,42±0,02 *

Dados representam média±erro padrão. MVE: massa do VE; VEDIA: cavidade do VE na diástole; ERP: espessura relativa da parede do VE. * p<0,05 vs. DOS; # p<0,05 vs. DOTA; † p<0,05 vs. DOTR.

4.18.2. Avaliações da função cardíaca

A Tabela 8 apresenta as avaliações da função cardíaca nos grupos estudados. Com relação à função sistólica, não foram observadas diferenças na FE e FE_{nc} entre os grupos. Os animais submetidos a treinamento físico resistido (DOTR) apresentaram redução no VEC em relação aos demais grupos estudados (DOS, DOTA e DOTC).

Com relação à função diastólica, o TRIV e o Desac E não foram diferentes entre os grupos estudados.

Tabela 8. Parâmetros ecocardiográficos de função cardíaca nos grupos diabéticos ooforectomizados sedentário (DOS), submetido ao treinamento físico aeróbio (DOTA), submetido ao treinamento físico resistido (DOTR) e submetido ao treinamento físico combinado (DOTC).

	DOS	DOTA	DOTR	DOTC
FE (%)	79±4	80±4	78±0,1	83±2
FEnc (%)	40±3	45±3	41±0,1	46±2
VEC (circ/seg)	0,0041±0,0001	0,0044±0,0002	0,0035±0,0001 *#	0,0042±0,0002 †
TRIV (ms)	30,2±1,53	27,3±0,95	27±0,00	28±1,73
Desac E (ms)	45±0,87	43±1,05	43,5±2,02	40±0,00

Dados representam média±erro padrão. FE: fração de ejeção; FEn: fração de encurtamento; VEC: velocidade de encurtamento; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; Desac E: desaceleração do pico E. * p<0,05 vs. DOS; # p<0,05 vs. DOTA; † p<0,05 vs. DOTR.

4.18.3. Avaliações da função global

O índice de desempenho miocárdio (IDM), que representa a função global do coração foi menor nos grupos treinados (DOTA, DOTR e DOTC) em comparação ao sedentário (DOS). Além disso, o grupo submetido ao treinamento físico combinado (aeróbio + resistido) apresentou menor IDM do que os grupos submetidos a apenas uma modalidade de treinamento (DOTA e DOTR) (Figura 32).

Figura 32: Índice de desempenho miocárdico nos grupos diabéticos ooforectomizados sedentário (DOS), submetido ao treinamento físico aeróbio (DOTA), submetido ao treinamento físico resistido (DOTR) e submetido ao treinamento físico combinado (DOTC* $p < 0,05$ vs. DOS; # $p < 0,05$ vs. DOTA; † $p < 0,05$ vs. DOTR).

4.19. Avaliações hemodinâmicas

Os parâmetros hemodinâmicos obtidos após a canulação e análise do registro de pressão arterial são apresentados na Tabela 9.

Conforme observado no protocolo 1, a associação de diabetes com a privação dos hormônios ovarianos promoveu hipotensão e bradicardia no grupo DOS em relação aos animais controles (ES). No protocolo 2, todas as modalidades de treinamento físico – aeróbio (DOTA), resistido (DOTR) ou combinado (DOTC) – promoveram aumento da pressão arterial sistólica e média (Figura 33) - sem alteração da pressão arterial diastólica em comparação ao grupo DOS. Houve aumento da frequência cardíaca nos animais treinados em relação ao grupo DOS (Figura 34).

Tabela 9. Parâmetros hemodinâmicos nos grupos diabéticos ooforectomizados sedentário (DOS), submetido ao treinamento físico aeróbio (DOTA), submetido ao treinamento físico resistido (DOTR) e submetido ao treinamento físico combinado (DOTC).

	DOS	DOTA	DOTR	DOTC
PAS (mmHg)	114±1,6	123±4,4*	121±3,5*	122±2,9*
PAD (mmHg)	90±2,1	98±3,6	97±3,6	96±3,0
PAM (mmHg)	102±1,6	111±2,0*	110±2,2*	109±2,7*
FC (bpm)	250±5,7	270±5,4*	270±5,7*	269±6,4*

Dados representam média±erro padrão. PAD: pressão arterial diastólica; PAS: pressão arterial sistólica; PAM: pressão arterial média; FC: frequência cardíaca. * p<0,05 vs. DOS; # p<0,05 vs. DOTA; † p<0,05 vs. DOTR

Figura 33: Pressão arterial média dos grupos diabéticos ooforectomizados sedentário (DOS), submetido ao treinamento físico aeróbio (DOTA), submetido ao treinamento físico resistido (DOTR) e submetido ao treinamento físico combinado (DOTC). * $p < 0,05$ vs. DOS; # $p < 0,05$ vs. DOTA; † $p < 0,05$ vs. DOTR.

Figura 34: Frequência cardíaca dos grupos diabéticos ooforectomizados sedentário (DOS), submetido ao treinamento físico aeróbio (DOTA), submetido ao treinamento físico resistido (DOTR) e submetido ao treinamento físico combinado (DOTC). * $p < 0,05$ vs. DOS; # $p < 0,05$ vs. DOTA; † $p < 0,05$ vs. DOTR.

4.20. Sensibilidade barorreflexa

A Figura 35 apresenta o índice de sensibilidade barorreflexa nos grupos estudados. Os grupos submetidos a treinamento físico aeróbio (DOTA e DOTC) apresentaram maior sensibilidade barorreflexa para respostas taquicárdicas do que os demais grupos estudados (DOS e DOTR) e para respostas bradicárdicas em relação ao grupo DOS. Não foram observadas diferenças nas respostas bradicárdicas entre os grupos.

Figura 35: Sensibilidade barorreflexa dos grupos diabéticos ooforectomizados sedentário (DOS), submetido ao treinamento físico aeróbio (DOTA), submetido ao treinamento físico resistido (DOTR) e submetido ao treinamento físico combinado (DOTC). * $p < 0,05$ vs. DOS; # $p < 0,05$ vs. DOTA; † $p < 0,05$ vs. DOTR.

4.21. Modulação autonômica cardiovascular

4.21.1. Variabilidade da frequência cardíaca

As avaliações da modulação autonômica da frequência cardíaca (FC) são apresentadas na Tabela 10.

4.21.1.1. Domínio do tempo

No domínio do tempo, o desvio padrão do intervalo de pulso (DP-IP) foi maior nos grupos treinados (DOTA, DOTR e DOTC) em relação aos animais sedentários (DOS). Não foram observadas diferenças no RMSSD entre os grupos. A variância do intervalo de pulso (VAR-IP) (Figura 36) foi maior nos animais treinados (DOTA, DOTR e DOTC) do que nos sedentários (DOS).

4.21.1.2. Domínio da frequência

No domínio da frequência, a banda de BF-IP (indicativa de modulação simpática) e AF-IP (representativa de modulação parassimpática), que se apresentava reduzida nos animais DOS em relação aos animais controles (ES) (protocolo 1), foram maiores nos animais diabéticos ooforectomizados treinados (DOTA, DOTR e DOTC) do que nos sedentários (DOS).

Tabela 10. Variabilidade da frequência cardíaca (FC) nos grupos diabéticos ooforectomizados sedentário (DOS), submetido ao treinamento físico aeróbio (DOTA), submetido ao treinamento físico resistido (DOTR) e submetido ao treinamento físico combinado (DOTC).

	DOS	DOTA	DOTR	DOTC
DP (ms)	5,57±0,21	9,04±0,57*	8,35±0,66*	8,88±0,39*
RMSSD (ms)	6,85±0,35	8,91±0,85	8,53±1,12	9,52±0,67
VAR-IP (ms²)	39,61±2,65	71,22±7,28*	70,97±12,10*	65,75±6,10*
BF-IP (ms²)	2,77±0,31	5,34±0,47*	7,33±0,7*	6,81±0,83*
AF-IP (ms²)	10,77±1,04	16,82±2,23*	18,71±5,26*	17,43±2,23*

Dados representam média±erro padrão. DP: desvio padrão do intervalo de pulso; RMSSD: raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre os intervalos R-R normais sucessivos; VAR-IP: variância do intervalo de pulso; BF: banda de baixa frequência do intervalo de pulso; AF: banda de alta frequência do intervalo de pulso. * p<0,05 vs. DOS; # p<0,05 vs. DOTA; † p<0,05 vs. DOTR.

Variância do intervalo de pulso

Figura 36: Variância do intervalo de pulso dos grupos diabéticos ooforectomizados sedentário (DOS), submetido ao treinamento físico aeróbio (DOTA), submetido ao treinamento físico resistido (DOTR) e submetido ao treinamento físico combinado (DOTC). * p<0,05 vs. DOS; # p<0,05 vs. DOTA; † p<0,05 vs. DOTR .

4.21.2. Variabilidade da pressão arterial sistólica

As avaliações da modulação autonômica da pressão arterial sistólica (PAS) são apresentadas na Tabela 11.

4.21.2.1. Domínio do tempo

O desvio padrão da pressão arterial sistólica (DP-PAS) foi maior em todos os animais treinados (DOTA, DOTR e DOTC) quando comparados aos sedentários (DOS). A variância da pressão arterial sistólica (VAR-PAS) (Figura 37), que se apresentava reduzida nos animais DOS em relação aos animais controles (ES) (protocolo 1), foi maior nos animais submetidos ao treinamento físico aeróbio (DOTA) e combinado (DOTC) do que nos sedentários (DOS) e submetidos ao treinamento físico resistido (DOTR).

4.21.2.2. Domínio da frequência

A banda de baixa frequência da PAS (BF-PAS) (Figura 38), que se apresentava reduzida nos animais DOS em relação aos animais controles (ES) (protocolo 1), foi maior nos animais submetidos ao treinamento físico aeróbio (DOTA) e combinado (DOTC) do que nos sedentários (DOS) e submetidos ao treinamento físico resistido (DOTR).

Tabela 11. Variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) nos grupos diabéticos ooforectomizados sedentário (DOS), submetido ao treinamento físico aeróbio (DOTA), submetido ao treinamento físico resistido (DOTR) e submetido ao treinamento físico combinado (DOTC).

	DOS	DOTA	DOTR	DOTC
DP-PAS (mmHg)	2,74±0,16	3,74±0,17*	3,22±0,27*	3,78±0,29*
VAR-PAS (mmHg²)	7,41±0,85	12,19±0,66*	8,60±0,89#	13,36±0,67*†
BF-PAS (mmHg²)	1,04±0,07	2,60±0,26*	1,21±0,21#	2,40±0,26*†

Dados representam média±erro padrão. DP-PAS: desvio padrão da pressão arterial sistólica; VAR-PAS: variância da pressão arterial sistólica; BF-PAS: banda de baixa frequência da pressão arterial sistólica. * p<0,05 vs. DOS; # p<0,05 vs. DOTA; † p<0,05 vs. DOTR.

Figura 37: Variância da pressão arterial sistólica dos grupos diabéticos ooforectomizados sedentário (DOS), submetido ao treinamento físico aeróbio (DOTA), submetido ao treinamento físico resistido (DOTR) e submetido ao treinamento físico combinado (DOTC). * p<0,05 vs. DOS; # p<0,05 vs. DOTA; † p<0,05 vs. DOTR.

Figura 38: Banda de baixa frequência da pressão arterial sistólica dos grupos diabéticos ooforectomizados sedentário (DOS), submetido ao treinamento físico aeróbio (DOTA), submetido ao treinamento físico resistido (DOTR) e submetido ao treinamento físico combinado (DOTC). * $p < 0,05$ vs. DOS; # $p < 0,05$ vs. DOTA; † $p < 0,05$ vs. DOTR.

4.22. Mortalidade

A mortalidade foi avaliada desde a indução do diabetes até o final das 8 semanas de acompanhamento ou treinamento físico. Nenhum animal submetido a treinamento físico morreu durante o protocolo, enquanto os sedentários apresentaram 14% de mortalidade (Figura 39).

Figura 39: Mortalidade entre os grupos diabéticos ooforectomizados sedentário (DOS), submetido ao treinamento físico aeróbio (DOTA), submetido ao treinamento físico resistido (DOTR) e submetido ao treinamento físico combinado (DOTC).

Discussão

5. DISCUSSÃO

PROTOCOLO 1

O objetivo do protocolo 1 foi avaliar em ratas fêmeas os efeitos metabólicos, cardiovasculares e autonômicos e na mortalidade da privação dos hormônios ovarianos na presença ou não de diabetes induzido por STZ. Os resultados deste protocolo evidenciam alguns achados comuns em nosso grupo e na literatura como: o aumento de peso corporal após a ooforectomia e a redução do peso nos animais diabéticos; a redução no desempenho no teste de corrida nos grupos diabéticos; o aumento da pressão arterial após a ooforectomia associada a prejuízo na sensibilidade barorreflexa; a redução da pressão arterial e da frequência cardíaca associada a disfunção autonômica nos animais diabéticos; e maior mortalidade em animais diabéticos em relação à euglicêmicos. No entanto, a associação de diabetes com ooforectomia (DOS vs. DS) exacerbou algumas disfunções que merecem **considerações importantes**, como o aumento adicional da glicemia e do IDM e a redução adicional do VEC e da frequência cardíaca, que serão discutidas a seguir. Além disto, alguns achados originais foram obtidos como: a redução na carga máxima dos animais diabéticos ao final do protocolo; a inalteração da função cardíaca após a privação dos hormônios ovarianos em ratas euglicêmicas no tempo avaliado; o prejuízo em parâmetros de morfometria e função cardíaca e maior mortalidade nas fêmeas STZ que já havia sido observado em machos

STZ; e o prejuízo na VFC e VPA nos grupos OS, DS e DOS em relação ao grupo ES.

A menopausa tem sido associada a prejuízo na capacidade de exercício, força muscular (sarcopenia), densidade mineral óssea, bem como aumento no peso corporal, na prevalência de diabetes tipo 2, osteoporose, e doenças cardiovasculares (Sowers 1998; Mosca et al., 2007). Para estudo das alterações decorrentes da privação dos hormônios ovarianos, cientificamente tem se utilizado o modelo experimental induzido através da ooforectomia, mimetizando o *status* da menopausa devido à supressão dos níveis de hormônios sexuais (Irigoyen et al., 2005; Flues et al., 2010; Hernandez et al. 2000, Latour et al., 2001).

A interação entre os hormônios sexuais ovarianos e o **ganho ponderal** vem sendo avaliada rotineiramente (Fisher et al., 2000, Geary et al., 1999). No presente trabalho, o grupo de ratas euglicêmicas ooforectomizadas (EOS) apresentou maior ganho de peso corporal quando comparadas às euglicêmicas controles (ES). Vários autores descreveram ganho ponderal em animais ooforectomizados (Fisher et al., 2000, Geary et al., 1999, Szabo et al., 2000). O ganho ponderal pós-ooforectomia pode estar relacionado com a supressão dos hormônios ovarianos, tendo em vista que o estrogênio aumenta o consumo energético e, como consequência, diminui o peso corporal (Shimomura et al., 2002, Guyard et al., 2001). O estrogênio é capaz de manter a distribuição de gordura corporal no período pós-puberal e sua

deficiência eleva o depósito adiposo visceral com aumento da relação cintura-quadril, características andróides (Ley et al., 1992).

