

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO SOBRE A
FUNÇÃO VASCULAR DE RATOS COM SOBRECARGA
CRÔNICA DE FERRO**

Emilly Martinelli Rossi

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória, Março de 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Centro de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

REGISTRO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE TESE DA CANDIDATA AO
TÍTULO DE DOUTORA PELO PPGCF/CCS/UFES

Nº. Matrícula da Candidata: 2015241182

A comissão julgadora que examinou a tese de doutorado, intitulada "Efeitos da sobrecarga de ferro no treinamento físico aeróbico sobre a função vascular de ratos", apresentada e defendida publicamente pela aluna Emilly Martinelli Rossi, no dia 31 de março de 2020, às 14 horas, decidiu, por unanimidade, aprovar a referida tese de doutorado e, portanto, declara que a aluna faz jus à obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas.

Vitória-ES, 31 de março de 2020

Prof. Dr. Leonardo dos Santos
Orientador (UFES)

Prof. Dr. André Soares Leopoldo
Membro interno (UFES)

Prof^a. Dr^a. Camila Almenara C. Pereira
Co Orientadora (UFES)

Prof^a. Dr^a. Girlandia Alexandre Brasil
Membro externo (UUV)

Prof^a. Dr^a. Nazaré Souza Bissoli
Membro interno (UFES)

Prof. Dr. Erick Roberto G. Claudio
Membro externo (UFES)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Vitória, 31 de março de 2020

Rossi, Emilly Martinelli 1987

Efeitos do treinamento físico aeróbico sobre a função vascular de ratos com sobrecarga crônica de ferro. Vitória – 2020.

xv, 89 p., (UFES, D.Sc., Ciências Fisiológicas, 2018)

Orientador: Prof. Dr. Leonardo dos Santos. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. 1. Sobrecarga de ferro. 2. Óxido nítrico. 3. Função endotelial. 4. Exercício aeróbico. 5. Corrida em esteira. 6. Estresse oxidativo.

Dedico este trabalho a minha **Mãe**, devo tudo o que sou e tudo que acredito a você. Obrigada por me mostrar o quanto o estudo é importante! As minhas tias queridas, **Ivone** e **Sueli**, pelo carinho, torcida e orações. Aos **professores** que foram exemplos e incentivos.

“..Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu. É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu...” Trem bala (Ana Vilela)

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por ter colocado no meu caminho pessoas tão especiais e por me dar força e saúde para realizar meus sonhos.

Durante o período da pós-graduação contei com ajuda de diversas pessoas, que tornaram mais simples o caminho diante das dificuldades, dos obstáculos e do desânimo. A amizade e o carinho por vocês eu carrego para vida, além dos limites da Universidade. Nesse sentido, gostaria agradecer em especial:

Ao orientador Prof. **Leonardo**, por ser modelo de pessoa e profissional em quem tanto me espelho. Obrigada professor pelo seu enorme apoio, paciência e incentivo, que me ajudaram a vencer as dificuldades e a crescer como pessoa e profissional, a minha gratidão!

À co-orientadora Prof^a **Camila**, obrigada por aceitar ser minha chefe e dividir comigo as angústias e as alegrias nos dias dos experimentos. Por sempre se mostrar disposta a ajudar e inclusive a paciência de fazer os experimentos SEMPRE nos feriados. Meu muito obrigada por todo carinho, dedicação e incentivo.

À minha duplinha **Renata**, obrigada também por dividir comigo as angústias e alegrias; por dividir momentos de limpeza, de tratamento nos ratinhos e claro, aqueles 2 meses de treino na esteira (sempre era a última leva com fé em Deus, mas a última leve nunca que chegava); a aflição no deslocamento com os ratos UFES/Maruipe-UFES/Goiabeiras, torcendo para não parar em nenhuma blitz, enfim, muito momentos que não consigo imaginar o quão difícil seria sem a sua companhia. Parceiras em seguir de cabeça erguida os pequenos obstáculos que apareciam. Obrigada dupla!

À **Elis**, que virou uma grande amiga! Obrigada por todos os momentos que passamos e continuaremos passando juntas; agradeço os conselhos, as gargalhadas e experiências juntas. Tenho uma consideração e carinho enorme por você.

Ao Prof. **Dalton**, querido Chefe, obrigada pelas conversas e conselhos, sempre muito dedicado e cuidadoso com o laboratório e os alunos. Obrigada por todo carinho!

A Prof^a **Ivanita Stefanon** e Prof^a **Alessandra**, as chefas divas do lemc. Agradeço os conhecimentos compartilhados durante os seminários, todo carinho e dedicação.