Atualmente, sabe-se que após o climatério ocorre aumento da gordura corporal e queda do metabolismo basal em mulheres quando comparadas a homens (Davis & Buerger 1996). Vale salientar que o aumento do tecido adiposo *per se* pode contribuir para o desenvolvimento da hipertensão, já que os adipócitos são capazes de produzir angiotensinogênio (Frederich, 1992), catepsinas D e G (envolvidas na síntese de angiotensina II) (Karlsson, 1998), inibidor do ativador do plasminogênio 1 (fator pró-trombótico) (Lundgren, 1996), e fator de necrose tumoral (marcador de risco cardiovascular elevado) (Samad, 1999). O ganho de peso após a menopausa tem sido apontado como um importante fator de risco para o desenvolvimento de diabetes, hipertensão, e doenças cardiovasculares (Agras et al., 1996, Mosca et al., 2007).

De fato, muitos estudos demonstram que a privação dos hormônios ovarianos está relacionada ao aumento da pressão arterial em mulheres após a menopausa (Staessens et al., 1989; Staessen et al., 1997). No presente estudo, as ratas euglicêmicas ooforectomizadas (EOS) apresentaram elevação da pressão arterial em relação às controles. Outros estudos relataram maior pressão arterial em fêmeas ooforectomizadas comparadas tanto a machos quanto a fêmeas controles (Flores et al., 2010; Souza et al., 2007; Sanches et al., 2009; Hernandez et al., 2000; Flues et al., 2010).

Algumas doenças cardiovasculares, como a hipertensão, têm sido associadas à diminuição do controle autonômico da circulação, com prejuízo na sensibilidade do barorreflexo e na modulação autonômica cardiovascular (Irigoyen et al., 2003). A eficiência dos barorreceptores como mecanismo regulador da pressão arterial em curto prazo contribui para a manutenção dos níveis pressóricos dentro da faixa de normalidade, embora não se saiba exatamente o que é causa e o que é efeito na relação entre aumento da pressão arterial e redução da sensibilidade do barorreflexo. Corroborando com essas informações, as ratas ooforectomizadas do presente estudo (EOS) apresentaram redução na sensibilidade desse reflexo para respostas taquicárdicas em relação às controles (ES), acompanhado de aumento da pressão arterial.

Além disso, existem evidências de que alterações na razão estrógeno/andrógeno, favorecendo o aumento de andrógenos, ativação do sistema renina-angiotensina e sistemas de endotelina, ativação do sistema nervoso simpático, síndrome metabólica e obesidade, inflamação, aumento eicosanóides vasoconstritores, e ansiedade e depressão podem ser importantes na patogênese da hipertensão na mulher após a menopausa (Yanes & Reckelhoff, 2011). No presente estudo, observamos redução da variância do IP, associado a aumento da variância da PAS e das bandas BF do IP e da PAS, evidenciando maior modulação simpática cardiovascular nas ratas euglicêmicas ooforectomizadas. Flues et al. (2010) haviam demonstrado, utilizando o mesmo tempo de ooforectomia, prejuízo na sensibilidade

barorreflexa associada à aumento do tônus simpático e redução do tônus vagal cardíaco após a privação dos hormônios ovarianos.

Em paralelo, estudos *in vitro* também mostraram que o estrógeno exerce importante proteção vascular pelo seu efeito na estimulação de produção de óxido nítrico (Rahimian, 20004) em artérias e arteríolas (Nekooeian, 1998; Pelligruino, 2000). É possível, portanto, que a ausência desses mecanismos vasodilatadores tenha contribuído para o aumento da pressão arterial observado nas ratas do grupo EOS.

No presente estudo, realizamos a associação da privação dos hormônios ovarianos ao diabetes experimental induzido através de injeção de estreptozotocina (STZ). A STZ destrói as células β pancreáticas, resultando em deficiência na secreção de insulina. Esse modelo de diabetes tem sido amplamente utilizado na literatura para o estudo da relação entre diabetes e disfunção autonômica cardiovascular (De Angelis et al., 2009). Ratos diabéticos por STZ apresentam muitas das alterações decorrentes do diabetes descompensado em humanos diabéticos do tipo 1, como hiperglicemia, hipoinsulinemia, glicosúria e perda de peso (Junod et al., 1969; Tomlinson et al., 1992; De Angelis 2002).

Interessantemente, a **glicemia** ao final do protocolo foi maior no grupo de ratas diabéticas ooforectomizadas (DOS) do que no grupo somente com diabetes (DS), sugerindo que a privação dos hormônios ovarianos influencie no metabolismo da glicose em ratas diabéticas (Souza et al., 2007; Asikainen et al., 2004, Hernandez et al., 2000). Embora a atividade simpática

desempenhe um importante papel na homeostasia da glicose (Saccia et al., 1980), a banda de BF-IP (modulação simpática cardíaca) e da BF-PAS (modulação simpática vascular) apresentou-se reduzida nesses animais, sugerindo que esse aumento adicional da glicemia possa estar associado com descargas simpáticas específicas a outros tecidos (Souza et al., 2007).

Além disso, a menopausa é uma fase que está associada com redução da resposta da insulina pancreática à glicose (Goldslan, 2005). Considerando que a estreptozotocina provoca destruição parcial das células β pancreáticas e, por isso, os animais conseguem sobreviver mesmo sem a necessidade de insulina exógena, é plausível hipotetizar que a resposta reduzida da insulina à glicose na privação dos hormônios ovarianos tenha provocado um aumento adicional da glicose no grupo diabético ooforectomizado (DOS) em relação ao somente diabético (DS). Somado a isso, camundongos ooforectomizados apresentaram redução na produção de insulina, que foi revertida pela administração de estrogênio (El Seifi, 1981). Houssay e colaboradores (1954), utilizando um modelo de diabetes com ratos parcialmente pancreatomizados, mostraram que o estrogênio minimizou a evolução do diabetes, reforçando a relação entre os hormônios sexuais femininos e a resposta da insulina, bem como sua produção.

Os animais diabéticos por STZ frequentemente apresentam redução na **capacidade de exercício**, como corroborado neste estudo pelo menor desempenho dos grupos diabéticos ooforectomizados (DOS) ou não (DS) nos testes de esforço aeróbio (na esteira) e resistido (na escada).

Recentemente, nosso grupo demonstrou uma correlação estatisticamente significativa ($r=0,83$) entre consumo de oxigênio e velocidade de corrida no teste de esforço em ratos sedentários (Rodrigues et al., 2007), utilizando o mesmo protocolo de incrementos de velocidade em esteira ergométrica utilizado neste estudo. As alterações metabólicas decorrentes do diabetes por STZ frequentemente vem acompanhadas de anormalidades na função miocárdica (Fein et al., 1980, De Blieux et al., 1993), o que pode estar relacionado com a redução na capacidade de exercício. De Blieux et al (1993) demonstraram uma leve redução no débito cardíaco em ratos diabéticos. Além disto, redução no desempenho miocárdico já foi demonstrada por muitos autores (Makino et al. 1987, Rodrigues et al., 1990) sendo correlacionada com a depressão da ATPase da miosina e redução do cálcio no retículo sarcoplasmático (Blieux et al., 1993). De fato, no presente estudo observamos prejuízo tanto em parâmetros morfométricos como de função cardíaca.

Com relação aos **parâmetros cardiovasculares**, ratos diabéticos por STZ apresentam nenhuma alteração ou redução na pressão arterial (Maeda et al., 1995a,b; De Angelis et al., 2000; Dall'Ago et al., 1997; Chang and Lund, 1986; Tomlinson et al., 1990; Harthmann et al., 2007; Souza et al., 2007). De fato, no presente estudo os grupos de ratas diabéticas (DS e DOS) apresentaram redução na pressão arterial, que foi associada a uma menor

VAR-PAS e menor banda de BF-PAS em relação aos animais euglicêmicos (ES e EOS).

Considerando que a pressão arterial sistólica reflete a capacidade de trabalho cardíaco, como sugerido por Yu & McNeill (1992), o aumento do índice de desempenho miocárdico (caracterizando um maior esforço da bomba cardíaca) observado nos grupos diabéticos (vs. ES e EOS) pode ser um mecanismo compensatório a redução na pressão arterial observada nos animais diabéticos (DS e DOS) na tentativa de manter as funções sistólica e diastólica, conforme anteriormente observado por nosso grupo em ratos machos com 30 dias de diabetes (Wichi et al., 2007). O diabetes experimental por estreptozotocina tem sido associado com disfunção ventricular, incluindo redução de contratilidade, diminuição da complacência ventricular e aumento da pressão diastólica final (PDF) (Fein et al., 1980; De Angelis et al., 2000b; Dobrzynski et al., 2002; Akula et al., 2003). Esses estudos foram realizados *in vitro* em corações isolados, o que exigiu o sacrifício dos animais e a remoção dos reflexos autonômicos e do suprimento vascular. Joffe e colaboradores (1999) mostraram *in vivo* reduzidos picos de pressão sistólica ventricular e aumento na PDF, bem como atenuação das derivadas de contração (+dP/dt) e relaxamento (-dP/dt) em ratos com 75 dias de diabetes. Em nosso laboratório, corações isolados de ratos com 11 semanas de diabetes mostraram reduzida contratilidade quando comparados com o grupo controle (De Angelis et al., 2000b).

Em nosso estudo, apesar a FE e da FEnc estarem mantidas nos animais diabéticos (DS e DOS), houve redução na velocidade de encurtamento do ventrículo esquerdo e aumento no tempo de relaxamento isovolumétrico nesses grupos, evidenciando disfunção sistólica e diastólica na bomba cardíaca. De fato, dados do nosso grupo demonstraram redução do débito cardíaco em ratos diabéticos por STZ (15 dias de duração) (Gama, De Angelis, Harthmann, Irigoyen & Farah, 2002) a qual está provavelmente relacionada à redução da frequência cardíaca e da contratilidade miocárdica observada no diabetes por STZ (Dall'Ago et al., 1997; De Angelis et al., 2000; Maeda et al., 1995a; 1995b). Além disto, Wichi et al. (2007) avaliando ratos machos diabéticos por STZ demonstraram disfunção sistólica e diastólica cardíaca tanto pelo ecocardiograma quanto pela medida direta da função através da cateterização do VE, além de alterações na morfometria cardíaca semelhantes as observadas em no presente estudo. Neste aspecto, os grupos diabéticos (DS e DOS) apresentaram redução da espessura relativa do VE e da massa da VE associada a aumento do VE (VEDIA) em diástole, indícios da cardiomiopatia diabética. Joffe et al. (1999) demonstraram não só dilatação do VE, mas também aumento da massa do VE após 75 dias de diabetes por STZ em ratos machos. Além disto, Dobrzynski et al. (2002) observaram redução no peso do coração, na massa do VE associado a prejuízos nas funções cardíaca e renal após 21 dias de diabetes por STZ.

Jackson e Carrier (1983) sugerem que a hipotensão em ratos diabéticos sedentários pode ser resultado de um débito cardíaco diminuído devido à hipovolemia causada por diurese osmótica hiperglicêmica. Cohen, McCarthy e

Rosseti (1986) observaram que esses animais são poliúricos com alto fluxo urinário, refletindo o efeito diurético osmótico da glicose.

A **bradicardia** de repouso é uma alteração muito comum do diabetes por STZ (Maeda et al., 1995a; De Angelis et al., 2000, 2002; Senges et al., 1980; Chang and Lund, 1986; Tomlinson et al., 1990; Harthmann et al., 2007; Souza et al., 2007; Wichi et al., 2007; Gurley et al., 2006). No presente estudo, as ratas diabéticas (DS e DOS) apresentaram redução da frequência cardíaca, sendo que a associação de diabetes com a privação dos hormônios ovarianos resultou em uma redução adicional da frequência cardíaca (DOS vs. DS). Entretanto, não observamos alterações estatisticamente significantes na VAR-IP e nas bandas de BF-IP e AF-IP entre as ratas diabéticas (DOS vs. DS), sugerindo que essas alterações adicionais na FC do grupo DOS não sejam decorrentes de mudanças na modulação autonômica cardíaca. De fato, a redução na frequência cardíaca nos animais diabéticos por STZ tem sido associada a alterações na frequência cardíaca intrínseca (FCI) (Dall'Ago et al., 1997; Maeda et al., 1995a; 1995b; Souza et al., 2007). Considerando a necessidade de transporte de glicose no marcapasso cardíaco, é possível hipotetizar que o aumento da glicemia nas ratas diabéticas ooforectomizadas possa indicar um prejuízo ainda maior no transporte de substrato para essas células, induzindo redução adicional da FCI e consequentemente da FC basal nesse grupo.

A neuropatia autonômica é uma complicação frequente do diabetes, associada com alta morbidade e mortalidade em pacientes sintomáticos

(Ewing, 1980), que afeta a modulação do nodo sinusal, reduzindo a variabilidade da frequência cardíaca. Fazan et al. (1997) demonstraram redução na variabilidade da frequência cardíaca em ratos diabéticos por STZ, associada com reduções na banda de BF-IP e de AF-IP. De fato, no presente trabalho as ratas diabéticas (DS e DOS) apresentaram redução na VAR-IP e nas bandas de BF-IP e AF-IP. Com relação à variabilidade da pressão arterial sistólica, corroborando dados de outros estudos que demonstraram redução na variabilidade da PAS em ratos diabéticos por STZ (Schaan et al., 2004; Farah et al., 2007a; Mostarda et al., 2009), no presente estudo, observamos redução exacerbada da VAR-PAS e da banda de BF-PAS nas ratas diabéticas (DS e DOS).

A maior mortalidade observada nos animais diabéticos (vs. ES e EOS) pode estar relacionada a alterações no controle cardiovascular, incluindo atenuação do controle reflexo autonômico levando a hipotensão ortostática, infarto do miocárdio não acompanhado de sensação dolorosa e morta súbita (Page & Watkins, 1978). De fato, os grupos diabéticos (DS e DOS) apresentaram menor sensibilidade barorreflexa, tanto para respostas taquicárdicas quanto para bradicárdicas, em relação aos animais controles (ES), associada a prejuízo na VFC e na VPA, reforçando a disfunção autonômica presente nesse modelo. O prejuízo na sensibilidade barorreflexa tem sido demonstrado em ratos machos diabéticos (Maeda et al., 1995; De Angelis et al., 2002) e fêmeas diabéticas ooforectomizadas (Souza et al., 2007). A menor habilidade para modular adequadamente a frequência cardíaca durante mudanças de pressão arterial tem sido atribuída a algumas alterações na

atividade cardíaca parassimpática (Maeda et al., 1995; De Angelis et al., 2000);
entretanto, mudanças na função dos receptores atriais muscarínicos (Carrier
et al., 1987) ou na mediação central do reflexo barorreceptor não podem ser
excluídas (Fazan et al., 1995).

PROTOCOLO 2

O objetivo do protocolo 2 foi padronizar um teste de carga máxima em escada para avaliação da carga máxima e para prescrição de treinamento físico resistido para ratos. A padronização do teste de carga máxima possibilitou a avaliação da capacidade física dos animais nos demais protocolos deste estudo (protocolos 1 e 3), bem como serviu de base para a prescrição e ajuste de carga no treinamento resistido utilizado no protocolo 3. A padronização desse teste pode ser de grande valia para a comunidade científica, contribuindo para a prescrição mais precisa do treinamento físico em escada, elucidando os efeitos dessa abordagem em inúmeras situações experimentais. Os resultados são discutidos a seguir.

Os efeitos do treinamento físico aeróbio têm sido amplamente investigados em várias situações fisiológicas (envelhecimento, menopausa) e patológicas (diabetes, hipertensão). Entretanto, nos últimos anos, a comunidade científica tem voltado sua atenção para os efeitos do treinamento físico resistido, devido à sua fácil acessibilidade e grande aceitação pela população, particularmente em academias e programas de incentivo à prática de atividade física.

Diferentemente do treinamento aeróbio, a prescrição do treinamento resistido permite a modulação de vários parâmetros, como número de repetições, quantidade de séries, intensidade da carga, e tempo de intervalo entre uma série e outra (Kraemer et al., 2004). As possíveis combinações dessas variáveis alteram os efeitos fisiológicos agudos e crônicos do treinamento resistido, dificultando o uso desse tipo de exercício para populações de risco.

Entretanto, diretrizes internacionais têm sugerido cada vez mais o treinamento físico resistido como uma importante conduta não farmacológica na prevenção e/ou atenuação de vários fatores de risco para doenças metabólicas e cardiovasculares (Pollock et al., 2000; Williams et al., 2007; Williams et al., 2011).

Nesse contexto, a pesquisa básica busca elucidar os mecanismos envolvidos nos efeitos do treinamento físico resistido sobre os fatores de risco metabólicos e cardiovasculares, especialmente em situações em que o estudo não pode ser conduzido em humanos, por dificuldades éticas ou práticas. De fato, o número de estudos envolvendo os efeitos dessa modalidade de treinamento em modelos experimentais tem crescido expressivamente nos últimos anos (Barauna et al., 2007; Krisan et al., 2004; Nilsson et al., 2010; Pereira et al., 2010). Entretanto, a prescrição do treinamento resistido para modelos experimentais normalmente não é baseada em parâmetros individuais de capacidade física, mas em outros protocolos que calculam a carga de treino com base no peso corporal do animal estudado.

Nosso grupo tem investigado extensivamente os efeitos do treinamento físico aeróbio em vários modelos experimentais de doenças - ratos e camundongos - tendo demonstrado uma correlação entre consumo máximo de oxigênio ($VO_{2máx}$) e a velocidade máxima de corrida no teste de esforço aeróbio em esteira, o qual é utilizado para a prescrição do protocolo de treinamento aeróbio (Rodrigues et al., 2007).

Pensando nisso, nós desenvolvemos um teste de carga máxima em escada que segue os mesmos princípios do teste de esforço máximo em esteira. O teste de

carga máxima é realizado na escada de treinamento para ratos, e começa com uma escalada com carga relativa ao peso corporal (75%), garantindo a uniformidade do esforço entre todos os animais durante o teste. Após um período de descanso de 2 minutos, um acréscimo de 30 gramas é fixado ao suporte na cauda do animal. Nenhum alimento ou estimulação elétrica é oferecido como recompensa. É importante ressaltar que o teste não pode exceder 6 escaladas, pois o número excessivo de escaladas pode influenciar a fadiga do animal.

Nesse sentido, vale destacar que, dependendo da idade, peso, patologia associada, ou condição física do animal, o incremento de carga provavelmente deve ser ajustado para assegurar que o teste não exceda 6 escaladas. No presente estudo, para manter o padrão de no máximo 6 escaladas durante o teste de carga máxima, o incremento de carga foi ajustado nos testes intermediário (4ª semana) e final (8ª semana) em 50 gramas e 100 gramas, respectivamente. Esse ajuste foi necessário devido ao crescimento dos animais e, consequentemente, o ganho de massa muscular que resultou num aumento natural da força muscular. Da mesma forma, o envelhecimento induz uma redução de força (Narici et al., 2010) e um estudo piloto (dados não publicados) realizado pelo nosso grupo demonstrou que ratas idosas foram incapazes de realizar o teste com o incremento de 30 gramas (como proposto no teste de carga máxima inicial neste estudo), sendo necessário um ajuste para 15 gramas de incremento a cada escalada.

No presente estudo, foi possível demonstrar que os animais que realizaram a padronização do teste de carga máxima atingiram cargas acima do limiar de lactato, demonstrando uma carga máxima reduzida nas ratas diabéticas

ooforectomizadas sedentárias (DOS vs. ES), e um aumento nesse parâmetro nas ratas diabéticas ooforectomizadas submetidas a treinamento resistido (DOTR), conforme previamente observado em estudos clínicos com pacientes diabéticos do tipo 2 (Ibañez et al., 2005).

A prescrição do treinamento físico resistido foi baseada na intensidade entre 40-60% da carga máxima obtida no teste de carga máxima. Considerando-se que os efeitos do treinamento resistido não estão bem elucidados como os do aeróbio, e que os animais utilizados neste estudo apresentavam complicações relacionadas ao diabetes, a intensidade do treinamento físico foi calculada de acordo com o proposto por Williams e colaboradores (2007) para pessoas com fatores de risco cardiovascular (60% da carga máxima). Durante 8 semanas, os animais realizaram 15 escaladas por dia (5 dias por semana), com 1 minuto de repouso entre cada subida. No final da 4ª semana de protocolo, o teste de carga máxima foi repetido para possibilitar ajustes na prescrição da carga de treinamento para as semanas subsequentes. No final do protocolo (8ª semana), o teste de carga máxima foi novamente realizado para possibilitar comparações de desempenho entre os grupos. De fato, os animais diabéticos ooforectomizados submetidos ao treinamento resistido (DOTR) apresentaram maior carga máxima do que os grupos sedentários (ES e DOS), confirmando a eficácia do protocolo prescrito, bem como o sucesso da utilização do teste de carga máxima para a prescrição do treinamento.

Além disso, o protocolo de treinamento resistido de intensidade moderada utilizado no presente estudo induziu uma atenuação da miopatia diabética, como demonstrado pelo aumento da massa do músculo plantar no grupo DOTR (89% vs.

DOS e 41% vs. ES). Essa alteração pode ser específica do tipo de fibra muscular, uma vez que essa melhora foi observada no músculo plantar (predominância de fibras do tipo II) e não no músculo sóleus (predominância de fibras do tipo I) em nosso estudo (Fry, 2004). Por outro lado, ratas ooforectomizadas euglicêmicas submetidas a treinamento físico resistido de maior intensidade em escada durante 12 semanas (3 dias por semana; com 4-8 subidas) apresentaram aumento do conteúdo de glicogênio muscular e hepático associado a aumento da área de secção transversa do músculo soleus (Prestes et al., 2012).

PROTOCOLO 3

O objetivo do protocolo 3 foi avaliar em ratas fêmeas ooforectomizadas diabéticas os efeitos metabólicos, cardiovasculares e autonômicos do treinamento físico dinâmico aeróbio, resistido ou combinado (aeróbio + resistido). Os resultados deste trabalho corroboram alguns dados já demonstrados na literatura, como os efeitos do treinamento físico aeróbio; enquanto outros achados são inéditos, como **comparação das modalidades de treinamento físico** (aeróbio, resistido ou combinado). Vale ressaltar que, para a realização deste protocolo, foi necessária a **padronização de um teste de esforço em escada** (teste de carga máxima), a partir do qual foi realizada a prescrição do treinamento físico resistido e combinado.

Embora não tenham sido observadas diferenças na **glicemia** entre os grupos estudados no protocolo 3, vale lembrar que existem evidências de que o treinamento físico melhore a homeostase da glicose, reduzindo a razão glicose/insulina e aumentando a sensibilidade à insulina (De Angelis et al., 1997; De Angelis et al., 1999). Além disso, o exercício físico não apenas atenua a redução nos transportadores de glicose (GLUT 4) no miocárdio, como também aumenta a concentração de GLUT 4 na membrana muscular em ratos diabéticos (Osborn, 1997; Hall, 1995), favorecendo a captação de glicose. Existem também evidências de que outros mecanismos envolvendo componentes autócrinos e parácrinos para ativação do transporte de glicose – como o óxido nítrico, a calicreína e a adenosina – sejam ativados durante o exercício físico, melhorando a captação de glicose no indivíduo diabético, independente da insulina (Schwartz, 1990; Balon, 1996).

Todavia, é importante destacar que este é um modelo que se aproxima mais do diabetes do tipo I no qual é consenso que o treinamento físico aeróbio não modifica o controle glicêmico. Além disto, há evidências de nosso grupo que o treinamento físico aeróbio em esteira não modifica a glicemia em animais diabéticos por STZ machos (De Angelis et al., 2000) ou fêmeas ooforectomizadas (Souza et al., 2007).

Os animais diabéticos ooforectomizados submetidos ao treinamento físico aeróbio (DOTA) ou combinado (DOTC) apresentaram maior **tempo de corrida no teste de esforço** realizado na esteira do que os demais grupos (DOS e DOTR). Além disso, os animais sedentários (DOS) e os submetidos ao treinamento físico resistido (DOTR) apresentaram redução no tempo de corrida nesse teste de esforço em relação aos seus valores iniciais, evidenciando perda na capacidade de exercício após a indução do diabetes por STZ – já que resultado semelhante foi observado no grupo somente diabético (DS) no protocolo 1.

Com relação ao exercício desempenhado na escada, todos os animais apresentaram ganho de força durante o protocolo, o que já era esperado devido ao crescimento ao longo das semanas e, conseqüentemente, aumento da massa muscular, resultando em uma maior capacidade de gerar força. Vale ressaltar que os animais submetidos ao treinamento físico resistido (DOTR) ou combinado (DOTC) conseguiram **escalar com cargas maiores** do que os demais grupos (DOS e DOTA), evidenciando a eficácia da prescrição baseada no teste de carga máxima padronizado no presente estudo.

É interessante notar que os animais submetidos ao treinamento físico combinado (DOTC), realizado em dias alternados na esteira e na escada,

apresentaram aumento tanto da capacidade de corrida, quanto na carga máxima de escalada, o que poderia representar um ganho adicional em termos de qualidade de vida se comprovado em estudos clínicos futuros. Recentemente, Reid e colaboradores (2010) realizaram um estudo randomizado e controlado em diabéticos do tipo 2 comparando os efeitos do treinamento aeróbio, resistido ou combinado e evidenciaram que o treinamento físico resistido ou combinado melhoraram parâmetros relacionados a saúde mental dos pacientes, mas nenhuma das abordagens alterou parâmetros de bem-estar dos pacientes.

Apesar dos diferentes estímulos fisiológicos causados pelas diferentes modalidades de treinamento, o comportamento das **variáveis hemodinâmicas** foi semelhante entre os grupos treinados. Conforme observado no protocolo 1, a associação de diabetes com a privação dos hormônios ovarianos promoveu hipotensão e bradicardia no grupo DOS em relação aos animais controles (ES). No protocolo 3, todas as modalidades de treinamento físico – aeróbio (DOTA), resistido (DOTR) ou combinado (DOTC) – promoveram aumento da pressão arterial, revertendo a hipotensão, e aumento da frequência cardíaca, revertendo a bradicardia, nos animais treinados (vs. DOS).

Neste aspecto é importante lembrar que ratos machos diabéticos apresentam redução da função cardíaca sistólica e diastólica e do débito cardíaco (De Blieux, 1993; Wichi et al., 2007), o que pode afetar diretamente os valores de pressão arterial. Por outro lado, existem evidências que o treinamento físico aeróbio normaliza a pressão arterial de animais diabéticos (Souza et al., 2007; De Angelis et al., 2000; Harthmann et al., 2007; Mostarda et al., 2009), sugerindo que a

melhora seja mediada por aumento do débito cardíaco associado à melhora da função cardíaca (De Angelis et al., 2000) ou mesmo melhora na regulação autonômica cardíaca (Souza et al., 2007; Harthmann et al., 2007).

Com relação à morfometria e função cardíaca, as avaliações ecocardiográficas no presente estudo colaboram na compreensão dos mecanismos envolvidos na normalização da pressão arterial após os diferentes tipos de treinamento físico. De fato, observou-se melhora discreta das funções sistólica (DOTA e DTOC) e diastólica (DTOA, DTOC e DTOR) nos animais treinados, sem diferenças estatísticas em relação ao grupo DOS, o que refletiu na redução no IDM, um importante índice de função global cardíaca, que quando reduzido indica menor esforço miocárdico. Quando comparamos os efeitos das três modalidades de treinamento, o grupo submetido a treinamento combinado (aeróbico + resistido) apresentou menor índice de desempenho miocárdico do que os demais grupos estudados, refletindo em um menor esforço da bomba cardíaca para desempenhar sua função. Provavelmente, os distintos efeitos sobre a morfometria e função cardíacas decorrentes das distintas sobrecargas ao coração proporcionadas pelo treinamento aeróbico ou resistido, quando combinadas em dias alternados durante o protocolo de treinamento, resultaram em uma aumento global da função cardíaca no grupo DOTC em relação aos demais animais estudados. Tais achados sugerem que a melhora na função cardíaca evidenciada pelo IDM possa estar associada à normalização da PA nos animais treinados. Os mecanismos responsáveis pela melhora da bomba cardíaca podem ser a melhora da regulação autonômica cardíaca, alterações na morfometria e nos mecanismos moleculares de contração.

Com relação aos parâmetros morfométricos, os animais submetidos a treinamento aeróbio (DOTA e DOTC) apresentaram redução da cavidade do ventrículo esquerdo na diástole associada a aumento da espessura relativa de parede, resultando em um aumento na massa do ventrículo esquerdo em relação ao grupo DOS, o que pode ser interpretado como uma normalização em relação aos grupos euglicêmicos. Por outro lado, os animais submetidos a treinamento físico resistido (DOTR) apresentaram aumento da massa do ventrículo esquerdo associada ao aumento da cavidade do ventrículo esquerdo na diástole em comparação ao grupo DOS, o que poderia estar influenciando negativamente a função contrátil, evidenciada nos grupo DTOR pela redução do VEC. Confirmando a influência da modalidade de treinamento, ratos machos submetidos a treinamento resistido de agachamento a 65-75% de 1RM apresentaram aumento de massa ventricular esquerda sem alteração do diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo, não modificando a função sistólica em relação aos controles (Barauna et al., 2007).

Além disso, todos os animais treinados (DOTA, DOTR e DOTC) apresentaram maior banda de BF-IP, representativa de modulação simpática sobre o coração, sugerindo uma normalização da atividade simpática sobre a bomba cardíaca. Dessa forma, embora os efeitos do treinamento sobre a morfometria do coração sejam dependentes da modalidade, essas alterações morfométricas associadas ao aumento da modulação simpática na bomba cardíaca podem ter contribuído para o aumento do débito cardíaco e, conseqüentemente, a reversão da hipotensão observada nesse modelo experimental.