Aos **professores** do **PPGCF** pelos conhecimentos compartilhados

Aos colegas do **LEMC**, pela convivência, seminários e o cantinho do café com muitas risadas e fofocas: Cindy, Dieli, Filetti, Gilson, João, Karol Zuqui, Marito, Sabrina, Strela, Tati, Thiago, Vinícius.

A todos os amigos do **PPGCF/UFES**, que juntos compartilhamos muitos momentos de preocupação e alegria no decorrer das disciplinas, nos esbarrões pelos corredores, nas festinhas na varanda. Agradeço amizade dentro e fora da universidade: Antônio, Pollyana, Gustavo, Edgar, Dudu, Charles, Matheus Cavatti e Loureiro, Igor, Thaís, Jordana, Silas e Oscar.

Aos membros da **CEUA-UFES** (Comissão de Ética no Uso de Animais) pela convivência, boas reuniões e aprendizados, em especial Rodolpho Barros, Roger Lyrio, Breno Salgado e Argentina.

Ao namorado **Rafael**, que na reta final desta caminhada, Deus colocou em minha vida para me ensinar alegre e pacientemente, como renovar o entusiasmo, a esperança e, sobretudo os sonhos. Obrigada por todo carinho, cuidado e companheirismo tão valiosos nos momentos de desânimo e cansaço. Obrigada por tornar este processo mais leve, principalmente com os kits anti-stress – chocolates – essenciais para tardes serem produtivas.

Às minhas grandes amigas, obrigada por tantas vezes compreenderem minha distância. Obrigada pelas palavras de conforto, pela diversão, pelo apoio nos momentos difíceis e, acima de tudo, por saber que posso sempre contar com vocês: **Janaina, Lorena e Néia**.

À minha prima **Priscila**, um agradecimento especial. Pri, você é meu exemplo de perseverança e dedicação. Obrigada pelos conselhos e por todo suporte material e emocional, especialmente nos momentos de desânimo e tristeza.

Ao **LHMI** e **LHT** pelo suporte técnico na preparação e análise de amostras para os estudos morfológicos. E ao **LAFIBE**, pela disponibilidade de espaço para nossos animais e na utilização da esteira.

Agradeço aos colaboradores do **HUCAM** pela mensuração dos parâmetros do ferro no sangue.

Agradeço as agências de fomento: **CNPq, CAPES e FAPES**.

SUMÁRIO

RESUMO	15
ABSTRACT	16
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Doenças cardiovasculares e exercício físico.....	17
1.1.1 Estresse oxidativo e sistema antioxidante.....	20
1.2 Exercício Físico e sua relação com ferro.....	22
1.3 Homeostase do ferro no organismo.....	24
1.4 Sobrecarga de ferro e estresse oxidativo.....	28
1.5 Justificativa e Hipótese.....	32
2 OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo Geral.....	33
2.2 Objetivos Específicos.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Animais Experimentais.....	34
1.1.1 Protocolo de sobrecarga crônica com ferro.....	34
3.1.2 Protocolo de treinamento físico aeróbico.....	34
3.1.2.1 Teste de velocidade máxima de corrida.....	36
3.2 Hemodinâmica Arterial.....	37
3.3 Determinação do ferro sérico e avaliação biométrica.....	38
3.4 Determinação do ferro tecidual.....	38
3.5 Análise histológica.....	39
3.6 Avaliação da reatividade da artéria aorta torácica.....	40
3.6.1 Avaliação da reatividade vascular ao cloreto de potássio.....	42
3.6.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio.....	43
3.6.3 Protocolos Experimentais.....	43
3.6.3.1 Resposta vasoconstritora à fenilefrina.....	43
3.7 Detecção <i>in situ</i> da produção de óxido nítrico e de ânion superóxido em aorta.....	44
3.8 Expressão proteica por western blotting.....	45
3.9 Análise Estatística.....	46