Com relação à regulação autonômica, os mecanismos envolvidos nas alterações hemodinâmicas também parecem estar relacionados com a modalidade de treinamento, pois embora a VAR-IP e a banda de BF-IP tenham sido maiores em todos os grupos treinados, a VAR-PAS e a banda de BF-PAS foram normalizadas apenas nos grupos que tiveram em suas sessões de treinamento exercícios aeróbios dinâmicos de corrida (DOTA e DOTC).

Atualmente sabe-se que a variabilidade da frequência cardíaca tem sido utilizada como um marcador da integridade parassimpática (Van Ravenswaaij-Artsetal, 1993). Apesar da VAR-IP ter sido maior nos animais treinados (vs. DOS), o que poderia inferir uma maior modulação parassimpática, uma das hipóteses mais aceitas para explicar a normalização da FC nos animais diabéticos após treinamento físico é a melhora do marcapasso cardíaco (nodo sino-atrial), aumentando a FC intrínseca. De fato, vários autores (Souza et al., 2007; De Angelis et al., 2000; De Angelis et al., 1999) observaram que o aumento da frequência cardíaca de repouso em ratos diabéticos treinados estava correlacionado com alterações na FC intrínseca, demonstrando o importante papel do nodo sinoatrial nas alterações na frequência cardíaca induzidas pelo diabetes experimental.

Por algum tempo acreditou-se que a parte parassimpática do sistema nervoso autonômico estava mais afetada pelo diabetes (Mcdowell et al., 1994; Tomilson et al., 1992), não só em pacientes (Eckberg et al., 1986; Lishner et al., 1987), mas também em modelos experimentais (Chang et al., 1986; Maeda et al., 1995; Maeda et al., 1995b). Entretanto, atualmente existem evidências consistentes que a parte simpática também é bastante afetada na neuropatia autonômica

diabética (Kaul 1999; Stumpel et al., 1996). Neste aspecto, tanto a banda de AF-IP (representativa de modulação parassimpática) como a banda de BF-IP (modulação simpática cardíaca) foram maiores nos grupos treinados quando comparados ao sedentário (DOS). Por outro lado, um estudo recente com ratas ooforectomizadas euglicêmicas submetidas a treinamento resistido em baixa e alta intensidade (8 semanas, 3 dias por semana) demonstrou redução da banda de BF-IP em ambas as intensidades de treinamento; mas aumento da banda de AF-IP e diminuição da banda BF-IP normalizada somente no grupo treinado em alta intensidade.

Os mecanismos que explicam as alterações na variabilidade da frequência cardíaca no diabetes por STZ podem estar relacionados com a neuropatia autonômica (De Angelis et al., 2009). Nesse sentido, a **sensibilidade barorreflexa** foi maior nos grupos submetidos a treinamento aeróbio em esteira (DOTA e DOTC) em relação aos demais grupos estudados, tanto para respostas taquicárdicas quanto para respostas bradicárdicas. Em 1998, o estudo ATRAMI (La Rovere et al., 1998) forneceu evidências clínicas do valor prognóstico da sensibilidade barorreflexa e da variabilidade da frequência cardíaca na mortalidade pós-infarto do miocárdio. Dessa maneira, estratégias que proporcionem melhora na sensibilidade barorreflexa tem importantes implicações para mulheres menopausadas. Nesse contexto, vários estudos clínicos e experimentais demonstraram a influência positiva do treinamento físico sobre a sensibilidade barorreflexa em pacientes diabéticos (Loimaala, 2003), mulheres menopausadas (Jurca et al., 2004), ou ratas diabéticas ooforectomizadas (Souza et al., 2007).

Os efeitos do treinamento físico atenuando a hipotensão e a bradicardia, modificando a morfometria cardíaca associada à melhora a modulação autonômica cardíaca e na SB observada em todos os grupos treinados (DOTA, DOTR e DOTC) podem estar relacionados à menor mortalidade observada nos animais treinados em relação aos sedentários (DOS).

Considerações finais

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos metabólicos, cardíacos, hemodinâmicos, autonômicos e na mortalidade da privação dos hormônios ovarianos na presença ou não de diabetes induzido por estreptozotocina em ratas (protocolo 1). Nossos resultados demonstram alguns achados clássicos da literatura, como o aumento de peso corporal após a ooforectomia e a redução do peso nos animais diabéticos; a redução na capacidade física (tanto no teste máximo de corrida na esteira quanto de forma original na carga máxima obtida no teste na escalada) nos grupos diabéticos; o aumento da pressão arterial após a privação dos hormônios ovarianos, bem como a redução da pressão arterial e da frequência cardíaca no modelo experimental de diabetes por STZ. Por outro lado, a associação de diabetes com ooforectomia induziu exacerbação de algumas disfunções, caracterizadas por o aumento adicional da glicemia e do índice de desempenho miocárdico, e a redução adicional da velocidade de encurtamento do ventrículo e da frequência cardíaca (DOS vs. DS).

Trabalhos recentes de nosso grupo demonstraram que o treinamento físico induziu redução do peso corporal, da pressão arterial e da frequência cardíaca associados à melhora do reflexo barorreceptor em ratas controles ooforectomizadas (Irigoyen et al., 2005), além de promover em ratas diabéticas ooforectomizadas melhora cardiovascular e autonômica acompanhada de redução da mortalidade (SOUZA et al., 2007). De fato, a

prática regular de exercícios físicos (treinamento físico) produz, entre outras coisas, efeitos benéficos sobre a função cardiovascular e redução dos fatores de risco para doenças cardiovasculares (Aisaknen, 2004). Entretanto, esses benefícios têm sido observados, principalmente, em decorrência da atividade regular de física aeróbia dinâmica, enquanto resultados de estudos envolvendo outros tipos de exercícios são escassos e controversos (Forjaz et al., 2006). Os dados disponíveis na literatura indicam uma associação inversa entre condicionamento cardiorrespiratório e prevalência de fatores de risco (Jurca et al., 2004). Contudo, pouco se sabe sobre os benefícios do treinamento resistido e/ou combinado nas disfunções metabólicas, cardiovasculares e autonômicas relacionados à morbi-mortalidade na associação da privação dos hormônios ovarianos e DM.

Baseado nestas evidências, neste trabalho também objetivamos padronizar um teste de carga máxima em escada para avaliação da carga máxima e para prescrição de treinamento físico resistido para ratos (protocolo 2). A padronização do teste de carga máxima possibilitou a avaliação da capacidade física dos animais nos demais protocolos deste estudo (protocolos 1 e 3), bem como serviu de base para a prescrição e ajuste de carga no treinamento resistido utilizado no protocolo 3. A padronização desse teste pode ser de grande valia para a comunidade científica, contribuindo para a prescrição mais precisa do treinamento físico em escada, elucidando os efeitos dessa abordagem em inúmeras situações experimentais.

Além disso, no protocolo 3, nosso objetivo foi comparar os efeitos do treinamento físico aeróbio dinâmico, resistido dinâmico, ou combinado (aeróbio + resistido) na capacidade de exercício e na carga máxima, bem como sobre parâmetros metabólicos, de morfometria e função cardíaca, hemodinâmicos, autonômicos e na mortalidade em ratas ooforectomizadas diabéticas.

De fato, observou-se melhora na capacidade física nas ratas treinadas aerobicamente, que apresentaram maior capacidade de corrida no teste em esteira, nas ratas submetidas ao treinamento resistido, que apresentaram maior carga máxima no teste na escada, e nas ratas submetidas ao treinamento físico combinado, que apresentaram melhoras em ambas as modalidades de exercício. Além disto, os animais treinados apresentaram reversão da hipotensão e da bradicardia de repouso, associadas a aumento da VAR-IP e normalização da banda de BF-IP (vs. DOS). Adicionalmente os grupos treinados submetidos ao treinamento aeróbio dinâmico e ao combinado, mas não o grupo submetido ao treinamento resistido, apresentaram normalização das alterações observadas na variabilidade da pressão arterial sistólica no grupo ooforectomizado diabético, evidenciado pelo aumento da VAR-PAS e da banda de BF-PAS.

Os efeitos do treinamento físico atenuando a hipotensão e a bradicardia, modificando a morfometria cardíaca associada à melhora a modulação autonômica cardíaca e na sensibilidade barorreflexa observada em todos os grupos treinados (DOTA, DOTR e DOTC) podem estar relacionados à

menor mortalidade observada nos animais treinados em relação aos sedentários (DOS).

Dessa forma, os resultados do presente estudo evidenciam que o treinamento físico dinâmico aeróbio, resistido ou combinado induz benefícios metabólicos (peso corporal), na capacidade física, cardiovasculares e autonômicos após a privação dos hormônios ovarianos em ratas diabéticas. No entanto, o treinamento físico combinado parece induzir efeitos adicionais em relação ao aeróbio ou ao resistido nesta condição.

Referências bibliográficas

7. Referências bibliográficas

- AGRAS, W.S - Obesity. In: Dale DC, Federman DD, Cassel CK. Scientific American Medicine. New York: *Scientific American Inc*, 1996.
- ALBRIGHT, A.; FRANZ, M.; HORNS, G.; KRISKA, A.; MARRERO, D.; ULRICH, I.; et al. American College of Sports Medicine Position Stand: exercise and type 2 diabetes. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v.32, n.12, p.1345-1360, 2001.
- AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. *ACSM's guidelines for exercise testing and prescription*. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
- AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE: Appropriate intervention strategies for weight loss and prevention of regain for adults. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v.33; p.2145-2156, 2001.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, v.29, suppl 1, p.:S43-S48, 2006.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Treatment on Hypertension adults with diabetes mellitus. *Diabetes Care*, v.26, n.1, p.:S80-S82, 2003.
- ASIKAINEN, T.M.; KUKKONEN-HARJULA, K.; MIILUNPALO, S. Exercise for health for early postmenopausal women: a systematic review of randomized controlled trials. *Sports Med*, v.34, n.11, p.753-778, 2004.
- BARAUNA, V.G.; BATISTA, M.L. JR; COSTA ROSA, L.F.; CASARINI, D.E.; KRIEGER, J.E.; OLIVEIRA, E.M. Cardiovascular adaptations in rats submitted to a resistance-training model. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*; 32(4): 249-54, 2005.
- BARAUNA, V.G.; ROSA, K.T.; IRIGOYEN, M.C.; DE OLIVEIRA, E.M. Effects of resistance training on ventricular function and hypertrophy in a rat model. *Clin Med Res.*; 5(2): 114-20, 2007.
- BENEKE, R. Anaerobic threshold, individual anaerobic threshold, and maximal lactate steady state in rowing. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v.27, n.6, p.863-7, 1995.
- BENEKE, R. Maximal lactate steady state concentration (MLSS): experimental and modelling approaches. *European Journal of Applied Physiology*, v.88, p.361-9, 2003.
- BILLAT, V.L.; SIVERENT, P.; PY, G.; KORALLSZTEIN, J-P.; MERCIER, J. The concept of maximal lactate steady state: a bridge between biochemistry, physiology and sport science. *Sports Medicine*, v.33, n.6, p.407-26, 2003.

BOUCHARD, C. *Atividade física e obesidade*. Barueri-SP: Manole, 2003.

CARRIER, J. Aerobic plus resistance training was more effective than either alone for glycaemic control in type 2 diabetes *Evid. Based Nurs.*v.11; 48, 2008.

CASTANHO, V.S., OLIVEIRA, L.S., PINHEIRO, H.P., OLIVEIRA, H.C.F., FARIA, E.C. Sex Differences in risk factors for coronary heart disease. A study in a brazilian population. *Bmc Public Health*, v.1, n.3, 2001.

CHANG, K.S.K. & LUND, D.D. Alterations in the baroreceptor reflex control of heart rate in streptozotocin diabetic rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 18, 617-624, 1986.

COHEN, A.J.; MCCARTHY, D.M.; ROSSETI, R.R. Renin secretion by the spontaneously diabetic rat. *Diabetes*, New York, v.35, p.341-6, 1986.

COOK, J.N.; DEVAN, A.E.; SCHLEIFER, J.L.; ANTON, M.M.; CORTEZ-COOPER, M.Y.; TANAKA, H. Arterial compliance of rowers: implications for combined aerobic and strength training on arterial elasticity *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v.290, p.H1596–H1600, 2006.

DALL'AGO, P., FERNANDES, T.G., MACHADO, U.F., BELLÓ, A.A., IRIGOYEN, M.C. Baroreflex and chemoreflex dysfunction in streptozotocin (stz) diabetic rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.30, p.119-124, 1997.

DAVIS, S.R.; BUERGER, H.G. – Clinical reviews 82: Androgens and postmenopausal woman. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996.

DAVY, K.P.; MINICLIER, N.L.; TAYLOR, J.A.; STEVENSON, E.T.; SEALS, D.R. Elevated heart rate variability in physically active postmenopausal women: a cardioprotective effect? *Am J Physiol.*; v.71, n.40, p.H455-H460, 1996.

DE ANGELIS K, BRASILEIRO-SANTOS MS, IRIGOYEN MC. Sistema Nervoso Autônomo e Doença Cardiovascular. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio Grande Do Sul*, v.3, p.1-7, 2004b.

DE ANGELIS, K.; HARTHMANN, A.D.; PARENTE COSTA, L.; KRIEGER, E.M.; IRIGOYEN, M.C. Improvement of circulation control in trained diabetic rats: role of baroreflex sensitivity and blood flow distribution. *Hypertension*, v. 40, p.407, 2002b.

DE ANGELIS, K.; IRIGOYEN, M.C.; MORRIS, M. Diabetes and cardiovascular autonomic dysfunction: application of animal models. *Journal of Autonomic Neuroscience*, 2009.

DE ANGELIS, K.; SCHAAN, B.D.; MAEDA, C.Y.; DALL'AGO, P.; WICHI, R.B.; IRIGOYEN, M.C. Cardiovascular control in experimental diabetes. *Brazilian Journal Of Medical Biological Research*, v.35, n.9, p.1091-1100, 2002a.

DE ANGELIS, K.L.; OLIVEIRA, A.R.; DALL'AGO, P.; PEIXOTO, L.R.; GADONSKI, G.; LACCHINI, S.; FERNANDES, T.G.; IRIGOYEN, M.C. Effects of exercise training on autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Braz J Med Biol Res*, v.33, n.6, p.635-641, 2000.

DE ANGELIS, K.L.D., OLIVEIRA, A.R., WERNER, A., BOCK, P., BELLÓ-KLEIN, A., IRIGOYEN, M.C. Exercise training in aging: hemodynamis, metabolic, and oxidative stress evaluations. *Hypertension*, v.30, n.3, p.767-771, 1997.

DE ANGELIS, K.L.D.; GADONSKI, G.; FANG, J.; DALL'AGO, P.; ALBUQUERQUE, V.L.; PEIXOTO, L.R.A.; FERNANDES, T.G.; IRIGOYEN, M.C. Exercise reverses peripheral insulin resistance in trained L-NAME-hypertensive rats. *Hypertension*, v.34, n.2, p.768-772, 1999.

DE BLIEUX, P.M.; BARBEE, R.W.; MCDONOUGH, K.H.; SHEPHERD R.E. Exercise training improves cardiac performance in diabetic rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1993.

DE DEUS AP, DE OLIVEIRA CR, SIMÕES RP, BALDISSERA V, DA SILVA CA, ROSSI BR, DE SOUSA HC, PARIZOTTO NA, ARENA R, BORGHI-SILVA A. Metabolic and cardiac autonomic effects of high-intensity resistance training protocol in Wistar rats. *J Strength Cond Res*. 2012 Mar;26(3):618-24.

ECKBERG, D.L.; HARKINS, S.W.; FRISCH, J.M.; MUSGRAVE, G.E.; GARDNER, D.F. Baroreflex control of plasma norepinephrine and heart rate period in healthy subjects and diabetic patients. *J Clin Invest*, 1986.

FARAH, V.; DE ANGELIS, K.; JOAQUIM, L.F.; CANDIDO, G.O.; BERNARDES, N.; FAZAN, R. JR.; SCHAAN, B.D.; IRIGOYEN, M.C. Autonomic modulation of arterial pressure and heart rate variability in hypertensive diabetic rats. *Clinics* 2007a.

FAZAN, R. JR.; BALLEJO, G.; SALGADO, M.C.; MORAES, M,F,; SALGADO, H.C. Heart rate variability and baroreceptor function in chronic diabetic rats. *Hypertension*, 1997.

FEIN, F.S.; KORNSTEIN, L.B.; STROBECK, J.E.; CAPASSO, J.M.; SONNENBLICK EH. Altered myocardial mechanics in diabetic rats. *Circulation Research*, 1980.

FERNANDES, R.A.; ZANESCO, A. Early physical activity promotes lower prevalence of chronic diseases in adulthood. *Hypertens Res.*; 33(9): 926-31, 2010.

FISHER, J.S.; KOHRT, W.M.; BROWN, M. - Food restriction suppresses muscle growth and augments osteopenia in ovariectomized rats. *J Appl Physiol*. 2000.

FLECK, S.J.; KRAEMER, W.J. *Fundamentos do treinamento de força*. Porto Alegre: Artes Médicas do Sul, 1999.

FLORES, L.J.; FIGUEROA, D.; SANCHES, I.C.; JORGE, L.; IRIGOYEN, M.C.; RODRIGUES, B.; DE ANGELIS, K. Effects of exercise training on autonomic dysfunction management in an experimental model of menopause and myocardial infarction. *Menopause*, 2010.

FLUES, K.; PAULINI, J.; BRITO, S.; SANCHES, I.C.; CONSOLIM-COLOMBO, F.; IRIGOYEN, M.C.; DE ANGELIS, K. Exercise training associated with estrogen therapy induced cardiovascular benefits after ovarian hormones deprivation. *Maturitas*, 2010. FORJAZ, C.L.M.; REZK, C.C.; CARDOSO Jr., C.G.; TINUCCI, T. Exercícios resistidos e sistema cardiovascular. In: NEGRÃO, C.E.; BARRETO, A.C.P. *Cardiologia do exercício: do atleta ao cardiopata*. 2.ed. São Paulo: Manole, 2006. Capítulo 14. p.272-285.

FRY, A.C. The role of resistance exercise intensity on muscle fibre adaptations. *Sports Med* 34(10): 663-79, 2004.

GAMA, V.M.M.; DE ANGELIS, K.; HARTHMANN, A.; IRIGOYEN, M.C.; FARAH, V.M.A. Impairment of cardiac output and changes in regional blood flows in streptozotocin induced-diabetic rats. *FASEB Journal, Bethesda*, v.16, p.864, 2002.

GEARY, N.; ASARIAN, L. - Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and test meal size in ovariectomized rats. *Physiol Behav*. 1999.

GOBATTO, C.A.; MELLO, M.A.R.; SIBUYA, C.Y.; AZEVEDO, J.R.M.; SANTOS, L.A.; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comparative Biochemistry Physiology. A, Molecular & Integrative Physiology*, v.130A, p.21-7, 2001.

GURLEY, S.B.; CLARE, S.E.; SNOW, K.P.; HU, A.; MEYER, T.W.; COFFMAN, T.M. Impact of genetic background on nephropathy in diabetic mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006.

GUYARD, B.; FRICKER, J.; BRIGANT, L. - Effects of ovarian steroids on energy balance in rats fed a highly palatable diet. *Metabolism*. 1991.

HAGBERG, J.M.; PARK, J.J.; BROWN, M.D. The role of exercise training in the treatment of hypertension: an update. *Sports Med*, v.30, p.193-206, 2000.

HARTHMANN, A.D.; DE ANGELIS, K.; COSTA, L.P.; SENADOR, D.; SCHAAN, B.D.; KRIEGER, E.M.; IRIGOYEN, M.C. Exercise training improves arterial baro- and chemoreflex in control and diabetic rats. *Autonomic Neuroscience*, v.133, n.2, p.115-120, 2007.

HERNÁNDEZ I, DELGADO JL, DÍAZ J, QUESADA T, TERUEL MJG, LLANOS MC, CARBONELL LF. 17 β -Estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 279:R1599-R1605, 2000.

HICKSON, R.C.; DVORAK, B.A.; GOROSTIAGA, E.M.; KUROWSKI, T.T.; FOSTER, C. Potential for strength and endurance training to amplify endurance performance. *Journal of Applied Physiology*, v.65, n.5, p. 2285-2290, 1988.

HOLLOSZY, J.O.; COYLE, E.F. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *Journal of Applied Physiology*, v.56,n.4, p. 831-838, 1984.

HONKOLA, A.; T. FORSÉN; J. ERIKSSON. Resistance training improves the metabolic profile in individuals with type 2 diabetes. *Acta Diabetol*, v.34, p.245–248, 1997.

HORNBERGER JR, T.A.; FARRAR, R.P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol*, 29(1), 16-31, 2004.

HOWORKA, K.; PUMPRLA, J.; HABER, P.; KOLLER-STRAMETZ, J.; MONDRZYK, J.; SCHABMANN, A. Effects of physical training on heart rate variability in diabetic patients with various degrees of cardiovascular autonomic neuropathy. *Cardiovascular Research*, v.31, p.206-211, 1997.

HUIKURI, H.V.; PIKKUJAMSA, S.M.; AIRAKSINEN, J.; IKAHEIMO, M.J.; RANTALA, A.O.; KAUMA, H.; LILJA, M.; KESANIEMI, Y.A. Sex-related differences in autonomic modulation of heart rate in middle-aged subjects. *Circulation*, v.94, p.122-125, 1996.

IBAÑEZ, J.; IZQUIERDO, M.; ARGÜELLES, I.; FORGA, L.; LARRIÓN, J.L.; GARCÍA-UNCITI, M.; IDOATE, F.; GOROSTIAGA, E.M. Twice-Weekly Progressive Resistance Training Decreases Abdominal Fat and Improves Insulin Sensitivity in Older Men With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 28: 662-667, 2005.

IRIGOYEN, M.C.; LACCHINI, S.; DE ANGELIS, K.; MICHELINI, L.C. Fisiopatologia da Hipertensão: O que avançamos? *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*. 2003; 1: 20-45.

IRIGOYEN, M.C.; MOREIRA, E.D.; IDA, F.; PIRES, M.; CESTARI, I.A.; KRIEGER, E.M. Changes Of Renal Sympathetic Activity In Acute And Chronic Conscious Sinoaortic Denervated Rats. *Hypertension*, 26(6 Pt 2):1111-6, 1995.

IRIGOYEN, M.C.; PAULINI, J.; FLORES, L.J.; FLUES, K.; BERTAGNOLLI, M.; MOREIRA, E.D.; CONSOLIM-COLOMBO, F.; BELLO-KLEIN, A.; DE ANGELIS, K. Exercise training

improves baroreflex sensitivity associated with oxidative stress reduction in ovariectomized rats. *Hypertension*, v.46, n.4, p.998-1003, 2005.

ISHISE, H.; ASANOI, H.; ISHIZAKA, S.; JOHO, S.; KAMEYAMA, T.; UMENO, K.; INOUE, H. Time course of sympathovagal imbalance and left ventricular dysfunction in conscious dogs with heart failure. *J Appl Physiol.*, v.84, n.4, p.1234-41, 1998.

JACKSON, C.V.; CARRIER, G.O. Influence of short-term experimental diabetes on blood pressure and heart rate in response to norepinephrine and angiotensin II in the conscious rat. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, New York, v.5, p.260-65, 1983

JOAQUIM, LUIS FERNANDO; SALGADO, HELIO CESAR; FAZAN, RUBENS. Variabilidade da pressão arterial e da frequência cardíaca, e sensibilidade do barorreflexo, em animais geneticamente manipulados. *Revista Brasileira de Hipertensão*, v. 12, p. 36-40, 2005.

JORGE, L.; ROGOW, A.; FLORES, L.J.F.; SANCHES, I.C.; PUREZA, D.Y.; IRIGOYEN, M.C.; DE ANGELIS, K. Exercise training-induced metabolic improvement was associated with attenuation of cardiovascular and autonomic dysfunction in diabetics. *FASEB Journal*, v.19, n.5, suppl A1685, 2005.

JUNOD, A.; LAMBERT, A.E.; ORCIL, PICTET, R.; GONET, A.E.; REINOULD, A.E. Studies of the diabetogenic action of streptozocin. *Proceeding of Society Experimental Biology Medicine*, v.126, n.1, p.201-5, 1967.

JURCA, R.; LÇAMONTE, M.J.; CHURCH, S.T.; EARNEST, C.P.; FITZGERALD, S.J.; BARLOW, C.E.; et al. Association of muscle strenght and aerobic fitness with metabolic syndrome in men. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v.36, n.8, p.1301-1307, 2004.

KAUL, C.L. Role of sympathetic nervous system in experimental hypertension and diabetes mellitus. *Clin Exp Hypert*, 1999.

KHOO, C.L.; PERERA, M. Diabetes and the menopause. *Menopause Int*, v.11, p.6-11, 2005.

KING, H.; AUBERT, R.E.; HERMAN, W.H. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care*, v.21, n.9, p.1414-31, 1998.

KRAEMER, W.J.; RATAMESS, N.A. Fundamentals of resistance training: progression and exercise prescription. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, v.36 (4), 674-688, 2004.

KRISAN, A.D.; COLLINS, D.E.; CRAIN, A.M.; KWONG, C.C.; SINGH, M.K.; BERNARD, J.R.; YASPELKIS III, B.B. Resistance training enhances components of the insulin signaling cascade in normal and high-fat-fed rodents skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 96: 1691-1700, 2004

KUO, T.B.J.; LIN, T.; YANG, C.C.H.; LI, C.L.; CHEN, C.F.; CHOU, P. Effect of aging on gender differences in neural control of heart rate. *Am J Physiol*, 46: H2233-H2239, 1999.

LA ROVERE, M.T.; BERSANO, C.; GNEMMI, M.; SPECCHIA, G.; SCHWARTZ, P.J. Exercise-induced increase in baroreflex sensitivity predicts improved prognosis after myocardial infarction. *Circulation*, v.106, n.8, p. 945-949, 2002.

LAITINEN, T.; HARTIKAINEN, J.; VANNINEN, E.; NISKANEN, L.; GEELEN, G.; LANSIMIES, E. Age and gender dependency of baroreflex sensitivity in health subjects. *J Appl Physiol*, v.84, n.2, p.576-583, 1998.

LATOUR, M.G.; SHINODA, M.; LAVOIE, J.M. Metabolic effects of physical training in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *J Appl Physiol*, v.90, n.1, p.235-241, 2001.

LEY, C.J.; LEES, B.; STEVENSON, J.C. – Sex-and menopause-associated changes in body-fat distribution. *Am J Clin Nutr*. 1992.

LISHNER, M.; AKSERROD, S.; DIVON, M.; RAVID, M. Spectral analysis of heart rate fluctuation. A non-invasive sensitive method for the early diagnosis of autonomic neuropathy in diabetes mellitus. *J Auton Nerv Syst*, 1987.

LOIMAALA, A.; HUIKURI, H.V.; KOOBI, T.; RINNE, M.; NENONEN, A.; VUORI, I. Exercise training improves baroreflex sensitivity in type 2 diabetes. *Diabetes*, v.52, n.7, p.1837-1842, 2003.

MAEDA, C.Y.; FERNANDES, T.G.; LULHIER, F.; IRIGOYEN, M.C. Streptozotocin diabetes modifies arterial pressure and baroreflex sensitivity in rats. *Braz J Med Biol Res*, v.28, p.497-501, 1995a.

MAEDA, C.Y.; FERNANDES, T.G.; TIMM, H.B.; IRIGOYEN, M.C. Autonomic dysfunction in short-term experimental diabetes. *Hypertension*, v.26, n.6 [part 2], p.1000-1004, 1995b.

MAIORANA, A.; O'DRISCOLL, G.; GOODMAN, C.; TAYLOR, R.; GREEN, D. Combined aerobic and resistance exercise improves glycemic control and fitness in type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v.56, p.115–123, 2002.

MAKINO N, DHALLA KS, ELIMBAN V & DHALLA NS. Sarcolemmal Ca^{2+} transport in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy in rats. *American Journal of Physiology* 1987.

MALERBI, D.A.; FRANCO, L.J. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. *Diabetes Care*, v.15, p.1509-16, 1992.

MANCHADO, F.B.; GOBATO, C.A.; CONTARTEZE, R.V.L.; PAPOTI, M.; MELLO, M.A.R. Maximal lactate steady state in running rats. *Journal of Exercise Physiology online*, v.8, p.29-35, 2005.

MANCIA G, GIANNATTASIO C, PARATI G, FAILLA M, STELLA M. Hemodynamics And Pressure Variability In Isolated Systolic Hypertension. *Cardiologia*, 39 (12 Suppl 1):247-50, 1994.

MCDOWELL, T.S.; HAJDUCZOK, G.; ABBOUD, F.M.; CHAPLEAU, M.W. Baroreflex disfunction in diabetes mellitus. I. Selective impairment of parasympathetic control of heart rate. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 1994.

MOSCA, L; BANKA, CL; BENJAMIN, EJ; BERRA, K; BUSHNELL, C; DOLOR, RJ; GANIATS, TG; GOMES, AS; GORNIK HL; GRACIA C; GULATI M; HAAN CK; JUDELSON DR; KEENAN N; KELEPOURIS E; MICHOS ED; NEWBY LK; OPARIL S; OUYANG P; OZ MC; PETITTI D; PINN VW; REDBERG RF; SCOTT R; SHERIF K; SMITH SC JR; SOPKO G; STEINHORN RH; STONE NJ; TAUBERT KA; TODD BA; URBINA E; WENGER NK; EXPERT PANEL/WRITING GROUP; AMERICAN HEART ASSOCIATION; AMERICAN ACADEMY OF FAMILY PHYSICIANS; AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS; AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY FOUNDATION; SOCIETY OF THORACIC SURGEONS; AMERICAN MEDICAL WOMEN'S ASSOCIATION; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION; OFFICE OF RESEARCH ON WOMEN'S HEALTH; ASSOCIATION OF BLACK CARDIOLOGISTS; AMERICAN COLLEGE OF PHYSICIANS; WORLD HEART FEDERATION; NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE; AMERICAN COLLEGE OF NURSE PRACTITIONERS. Evidence-based guidelines for cardiovascular disease prevention in women: 2007 update. *Circulation*, 20;115(11):1481-501, 2007.