4 RESULTADOS	48
4.1 Efeitos da sobrecarga de ferro e do treinamento aeróbico sobre a capacidade de corrida.....	48
4.2 Efeitos da sobrecarga de ferro e do treinamento aeróbico sobre as características fenotípicas do modelo experimental.....	49
4.3 Efeitos da sobrecarga de ferro e do treinamento aeróbico sobre os parâmetros hemodinâmicos.....	52
4.4 Efeitos da sobrecarga de ferro e do treinamento aeróbico na morfologia da e nos depósitos de ferro da aorta.....	52
4.5 Efeitos da sobrecarga de ferro e do treinamento aeróbico na reatividade vascular da aorta.....	55
4.5.1 Efeitos da sobrecarga de ferro e do treinamento aeróbico sobre a participação da via do óxido nítrico na reatividade vascular da aorta.....	56
4.5.2 Efeitos da sobrecarga de ferro e do treinamento aeróbico sobre a produção de O ₂ ^{•-} na aorta.....	59
4.5.3 Efeitos da sobrecarga de ferro e do treinamento aeróbico sobre os mecanismos de defesa antioxidante na aorta.....	62
4.5.4 Efeitos da sobrecarga de ferro e do treinamento aeróbico no papel do peróxido hidrogênio na aorta.....	63
5 DISCUSSÃO	65
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
7 REFERÊNCIAS	76
ANEXOS	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos do treinamento aerobico e da sobrecarga crônica ferro sobre capacidade aeróbica dos ratos.....	48
Tabela 2. Efeitos da sobrecarga de ferro e do treinamento aeróbico nos parâmetros hematológicos em ratos.....	49
Tabela 3. Efeitos da sobrecarga de ferro e do treinamento aeróbico nos parâmetros hematológicos em ratos.....	52

LISTA DE FIGURAS E LEGENDAS

Figura 1: Esquema representativo da produção das principais espécies reativas do oxigênio e atuação das principais enzimas antioxidantes.....	21
Figura 2. Proteínas envolvidas na absorção do ferro no epitélio duodenal.....	26
Figura 3. Homeostase corporal do ferro.....	27
Figura 4. Esteira rolante para ratos.....	35
Figura 5. Representação esquemática dos protocolos experimentais.....	37
Figura 6. (A) Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, antes da manipulação para retirada do tecido conectivo e adiposo; (B) Após a retirada dos tecidos e sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 3-4 mm.....	41
Figura 7. Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular in vitro.....	41
Figura 8. Registro das curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio.....	42
Figura 9. Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais.....	43
Figura 10. Efeitos da sobrecarga crônica de ferro e do treinamento físico aeróbico nos depósitos de ferro no músculo gastrocnêmio.....	50
Figura 11. Efeitos da sobrecarga crônica de ferro e do treinamento físico aeróbico nos depósitos de ferro no fígado.....	51
Figura 12. Efeitos da sobrecarga crônica de ferro e do treinamento físico aeróbico na morfologia da aorta torácica de ratos.....	53
Figura 13. Efeitos da sobrecarga crônica de ferro e do treinamento físico aeróbico no depósito de ferro em aorta torácica de ratos.....	54

Figura 14. Efeitos da sobrecarga crônica de ferro e do treinamento físico aeróbico nas curvas concentração-resposta à fenilefrina na aorta torácica de ratos.....	55
Figura 15. O papel do óxido nítrico nas curvas concentração-resposta à fenilefrina na sobrecarga de ferro e do treinamento físico aeróbico na aorta torácica de ratos.....	56
Figura 16. Detecção <i>in situ</i> de NO em segmentos de aorta torácica de ratos.....	58
Figura 17. Efeitos da sobrecarga crônica de ferro e do treinamento físico aeróbico na expressão da eNOS.....	59
Figura 18. O papel das espécies reativas de oxigênio nos efeitos vasculares na sobrecarga de ferro e no treinamento físico aeróbico na aorta torácica de ratos.....	60
Figura 19. Produção <i>in situ</i> de O ₂ ^{•-} em segmentos de aorta torácica de ratos.....	61
Figura 20. O papel da superóxido dismutase nos efeitos vasculares da sobrecarga de ferro e do treinamento físico aeróbico em aorta torácica de ratos.....	62
Figura 21. O papel do peróxido de hidrogênio e do radical hidroxila nos efeitos vasculares da sobrecarga de ferro e do treinamento físico aeróbico na aorta torácica de ratos.....	64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIÇÕES

ACh: Acetilcolina

ANOVA: Análise de Variância

CAPES: Coordenadoria de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior

CEUA: Comissão de Ética em Uso de Animais

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DCV: Doenças cardiovasculares