MOSTARDA C, ROGOW A, SILVA IC, DE LA FUENTE RN, JORGE L, RODRIGUES B, HEEREN MV, CALDINI EG, DE ANGELIS K, IRIGOYEN MC. Benefits of exercise training in diabetic rats persist after three weeks of detraining. *Auton Neurosci*. 2009

MUIR, A.; SCHATZ, D.A.; MACLAREN, N.K. The pathogenesis, prediction, and prevention of insulin-dependent diabetes mellitus. *Endocrinology Metabolism Clinic North Americann*, v.21, n.2, p.199-219, Review, 1992.

NAHAS, M.V. *Atividade física, saúde e qualidade de vida: conceitos e sugestões para um estilo de vida ativo*. Londrina: Midiograf, 2001.

NARICI, M.V.; MAFFULLI, N. Sarcopenia: characteristics, mechanisms and functional significance. *Br Med Bull* 95: 139-59, 2010.

NIEMAN, D.C. *Exercício e Saúde*. Manole: v.1, p.85-103, 1999.

NILSSON, M.I.; GREENE, N.P.; DOBSON, J.P.; WIGGS, M.P.; GASIER, H.G.; MACIAS, B.R.; SHIMKUS, K.L.; FLUCKEY, J.D. Insulin resistance syndrome blunts the mitochondrial anabolic response following resistance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299(3): E466-E474, 2010.

PARENTE COSTA, L.; HARTHMANN, A.D.; ARRUDA, P.; DE ANGELIS, K.; IRIGOYEN, M. Treinamento físico melhora a disfunção quimiorreflexa em ratos diabéticos. *Revista Brasileira de Educação Física*, v.18, n.13, p.293-301, 2004.

PATE, R.R.; PRATT, M.; BLAIR, S.N.; HASKELL, W.L.; MACERA, C.A.; BOUCHARD, C.; et al. Physical Activity and public health: A recommendation from the centers for disease control and prevention and the American College of Sports Medicine [Special Communication]. *JAMA*, v.273, p.402-407, 1995.

PAULO, A.C.; SOUZA, E.O.; LAURENTINO, G.; UGRINOWITSCH, C.; TRICOLI, V. Efeito do treinamento concorrente no desenvolvimento da força motora e da resistência aeróbia. *Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte*, v.4, n.4, p.145-154, 2005.

PEDERSEN, B. K.; SALTIN, B. Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. *Scand J Med Sci Sports*, v.16, Suppl. 1, p.3–63, 2006.

PEREIRA GB, PRESTES J, LEITE RD, MAGOSSO RF, PEIXOTO FS, MARQUETI RDE C, SHIGUEMOTO GE, SELISTRE-DE-ARAÚJO HS, BALDISSERA V, PEREZ SE. Effects of ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in rat calcaneal tendon. *Connect Tissue Res* 51(6): 459-466, 2010.

POLLOCK, M.L.; FRANKLIN, B.A.; BALADY, G.J.; CHAITMAN, B.L.; FLEG, J.L.; FLETCHER, B.; LIMACHER, M.; PIÑA, I.L.; STEIN, R.A.; WILLIAMS, M.; BAZZARRE, T. Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease: benefits, rationale, safety, and prescription: an advisory from the Committee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention, Council on Clinical Cardiology, American Heart Association: position paper endorsed by the American College of Sports Medicine. *Circulation*, v.101, p.828-833, 2000.

PRAET, S.F.E.; JONKERS, R.A.M.; SCHEP, G.; STEHOUWER, C.D.A.; KUIPERS, H.; KEIZER, H.A.; VAN LOON, L.J. Long-standing, insulin-treated type 2 diabetes patients with complications respond well to short-term resistance and interval exercise training. *European Journal of Endocrinology*, v.158, p.163–172, 2008.

PRESTES J, LEITE RD, PEREIRA GB, SHIGUEMOTO GE, BERNARDES CF, ASANO RY, SALES MM, BARTHOLOMEU NETO J. Resistance Training and Glycogen Content in Ovariectomized Rats., *Int J Sports Med*. 2012. REGO, R.A.; BERARDO, F.A.; RODRIGUES, S.S.; OLIVEIRA, Z.M.; OLIVERIRA, M.B.; VASCONCELLOS, C.; AVENTURATO, L.V.; MONCAU, J.E.; RAMOS, L.R. Fatores de risco para doenças

crônicas não-transmissíveis: inquérito domiciliar no Município de São Paulo, SP. *Rev Saúde Pub*; v.24, p.277-85, 1990.

RIBEIRO, J.P.; MORAES FILHO; R.S. Variabilidade da Frequência Cardíaca como Instrumento de Investigação do Sistema Nervoso Autônomo. *Revista Brasileira de Hipertensão*, v. 12, p. 14-20, 2005.

RODRIGUES B, FIGUEROA DM, MOSTARDA CT, HEEREN MV, IRIGOYEN MC, DE ANGELIS K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovascular Diabetology* 6:38, 2007.

RODRIGUES B, ROSS JR, FARAHBAKSHIAN S & MCNEILL JH. Effects of *in vivo* and *in vitro* treatment with L-carnitine on isolated hearts from chronically diabetic rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1990.

RODRIGUES, B., IRIGOYEN, M.C., DE ANGELIS, K. Correlation between speed and oxygen consumption (VO₂) in rats submitted to maximum exercise test. *FIEP Bulletin*. 76: 231-233, 2006.

ROSSI, R.; GRIMALDI, T.; ORIGLIANI, G.; FANTINI, G.; COPPI, F.; MODENA, M.G. Menopause and cardiovascular risk. *Pathophysiol Haemost Thromb*, v.32, p.325-328, 2002.

SACCIA, L.; MORRONE, G.; CICALA, M.; CORSO, G.; UNGARO, B. Influence of epinephrine, norepinephrine, and isoproterenol on glucose homeostasis in normal man. *J Clin Endocrinol Metab*. 1980

SALE, D.G.; JACOBS, I.; MACDOUGALL, J.D.; GARNER, S. Comparisoin of two regimens of concurrent strenght and endurance training. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v.22, n.3, p.348-356, 1990.

SANCHES IC, BRITO JO, CANDIDO GO, DIAS DS, JORGE L, IRIGOYEN MC, DE ANGELIS K. Cardiometabolic benefits of exercise training in na experimental modelo f metabolic syndrome and menopause. *Menopause* 19(5): 562-568, 2011

SANCHES IC, SARTORI M, JORGE L, IRIGOYEN MC, DE ANGELIS K. Tonic and reflex cardiovascular autonomic control in trained-female rats. *Braz J Med Biol Res* 42(10): 942-948, 2009.

SCHAAN, B.D.; DALL'AGO, P.; MAEDA, C.Y.; FERLIN, E.; FERNANDES, T,G,; SCHMID, H.; IRIGOYEN, M.C. Relationship between cardiovascular dysfunction and hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Braz J Med Biol Res* 2004.

SCHAAN, B.D.; HARZHEIN, E.; GUS, I. Fatores de risco para doença arterial coronariana em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose no Rio Grande do Sul (RS). *Arq Bras Endocrinol Metab*, v.46 (Supl 1), p.S394, 2002.

SENGES, J.; BRACHMANN, J.; PELZER, D.; HASSLACHER, C.; WEIHE, E.; KUBLER, W. Altered cardiac automaticity and conduction in experimental diabetes mellitus. *Journal of molecular and cellular cardiology* 1980.

SHAIBI, G. Q., CRUZ, M.L.; BALL, G.D.C.; WEIGENBERG, M.J.; SALEM, G.J.; CRESPO, N.C.; GORAN, M.I. Effects of Resistance Training on Insulin Sensitivity in Overweight Latino Adolescent Males. *Med. Sci. Sports Exerc.*, v.38, n.7, p.1208 – 1215, 2006.

SHIMOMURA K, SHIMIZU H, TSUCHIYA T, et al. - Is leptin a key factor which develops obesity by ovariectomy? *Endocr J*. 2002;49(4):417-23.

SILVEIRA LCR, TEZINI GCSV, SCHUJTMANN DS, PORTO JM, ROSSI BRO, SOUZA HCD. Comparison of the effects of aerobic and resistance training on cardiac autonomic adaptations in ovariectomized rats. *Autonomic Neuroscience* 162(1-2): 35-42, 2011.

SNOWLING, N.J.; HOPKINS, W.G. Effects of Different Modes of Exercise Training on Glucose Control and Risk Factors for Complications in Type 2 Diabetic Patients *Diabetes Care*, v.29, p.2518–2527, 2006

SOARES, P.P.; DA NÓBREGA, A.C.; USHIZIMA, M.R.; IRIGOYEN, M.C. Cholinergic stimulation with pyridostigmine increases heart rate variability and baroreflex sensitivity in rats. *Auton Neurosci.*, v.30, n.113(1-2), p.24-31, 2004.

SOUZA, S.B.C.; FLUES, K.; PAULINI, J.; MOSTARDA, C.; RODRIGUES, B.; SOUZA, L.E.; IRIGOYEN, M.C.; DE ANGELIS, K. Role of exercise training in cardiovascular autonomic dysfunction and mortality in diabetic ovariectomized rats. *Hypertension*, v.50, p.786-791, 2007.

SOWERS, J. Diabetes mellitus and cardiovascular disease in women. *Arch Intern Med*. 1998.

SOWERS, M.R.; LA PIETRA, M. Menopause: its epidemiology and potencial association with chronic diseases. *Epidemiol Rev*, v.17, n.2, p.287-302, 1995.

STAESSEN, J.A.; GINOCCHIO, G.; THIJS, L.; FAGARD, R. Conventional and ambulatory blood pressure and menopause in a prospective population study. *J Hum Hypertens*, v.11,n.8, p.507-514, 1997.

STAMLER, J.; STAMLER, R.; RIEDLINGER, W.F.; ALGERA, G.; ROBERTS, R.H. Hypertension screening of 1 million Americans. Community Hypertension Evaluation Clinic (CHEC) program, 1973 through 1975. *JAMA*, v.235, n.21, p.2299-2306, 1976.

SZABO J, IBRAHIM WH, SUNVOLD GD, et al. - Effect of dietary protein quality and essential fatty acids on fatty acid composition in the liver and adipose tissue after rapid weight loss in overweight cats. *Am J Vet Res.* 2000.

TOMILSON, K.C.; GARDINER, S.M.; HEBDEN, A.; BENNETTI, T. Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. *Pharmacol Ver,* 1992.

TOMLINSON, K.C.; GARDINER, S.M.; BENNETT, T. Blood pressure in streptozotocin-treated Brattleboro and Long-Evans rats. *Am J Physiol.* 1990.

TSANG, W.; ALTER, D.A.; WIJEYSUNDERA, H.C.; ZHANG, T.; KO, D.T. The Impact of Cardiovascular Disease Prevalence on Women's Enrollment in Landmark Randomized Cardiovascular Trials: A Systematic Review. *J Gen Intern Med,* 2011.

TUOMILEHTO, J.; LINDSTROM, J.; ERIKSSON, J.G.; VALLE, T.T.; HAMALAINEN, H.; ILANNE-PARIKKA, P.; KEINANEN-KIUKAANNIEMI, S.; LAAKSO, M.; LOUHERANTA, A.; RASTAS, M.; SALMINEN, V.; UUSITUPA, M. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Méd,* v.344, n.18, p.1343-1350, 2001.

VAN RAVENSWAAIJ-ARTS, C.M.; KOLLEE, L.A.; HOPMAN, J.C.; STOELINGA, G.B.; VAN GEIJN, H.P. Heart rate variability. *Annals of internal medicine,* 1993.

VITTINGHOFF, E.; SHLIPAK, M.G.; VAROSY, P.D.; FURBERG, C.D.; IRELAND, C.C.; KHAN, S.S.; BLUMENTHAL, R.; BARRETT-CONNOR, E.; HULLEY, S. Risk factors and secondary prevention in women with heart disease: the Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. *Ann Intern Med,* v.138, n.2, p.81-89, 2003.

WEGNER, J.A.; LUND, D.D.; OVERTON, J.M.; EDWARDS, J.G.; ODA, R.P.; TIPTON, C.M. Select cardiovascular and metabolic responses of diabetic rats to moderate exercise training. *Med Sci Sports Exerc* 1987

WICHI, R.; MALFITANO, C.; ROSA, K.; DE SOUZA, S.B.; SALEMI, V.; MOSTARDA, C.; DE ANGELIS, K.; IRIGOYEN, M.C. Noninvasive and invasive evaluation of cardiac dysfunction in experimental diabetes in rodents. *Cardiovasc Diabetol,* v.26, p.6-14, 2007.

WILLIAMS AD, ALMOND J, AHUJA KD, BEARD DC, ROBERTSON IK, BALL MJ. Cardiovascular and metabolic effects of community based resistance training in an older population. *J Sci Med Sport,* 14(4):331-337, 2011.

WILLIAMS, M.A.; HASKELL, W.L.; ADES, P.A.; AMSTERDAM, E.A.; BITTNER, V.; FRANKLIN, B.A.; GULANICK, M.; LAING, S.T.; STEWART, K.J. Resistance Exercise in Individuals With and Without Cardiovascular Disease: 2007 Update: A Scientific Statement From the American Heart Association Council on Clinical Cardiology and

Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation*, v.116, p.572-584, 2007.

YAGIHASHI, S. Pathology and pathogenic mechanisms of diabetic neuropathy. *Diabetes Metabolism Reviews*, v.11, n.3, p.193-225, 1995.

YANES LL, RECKELHOFF JF. Postmenopausal hypertension. *Am J Hypertens.*; 24(7): 740-9, 2004.

YANG, Z.J.; LIU, J.; GE, J.P.; CHEN, L.; ZHAO, Z.G.; YANG, W.Y.; CHINA NATIONAL DIABETES AND METABOLIC DISORDERS STUDY GROUP. Prevalence of cardiovascular disease risk factor in the chinese population: the 2007-2008 China national diabetes and metabolic disorders study. *Eur Heart J*, 2011.

Anexos

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 19/11/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0984/08**, intitulado: "**CONTROLE CARDIOVASCULAR EM FÊMEAS OOFORRECTOMIZADAS DIABÉTICAS: EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO DINÂMICO AERÓBIO, RESISTIDO E COMBINADO**" apresentado pela ÁREA de FISIOPATOLOGIA EXPERIMENTAL.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Maria Cláudia Irigoyen**

Pesquisador (a) Executante: **Iris Callado Sanches**

CAPPesq, 24 de Novembro de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Standardization of a moderate-intensity resistance exercise training protocol in stairs based on a maximal load test: effects in diabetic ovariectomized rats.

Iris Callado Sanches^{1,2}, Filipe Fernandes Conti¹, Michelle Sartori², Maria-Cláudia Irigoyen², Kátia De Angelis^{1,2}

¹ Laboratory of Translational Physiology, Nove de Julho University, Sao Paulo, SP, Brazil.

² Hypertension Unit, Heart Institute, University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil.

Running head: Maximal load test & resistance training in stair for rats.

Contact information:

Prof. Kátia De Angelis, PhD

Nove de Julho University - Science Rehabilitation Program

Av. Francisco Matarazzo, 612, 1º andar

CEP 05001-100

Sao Paulo, SP, Brazil.

Fone: 55 11 3665 9325

Email: prof.kangelis@uninove.br

ABSTRACT

Since the effects of aerobic exercise training in preventing and/or attenuating cardio metabolic risk factors in experimental models have been extensively investigated, we decided to investigate the effects of resistance exercise training in stairs in an experimental model of menopause (bilateral removal of the ovaries) and diabetes (streptozotocin, 50mg/kg IV). Therefore, we carried out this study with a threefold aim: 1) to standardize a maximal load test (MLT) in stairs for prescription of resistance exercise training in rats, 2) to prescribe moderate-intensity resistance exercise training based on this maximal load test, and 3) to test the effect of this resistance exercise training in diabetic ovariectomized rats. Female Wistar rats were divided into: control (C), diabetic ovariectomized sedentary (DOS) and trained (DOT). To standardize the MLT in stairs, increased load was applied in the rat tail for each climb and blood lactate was measured to identify lactate threshold in C rats. MLT was applied in the 1st, 4th and 8th week of the protocol. Resistance exercise training in stairs was performed during 8 weeks at moderate intensity (40-60% maximal load). At the end of the training, rats were catheterized for direct arterial pressure measurements. The DOS group presented reduced performance in the MLT as compared to the C group, accompanied by reduced body weight, left ventricular, plantar and soleus muscles mass. DOT rats showed an increase in maximal load capacity associated with an increase in plantar muscle mass when compared to the other groups, with attenuation of hypotension and bradycardia (vs. DOS). In conclusion, the results of the present study provide a useful method to determine the maximal load in rats and apply resistance training in rats. Moreover, this study showed that resistance exercise improves hemodynamic status in diabetic ovariectomized rats, which reinforces the role of resistance training in diabetes management.

Key words: resistance exercise training, maximal load test, rat, menopause, diabetes

INTRODUCTION

Over the last decades, the numerous beneficial effects of aerobic exercise training have been extensively investigated with respect to various biological parameters. Accordingly, our group has focused on elucidating the gender-specific effects of aerobic exercise training on cardiovascular and autonomic control, as in healthy females (37) or in ovariectomized rats (13, 16). Since the risk of diabetes mellitus (DM) increases significantly after menopause (35), and the DM increases the risk of cardiovascular disease in pre- and postmenopausal women (21, 22, 42), we investigated the effect of aerobic exercise training in ovariectomized streptozotocin-induced diabetic rats (41) and in fructose fed ovariectomized rats (36), showing beneficial effects on cardiovascular autonomic control. However, these effects were observed due to dynamic aerobic exercise training on a treadmill.

It is indeed well-established that exercise training induces cardiovascular and metabolic changes that are dependent on exercise type, intensity and duration as well as on physiological or pathophysiological conditions (5, 7, 8, 39, 31, 40, 47). Moreover, despite the many experimental and clinical findings reporting the benefits of aerobic exercise training in the management of cardio metabolic dysfunctions in some diseases (e.g. DM, hypertension and metabolic syndrome), a growing number of clinical evidence supports the importance of resistance exercise training as a part of lifestyle therapy for these conditions. In fact, several medical associations recommend resistance exercise training (40-60% maximal load) as a complement to aerobic training in the management of various diseases, including diabetes (31, 38, 45, 46). However, the effect of this type of training in experimental models of the diseases has been poorly studied, since the standardized resistance training protocol

was applied in high intensity, which is not appropriate in the context of the management of conditions associated with increased cardio metabolic risk. Furthermore, the lack of a well-standardized maximal load test in rats impairs the accuracy in resistance exercise training prescription. Therefore, the objectives of the present study were: 1) to standardize a maximal load test in stairs for the accurate prescription of resistance exercise training in rats; 2) to prescribe a moderate-intensity resistance exercise training based on this maximal load test; and 3) to test the effects of this resistance exercise training on anthropometric, metabolic and cardiovascular parameters in diabetic ovariectomized rats.

We suggest that the standardization of the maximal load test in the stairs will be a great advance in prescription of resistance exercise training for experimental models, making this approach a useful tool for studying the mechanisms underlying the benefits of resistance exercise training in many pathophysiological conditions. Given that, we hypothesized that prescription of resistance exercise training based on 40-60% of the maximal load obtained in maximal load test may promote beneficial effects in diabetic ovariectomized rats.

METHODS

Experiments were performed using 24 female old Wistar rats (10 week old) obtained from the Animal Shelter of University of Sao Paulo, Brazil. The rats received standard laboratory chow (Nuvital, Colombo, Brazil) and water ad libitum. The animals were housed in individual cages in a temperature-controlled room (22°C) with 12-h dark-light cycle. Three experimental groups were used in this study: control (C, n=8), diabetic ovariectomized sedentary (DOS, n=8) and trained

(DOT, n=8). All rats were treated similarly in terms of daily manipulation. All surgical procedures and protocols were in accordance with the Ethical Care Guidelines for Experimental Animals and the International Animal Care and Use Committee and were approved by University of Sao Paulo Ethical Committee (protocol number 0984/08).

Ovariectomy. At 10 weeks old, animals were anesthetized (80 mg/kg ketamine and 12 mg/kg xylazine), the oviduct was sectioned and the ovary removed as described in detail elsewhere (13, 16, 41). Data from our laboratory have demonstrated that the estrogen concentration, measured by immunoassay, was 39 ± 7 pg/ml in healthy female rats. However, in the present study estrogen concentration was non-detectable in all studied groups, confirming ovarian hormone deprivation (13).

Diabetes. Animals were made diabetic by a single injection of STZ (50 mg/kg IV; Sigma Chemical Co) dissolved in citrate buffer (pH 4.5) after 6 hours of fasting (41).

Glycemia. Blood samples (50 μ L) were collected to measure glycemia 72 hours after STZ injection and at the end of the protocol with a Gluco test (Advantage, Roche Laboratories) (36, 41).

Maximal load test. To standardize the maximal load test, a stairs adapted for rats was used (Figure 1). The stairs have 54 vertical steps, a 0.5 cm of distance between them, and a small rat cage at the top, which is covered with a cloth to promote a dark environment for the animal rest between the climbs. The weights used as load were mounted with fishing weights, and were attached to the base of the rat tail. Based on our previous experience with aerobic exercise training on treadmill,

the animals were gradually adapted to the act of climbing for 5 consecutive days, before the actual maximal load test. The test consisted of an initial load of 75% of the body weight, which was progressively increased with 30 grams in the subsequent climbs. A drop of blood was collected from the rat tail after each load for lactate measurements (Accutrend Plus, Roche Diagnostics) to obtain the lactate threshold.

Resistance exercise training. The resistance exercise training protocol was performed during 8 weeks, 5 days a week based on the aerobic exercise training protocol our group has been using in recent years (12, 13, 16, 37, 41) and at moderate intensity (40-60% of the maximal load) as recommend for diabetic or disease patients (38, 46).

Cardiovascular measurements. At the end of resistance exercise training protocol, rats were anesthetized with ketamine (80 mg/kg) and xylazine (12 mg/kg), and a polyethylene-tipped Tygon cannula filled with heparinized saline was implanted into the carotid artery for direct measurements of AP. During experiments, rats received food and water ad libitum; they remained conscious in their cages and were allowed to move freely during the hemodynamic experiments. The arterial cannula was connected to a transducer (Blood Pressure XDCR, Kent© Scientific), and blood pressure signals were recorded for a 30-min period using a microcomputer equipped with an analog-to-digital converter (CODAS, 2Kz, DATAQ Instruments). The recorded data were analyzed on a beat-to-beat basis to quantify changes in mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) (13, 16, 37, 41).

Tissue weight. After cardiovascular measurements, the animals were killed by decapitation, and the left ventricle, soleus and plantar muscles were immediately removed and weighted.

Statistical analysis. Data are expressed as means $\pm$ SEM. The Levene Test was used to evaluate data homogeneity. One-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test were used to compare groups. Significance level was established at $p < 0.05$.

RESULTS

Maximal Load Test. In the first climb, the applied load was 75% of animal body weight, ensuring uniformity in the overload test. After completing the first climb, a 2 minute resting period preceded the next climb. For this next climb, a 30 gram additional weight load was applied. This increment was repeated successively until the animal could not complete the climb bearing the load. For determination of maximal load, it was assumed that animals should complete a maximum of 6 climbs, to avoid fatigue due to excessive number of climbs.

Figure 2 shows the blood lactate concentration during the maximal load test. The lactate concentration was almost constant in the fourth initial loads (75% of the body weight, +30g, +60g, +90g); however, it markedly increased in the fifth load (+120 g), indicating a transition from a predominantly aerobic metabolism to a predominantly anaerobic metabolism, which is characteristic of lactate threshold (LT, gray bar in Figure 2).

Given the body weight variations between animals or groups, the normalized maximum load was calculated using the formula:

$$\text{Normalized Maximal Load} = \left(\frac{\text{load of the last complete climb}}{\text{body weight}} \right) \times 100$$

The maximal load test was performed at the beginning (1st week), 4th week and at the end (8th week) of protocol in all groups, for load adjustment and assessing the effect of exercise training. In the 1st week, the maximal load in control rats was 128 ± 5.9 % of the body weight. The maximal load progressively increased in the 4th and 8th week (181 ± 3.7 % and 203 ± 11.4 of the body weight, respectively) in C rats. Importantly, to maintain the standard of 6 climbs for maximal load, load increment was adjusted in the maximal load test performed on the 4th and 8th weeks of the protocol, with 50 g and 100 g increments between climbs, respectively.

Resistance exercise training prescription. The prescription of resistance exercise training was performed using the normalized value of maximal load for each rat, and was adjusted weekly, according to body weight of the animal.

The resistance exercise training protocol was performed during 8 weeks, 5 days a week, at moderate intensity (40-60% of the normalized maximal load), with 15 climbs per session, with a 1 minute time interval between climbs.

After the intermediate test (4th week), prescription was adjusted according to the new values obtained in the maximal load test. The number of climbs and the % of intensities in each day of the training protocol are described in Table 1.

Effects of resistance exercise training in diabetic ovariectomized rats. At the end of the protocol, the diabetic rats (DOS and DOT) presented reduced body weight when compared to the control group (C). All STZ-injected rats presented severe hyperglycemia as compared with controls. Diabetic ovariectomized rats had higher glycemia at the end of the protocol compared with their initial values (Table 2).

The maximal load in absolute and normalized values was also reduced in DOS as compared to C rats (Table 2, Figure 3), accompanied by reduced left ventricular (14%), plantar (36%) and soleus muscles (11%) mass (Figure 4).

Animals submitted to exercise training (DOT) had an increase in the maximal load compared with sedentary groups (C and DOS) in 4th week of training and at the end of resistance exercise training protocol (Table 2; Figure 3). Although there were no significant changes in body weight, left ventricular and soleus mass and glycemia, resistance exercise training increased plantar muscle mass when compared to the other studied groups (41% vs. C and 77% vs. DOS) (Figure 4).

As can be seen in Figure 5, the DOS group presented lower MAP and HR than C group. The resistance exercise training applied to diabetic ovariectomized rats attenuated these alterations (Figure 5).

DISCUSSION

The effects of aerobic exercise training have been extensively investigated in various physiological (aging, menopause) and pathological conditions (diabetes, hypertension). However, in recent years, the scientific community has turned its attention to the effects of resistance exercise training, as this is an affordable, easily accessible type of training, particularly for people attending gyms or a *community-based health exercise program*. Unlike aerobic exercise training, the prescription of resistance exercise training takes into account the modulation of several parameters such as number of repetitions, the amount of sets, the load intensity, and time interval between series (23). The possible combinations of these variables alter the acute and chronic physiological effects of resistance exercise, and this fact makes it more

difficult to use this type of exercise for people at risk. However, international guidelines have suggested resistance exercise training as an important non-pharmacological management to prevent or attenuate various risk factors for cardiovascular and metabolic diseases (31, 45, 46).

In this sense, basic research seeks to elucidate the mechanisms underlying the effects of resistance training on cardio metabolic risk factors, especially in situations where the study would be not feasible in humans, for ethical reasons or practical difficulties. In fact, the number of studies investigating the effects of this modality in experimental models has been steadily in recent years (1, 24, 29, 30). However, training prescription has never been based on individual parameters of exercise capacity, but in older protocols that calculate the training load based on the percentage of body weight of the animal studied. Thus, this study aimed to standardize a maximal test load in stairs to rats and, based on values obtained in this test, to prescribe and test a protocol of resistance exercise training for diabetic ovariectomized rats.

Our group has extensively investigated the effects of aerobic exercise training in rat and mice models of disease and, we have demonstrated the correlation between maximal oxygen consumption (VO_{2max}) and the maximal intensity of running in the treadmill test, which we have been using to prescribe *treadmill running exercise* protocols (34). With this in mind, we developed a maximal load test that follows the same principles of the maximal treadmill test. The maximum load test begins with a climb with a load of 75% of rat body weight, ensuring that the intensity of exercise is the same for all animals. After a rest period of 2 minutes, we increase the intensity of the test by adding a load weight in the rat tail (30 grams). No food compensation or

electrical stimulation was applied during the test or the training protocol.

Importantly, the test should not exceed 6 climbs, because if the number of climbs is too high, an excessive number of climbs may lead to animal fatigue.

In this respect, it is worth stressing that depending on age, weight, pathology associated, or overall fitness of the animal, the load increment should probably be adjusted to ensure that no more than a 6 load increase is performed. In line with this, and to maintain the standard of 6 climbs for maximal load, the load increment in our study was adjusted for the maximal load test performed at the 4th and 8th weeks of the protocol in all experimental groups, with increments between climbs of 50 grams and 100 grams, respectively. This adjustment was probably necessary due to the growth of animals and, consequently, the gain of muscle mass that resulted in a natural increase in muscle strength. Likewise, aging induces a reduction in strength (28) and a pilot study (data not shown) undertaken by our group has demonstrated that aged female rats were unable to perform the climbs with the 30 grams increment (proposed in the initial maximum load test in this study) and it was necessary to limit this increment to 15 grams.

In the present study, we could demonstrate that the animals that performed the standardized and applied maximal load test achieved loads above the LT, demonstrating a reduced maximal load in diabetic sedentary ovariectomized rats and an increase in this parameter after resistance training as previous observed in clinical study in type 2 diabetic patients (15).