DAF-2: 4,5-diaminofluoresceína

DETCA: ácido dietilditiocarbâmico

DHE: Dihidroetídio

DMSO: dimetil-sulfóxido

DMT-1: Transportador de metal divalente 1

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EPM: Erro padrão da média

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

FC: Frequência Cardíaca

Fe: Ferro

Fe²⁺: Ferro ferroso

Fe³⁺: Ferro férrico

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HFE: gene

i.p: via intraperitoneal

KCl: Cloreto de potássio

NADPH oxidase: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase

NaCl: Cloreto de sódio

NO: Óxido Nítrico

NOS: Óxido Nítrico Sintase

O₂^{-•}: Ânion superóxido

O₂: Oxigênio

OH•: radical hidroxila

PA: Pressão arterial

PAD: Pressão arterial diastólica

PAS: Pressão arterial sistólica

PE: Fenilefrina

SOD: Superóxido dismutase

Tf: Transferrina

TfR: Receptor da transferrina

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

VMC: Velocidade máxima de corrida

RESUMO

O exercício físico é sabidamente uma abordagem não farmacológica eficaz tanto na prevenção quanto no tratamento de doenças cardiovasculares. Como o ferro é um elemento essencial em muitos processos fisiológicos, incluindo a síntese de hemoglobina e mioglobina, e dessa forma desempenha papel no transporte de oxigênio, muitos atletas usam suplemento de ferro para melhorar o desempenho nos treinamentos. Nesse sentido, se por um lado a deficiência de ferro pode provocar anemia e prejudicar a homeostase corporal, por outro lado, sua sobrecarga pode ser ainda mais prejudicial à saúde. De fato, a sobrecarga de ferro está associada ao estresse oxidativo e danos a vários sistemas, inclusive o cardiovascular. Assim, neste estudo tivemos como objetivo avaliar os a influência da sobrecarga de ferro sobre os efeitos vasculares benéficos promovidos pelo treinamento físico aeróbico em ratos. Para isso, ratos Wistar foram tratados com 100 mg/kg/dia de ferro-dextrano ou solução salina 0,9%, ip, cinco vezes na semana durante quatro semanas, e, posteriormente, submetidos a um protocolo de exercícios aeróbicos de intensidade moderada em esteira, com duração de 60 min/dia, cinco vezes por semana durante oito semanas, ou mantidos sem exercício por igual período. Após 13 semanas dos protocolos de tratamento, o modelo de sobrecarga de ferro foi confirmado com aumento dos níveis séricos de ferro, saturação de transferrina e deposição de ferro no fígado, no músculo gastrocnêmio e na aorta. Confirmando a eficiência do protocolo de exercício físico, todos os animais exercitados aumentaram a capacidade física ao final do período de acompanhamento, avaliada como aumento da velocidade máxima e do tempo até a fadiga. Identificamos que o exercício reduziu a resposta vasoconstritora dos anéis aórticos isolados, associado ao aumento da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO). Ademais, a redução da vasoconstrição no grupo exercitado foi revertida pela incubação com inibidor da superóxido dismutase (SOD), sugerindo atividade aumentada dessa enzima, somado ao aumento da expressão de catalase, reforçando os mecanismos antioxidantes nesse grupo. Todavia, esses benefícios na vasculatura não foram observados em ratos previamente submetidos à sobrecarga de ferro. Em conclusão, apesar dos conhecidos efeitos benéficos do exercício aeróbico na vasculatura, nossos resultados indicam que um estado prévio de sobrecarga de ferro é capaz de impedir o efeito anticontrátil mediado pelo aumento da biodisponibilidade do NO e pela melhora da resposta antioxidante endógena normalmente promovida pelo exercício.

Palavras-chave: sobrecarga de ferro; óxido nítrico; função endotelial; exercício aeróbico; corrida em esteira; estresse oxidativo

ABSTRACT

Physical exercise is an effective non-pharmacological approach for prevention and treatment of cardiovascular diseases. Also, because iron is essential element in many physiological processes including hemoglobin and myoglobin synthesis, thereby playing a role on oxygen transport, many athletes use iron supplement to improve training performance. In this sense, although iron deficiency can cause anemia and impair body homeostasis, on the other hand, its overload can be even more harmful to health. Indeed, iron overload is associated with oxidative stress and damage to various systems, including cardiovascular. Thus, we aimed to identify the influence of iron overload on the beneficial vascular effects promoted by aerobic physical training in rats. To investigate it, male Wistar rats were treated with 100 mg/kg/day iron-dextran or 0.9% saline, ip, five times a week for four weeks, and then underwent aerobic exercise protocol on a treadmill at moderate intensity, 60 min/day, five days a week for eight weeks, or kept without exercise for an equal period. After 13 weeks of the treatment protocol, the iron overload model was confirmed with increased serum levels of iron, transferrin saturation and iron deposition in the liver, gastrocnemius muscle and aorta. Confirming the efficiency of the physical exercise protocol, all exercised animals increased physical capacity at the end of the followup, evaluated as increased speed and maximum time to failure. We identified that the exercise reduced vasoconstrictor response of isolated aortic rings, associated with higher bioavailability of nitric oxide (NO) and reduced oxidative stress. Furthermore, the reduced vasoconstriction in the exercised group was reversed by incubation with superoxide dismutase (SOD) inhibitor, suggesting increased SOD activity, added to catalase overexpression given by the exercise was lost in iron overload rats and the catalase was overexpressed, reinforcing the oxidative defenses on the aorta of exercised animals. However, these benefits to the vasculature were not observed in rats previously subjected to iron overload. In conclusion, despite the known beneficial effects of aerobic exercise on vasculature, our results indicate that a previous state of iron overload is able to prevent the anticontractile effect mediated by increased NO bioavailability and by the improvement of the endogenous antioxidant responses normally promoted by exercise.