Resistance exercise training prescription was based on the intensity between 40-60% obtained in the maximal load test. Considering that the effects of resistance training are not as well understood as those of the aerobic training, and that the

animals used in this study had a number of diabetes-related complications, the intensity of exercise training was calculated according to the intensity proposed by Williams et al. (46) for people with cardiovascular risk factors (60% of maximal load). During 8 weeks, the animals performed 15 climbs per day (5 days per week), with 1 minute rest between each climb. At the end of fourth week of training, the maximal load test was repeated so that adjustments in training intensity were performed. At the end of the protocol, the maximal load test was performed again to compare the performance between the groups. In fact, the trained diabetic ovariectomized animals (DOT) had a higher maximal load capacity than the sedentary (C and DOS), thus showing the effect of the resistance exercise training protocol prescribed, and confirming the effectiveness of the utilization of the maximal load test for prescription. Additionally, the moderate-intensity resistance exercise training protocol used in the present study induced an attenuation of diabetic myopathy, as demonstrated by an increase in the plantar muscle mass in trained STZ-rats (89% vs. DOS and 41% vs. C). This change may be muscle-fiber type specific, since this improvement was only observed in plantar muscle (predominance of type II fibers) and not in soleus muscle (predominance of type I fibers) in our study (14).

It is important to emphasize that diabetes mellitus is one of the most important world health problems, since patients are particularly prone to cardiovascular diseases (18, 33, 44). Cardiovascular autonomic neuropathy is a frequent complication of diabetes mellitus and it is associated with high morbidity and mortality in symptomatic patients (10, 19). This condition affects the autonomic modulation of the sinus node, thus reducing heart rate variability (11).

Experimental diabetes induced by streptozotocin (STZ) is characterized by degenerative changes in autonomic neurons, observed from 3 days (27) to several weeks after STZ administration in rats (6). STZ destroys pancreatic β cells, resulting in diabetic syndrome in animals, hyperglycemia, hypoinsulinemia, glycosuria and weight loss (8, 20, 43). In the present study glycemia remained unaltered after resistance training, probably because our diabetes model is more closely linked to type I diabetes, in which no changes were observed after training in experimental or clinical studies (8, 32, 41).

Moreover, the STZ-diabetic rat showed hypotension and bradycardia (8). The mechanisms underlying these alterations have yet to be fully understood. Some investigators have associated hypotension and bradycardia with reductions in intrinsic heart rate, in vagal tone and in cardiovascular reflex control (4, 8, 25, 26).

In the present study, the diabetic ovariectomized rats showed reduced body weight, hypotension and bradycardia. However, the major finding of this investigation is that prescription of resistance exercise training based on the maximal load test improves diabetes-induced hemodynamic dysfunction. The resistance exercise training attenuated the changes in arterial pressure after ovarian hormone deprivation in diabetic rats. In a previous study of our group, the hypotension presented by sedentary diabetic rats was not observed in aerobic trained diabetic animals (11 weeks of training on a treadmill) (8). This improvement could be related to an increase in cardiac output in diabetic rats (8, 9) due to attenuation of bradycardia or cardiac dysfunction (8, 41).

Reduced heart rate in sedentary diabetic rats has been attributed to changes in the sino atrial node (4, 8, 26, 41), although functional alterations in the cholinergic

mechanism cannot be ruled out as a causal factor. In the present study, we observed an increase in resting heart rate in trained diabetic ovariectomized rats. Similarly, in male STZ-induced diabetes rats or in diabetic ovariectomized rats, aerobic exercise training also induced an increase in resting bradycardia, and this effect most likely resulted from a training-induced increase in intrinsic heart rate (8, 41).

CONCLUSION

The results of the present study may provide a useful method to determine the maximal load in rats and to apply resistance training in rats. We believe that these two tools can be used for different experimental models of disease.

Moreover, this study showed that resistance exercise training may delay and improve the hemodynamic dysfunction observed in diabetic ovariectomized rats, and should be considered in the prevention and treatment of this disease.

However, a fuller understanding of the mechanisms underlying exercise training induced improvements in hemodynamic parameters (arterial pressure and heart rate) in streptozotocin-diabetic ovariectomized rats requires further research.

GRANTS

This study was supported by [Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior](#) (CAPES-PROSUP) and FAPESP (2007/57595-5, 2007/52419-4). K. De Angelis and M.C. Irigoyen are the recipients of CNPq-BPQ fellowships

NO DISCLOSURE

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: I.C.S. and K.D.A. conception and design of research; I.C.S., F.F.C. and M.S. performed experiments, I.C.S., F.F.C, M.S. analyzed data, I.C.S., M.C.I and K.D.A. interpreted results of experiments, I.C.S. prepared figures, I.C.S. and K.D.A. drafted manuscript, M.C.I. and K.D.A. edited and revised manuscript, I.C.S, F.F.C., M.S., M.C.I. and K.D.A. approved final version of manuscript.

REFERENCES

1. Barauna VG, Rosa KT, Irigoyen MC, Oliveira EM. Effects of resistance training on ventricular function and hypertrophy in a rat model. *Clinical Medicine & Research* 2:114-120, 2007
2. Brito JO, Ponciano K, Figueroa D, Bernardes N, Sanches IC, Irigoyen MC, De Angelis K. Parasympathetic dysfunction is associated with insulin resistance in fructose-fed female rats. *Braz J Med Biol Res* 41: 804-808, 2008.
3. Cohen AJ, McCarthy DM, Rossetti RR. Renin secretion by the spontaneously diabetic rat. *Diabetes* 35: 341-346, 1986.
4. Dall'Ago P, Fernandes TG, Machado UF, Belló AA, Irigoyen MC. Baroreflex and chemoreflex dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30: 119-124.
5. De Angelis Lobo D'Avila K, Gadonski G, Fang J, Dall'Ago P, Albuquerque VL, Peixoto LR, Fernandes TG, Irigoyen MC. Exercise reverses peripheral insulin resistance in trained L-NAME-hypertensive rats. *Hypertension* 34: 768-772, 1999.

6. De Angelis K, Schaan BD, Maeda CY, Dall'Ago P, Wichi RB, Irigoyen MC. Cardiovascular control in experimental diabetes. *Braz J Med Biol Res* 35: 1091-1100, 2002.
7. De Angelis KL, Oliveira AR, Werner A, Bock P, Bello-Klein A, Fernandes TG, Belló AA, Irigoyen MC. Exercise training in aging: hemodynamic, metabolic, and oxidative stress evaluations. *Hypertension* 30: 767-771, 1997.
8. De Angelis KLD, Oliveira AR, Dall'Ago P, Peixoto LRA, Gadonski G, Fernandes TG, Irigoyen MC. Effects of exercise training in autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Braz J Med Biol Res* 33: 635-641, 2000.
9. De Blieux PM, Barbee RW, McDonough KH, Sheperd RE. Exercise training improves cardiac performance in diabetic rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 203: 209-213, 1993.
10. Ewing D, Campbell I, Clarke B. The natural history of diabetic autonomic neuropathy. *Quarterly Journal of Medicine* 49: 95-108, 1980.
11. Fazan R, Ballejo G, Salgado MC, Moraes M, Salgado HC. Heart rate variability and baroreceptor function in chronic diabetic rats. *Hypertension* 30 (Part 2): 632-635, 1997.
12. Flores LJ, Figueroa D, Sanches IC, Jorge L, Irigoyen MC, Rodrigues B, De Angelis K. Effects of exercise training on autonomic dysfunction management in an experimental model of menopause and myocardial infarction. *Menopause* 17: 712-717, 2010.
13. Flues K, Paulini J, Brito S, Sanches IC, Consolim-Colombo F, Irigoyen MC, De Angelis K. Exercise training associated with estrogen therapy induced

- cardiovascular benefits after ovarian hormones deprivation. *Maturitas* 65: 267-271, 2010.
14. Fry AC. The role of resistance exercise intensity on muscle fibre adaptations. *Sports Med* 34(10): 663-79, 2004.
 15. Ibañez J, Izquierdo M, Argüelles I, Forga L, Larrión JL, García-Unciti M, Idoate F, Gorostiaga EM. Twice-Weekly Progressive Resistance Training Decreases Abdominal Fat and Improves Insulin Sensitivity in Older Men With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 28: 662-667, 2005.
 16. Irigoyen MC, Paulini J, Flores LJF, Flues K, Bertagnolli M, Moreira ED, Consolim-Colombo F, Belló-Klein A, De Angelis K. Exercise training improves baroreflex sensitivity associated with oxidative stress reduction in ovariectomized rats. *Hypertension* 46: 998-1003, 2005.
 17. Jackson CV, Carrier GO. Influence of short-term experimental diabetes on blood pressure and heart rate in response to norepinephrine and angiotensin II in the conscious rat. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 5: 260-265, 1983.
 18. Jarret RJ. Cardiovascular disease and hypertension in diabetes mellitus. *Diabetes/Metabolism Reviews* 5: 547-558, 1989.
 19. Jermendy G. Clinical consequences of cardiovascular autonomic neuropathy in diabetic patients. *Acta Diabetol* 40 (Suppl 2) S370-S374, 2003.
 20. Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 48: 2129-2139, 1969.
 21. Kannel WB. Metabolic risk factors for coronary heart disease in women: perspectives from the Framingham study. *Am Heart J* 114: 413-429, 1987.

22. Kaseta JR, Skafar DF, Ram JL, Jacober SJ, Sowers JR. Cardiovascular disease in the diabetic woman. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 1835-1838, 1999.
23. Kraemer WJ, Ratamess NA. Fundamentals of resistance training: progression and exercise prescription. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, v.36 (4), 674-688, 2004.
24. Krisan AD, Collins DE, Crain AM, Kwong CC, Singh MK, Bernard JR, Yaspelkis III BB. Resistance training enhances components of the insulin signaling cascade in normal and high-fat-fed rodents skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 96: 1691-1700, 2004
25. Maeda CY, Fernandes TG, Lulhier F, Irigoyen MC. Streptozotocin diabetes modifies arterial pressure and baroreflex sensitivity in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 28: 497-501, 1995.
26. Maeda CY, Fernandes TG, Timm HB, Irigoyen MC. Autonomic dysfunction in short-term experimental diabetes. *Hypertension* 26 (Part 2): 1000-1004, 1995.
27. Monckton G, Pehowich E. Autonomic neuropathy in the streptozotocin diabetic rat. *Canadian Journal of Neurological Sciences* 7: 135-142, 1980.
28. Narici MV, Maffulli N. Sarcopenia: characteristics, mechanisms and functional significance. *Br Med Bull* 95: 139-59, 2010.
29. Nilsson MI, Greene NP, Dobson JP, Wiggs MP, Gasier HG, Macias BR, Shimkus KL, Fluckey JD. Insulin resistance syndrome blunts the mitochondrial anabolic response following resistance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299(3): E466-E474, 2010.
30. Pereira GB, Prestes J, Leite RD, Magosso RF, Peixoto FS, Marqueti Rde C, Shiguemoto GE, Selistre-de-Araújo HS, Baldissera V, Perez SE. Effects of

- ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in rat calcaneal tendon. *Connect Tissue Res* 51(6): 459-466, 2010.
31. Pollock ML, Franklin BA, Balady GJ, Chaitman BL, Fleg JL, Limacher M, Piña I.L, Stein RA, Williams M, Bazzarre T. Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease. *Circulation* 101: 828-833, 2000.
32. Ramalho AC, Lima ML, Nunes F, Cambuí Z, Barbosa C, Andrade A, Viana A, Martins M, Abrantes V, Aragão C, Temístocles M. The effect of resistance versus aerobic training on metabolic control in patients with type-1 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice* 72(3): 271-276, 2006.
33. Resnick HE, Howard BV. Diabetes and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 53: 245-267, 2002.
34. Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda CT, Heeren MV, Irigoyen MC, De Angelis K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovascular Diabetology* 6:38, 2007.
35. Samsioe G. Cardiovascular disease in postmenopausal women. *Maturitas* 30: 11-18, 1998.
36. Sanches IC, Brito JO, Candido GO, Dias DS, Jorge L, Irigoyen MC, De Angelis K. Cardiometabolic benefits of exercise training in na experimental modelo f metabolic syndrome and menopause. *Menopause* 19(5): 562-568, 2011
37. Sanches IC, Sartori M, Jorge L, Irigoyen MC, De Angelis K. Tonic and reflex cardiovascular autonomic control in trained-female rats. *Braz J Med Biol Res* 42(10): 942-948, 2009.

38. Sigal RJ, Kenny GP, Wasserman DH, Castaneda-Sceppa C. Physical activity/exercise and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27(10): 2518-2539, 2004.
39. Silva GJ, Brum PC, Negrão CE, Krieger EM. Acute and chronic effects of exercise on baroreflexes in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 30: 714-719, 1997.
40. Silveira LCR, Tezini GCSV, Schujmann DS, Porto JM, Rossi BRO, Souza HCD. Comparison of the effects of aerobic and resistance training on cardiac autonomic adaptations in ovariectomized rats. *Autonomic Neuroscience* 162(1-2): 35-42, 2011.
41. Souza SBC, Flues K, Paulini J, Mostarda C, Rodrigues B, Souza LE, Irigoyen MC, De Angelis K. Role of exercise training in cardiovascular autonomic dysfunction and mortality in diabetic ovariectomized rats. *Hypertension* 50: 786-791, 2007
42. Sowers J. Diabetes mellitus and cardiovascular disease in women. *Arch Intern Med* 158: 617-621, 1998.
43. Tomlinson KG, Gardiner SM, Hebden RA, Bennett T. Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. *Pharmacological Reviews* 44: 103-150, 1992.
44. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27: 1047-1053, 2004.
45. Williams AD, Almond J, Ahuja KD, Beard DC, Robertson IK, Ball MJ. Cardiovascular and metabolic effects of community based resistance training in an older population. *J Sci Med Sport*, 14(4):331-337, 2011.

46. Williams MA, Haskell WL, Ades PA, Amsterdam EA, Bittner V, Franklin BA, Gulanick M, Laing ST, Stewart KJ. Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease: 2007 update. *Circulation*, 116: 572-584, 2007.
47. Wise FM, Patrick JM. Resistance exercise in cardiac rehabilitation. *Clinical Rehabilitation* 25(12): 1059-1065, 2011.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Stairs adapted for rats used in this study.

Figure 2. Lactate levels after each climb in maximal load test (LT: lactate threshold).

Figure 3. Maximal load expressed in (A) absolute and (B) normalized values in control (C), diabetic ovariectomized sedentary (DOS) and trained (DOT) groups.

* $p < 0.05$ vs. C, # $p < 0.05$ vs. DOS, † $p < 0.05$ vs. initial values in the same group, ‡ $p < 0.05$ vs. intermediate values in the same group.

Figure 4. (A) Left ventricle, (B) soleus and (C) plantar muscles in control (C), diabetic ovariectomized sedentary (DOS) and trained (DOT) groups. * $p < 0.05$ vs. C, # $p < 0.05$ vs. DOS.

Figure 5. Mean arterial pressure and heart rate in control (C), diabetic ovariectomized sedentary (DOS) and trained (DOT) groups. * $p < 0.05$ vs. C, # $p < 0.05$ vs. DOS.

Figure 1.

Figure 2

Figure 3

Figure 4

Figure 5

TABLES

Table 1. Prescription details of the resistance exercise training.

Table 2. Body weight, glycemia and maximal load represented by percentage of body weight in control (C), diabetic ovariectomized sedentary (DOS) and trained (DOT) groups.