Key words: iron overload; nitric oxide; endothelial function; aerobic exercise; treadmill running; oxidative stress.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças cardiovasculares e exercício físico

Com a evolução das pesquisas para novos medicamentos e investimentos na área da saúde, diferentes doenças infectocontagiosas foram controladas, tendo como consequência a melhoria na saúde da população e um aumento na expectativa de vida. Concomitante a esse fato, tornam-se mais frequentes as doenças crônico-degenerativas, como obesidade, diabetes, hipertensão, doenças reumáticas etc. As doenças cardiovasculares (DCV) constituem-se entre as principais causas de morte no mundo, independente do sexo (Benjamin et al., 2019). Além disso, estão relacionados a limitações na qualidade de vida, nos aspectos físico e psicossocial, e reflete no maior consumo de serviços de saúde, maiores taxas de internação hospitalar, bem como tratamento prolongado e custos financeiros substanciais para o sistema público de saúde (Stevens et al., 2018). No Brasil, as DCV representam 27,7% das causas dos óbitos, (Ministério da Saúde, 2016) além de sua morbidade tem sido considerada um fator de impacto na saúde pública pelo número de internações significativas (Schmidt et al., 2011). As internações por doenças vasculares representam cerca de 10,1% dos casos no Brasil, sendo de maior incidência em indivíduos acima de 60 anos (Ministério da Saúde, 2016). O comprometimento da função vascular está presente na maioria dos casos das DCV, como ocorre no infarto, hipertensão e acidente vascular cerebral, tendo como o evento fisiopatológico mais comum nessas doenças, tanto em humanos quanto nos modelos experimentais, o prejuízo na função do endotélio vascular.

As artérias e as veias são compostas por três camadas na parede vascular, exceto os pequenos vasos: camada adventícia, localizada mais externamente e composta de tecido conjuntivo; camada média que é constituída por células musculares lisas e a camada íntima, constituída por uma única camada de células endoteliais que reveste a superfície interna dos vasos sanguíneos (Carvalho et al., 2001). O endotélio vascular é um dos responsáveis pela manutenção da homeostase vascular por diversos mecanismos. Em condições fisiológicas o endotélio mantém o tônus vascular,

inibe a agregação plaquetária e a proliferação das células musculares lisas e controla a resposta inflamatória. Os principais fatores que controlam o tônus vascular negativamente, ou seja, vasodilatadores produzidos pelo endotélio são: o óxido nítrico, o fator hiperpolarizante derivado do endotélio e a prostaciclina. Dentre os principais fatores contráteis estão: as prostaglandinas, os tromboxanos, a endotelina I, a angiotensina II e as espécies reativas do oxigênio (Ghisi et al., 2010). A disfunção endotelial, é caracterizada pelo desequilíbrio dos efeitos vasoconstritores sobre os efeitos vasodilatadores, geralmente como resultado de uma diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), resultando em maior contratilidade e alteração do relaxamento vascular dependente do endotélio (Carvalho et al., 2001).

Assim como em outras situações de doenças, a utilização de terapias não-farmacológicas adjuvantes para redução dos danos cardiovasculares, tal como a prática de exercício físico, tem sido objeto de pesquisa, visto que normalmente possuem baixo custo e fácil acesso à população. O exercício físico é uma ferramenta capaz de propiciar melhorias e adaptações bioquímicas e fisiológicas nos indivíduos, apresentando benefícios na redução da pressão arterial e do risco de doenças cardiovasculares, melhora do diabetes tipo 2 e resistência à insulina, proteção contra complicações vasculares, obesidade e hiperlipidemia e, conseqüentemente, melhora a qualidade de vida e longevidade (Tanaka et al., 2000; Zanesco e Zaros, 2009; Sharman et al., 2015). Além de atenuar a evolução das doenças, o exercício contribui também para o controle e prevenção de doenças crônico-degenerativas, estando associado ao retardo do declínio funcional (Zanesco e Zaros, 2009). Por esses motivos, o exercício físico tem sido recomendado não somente para fins terapêuticos, mas também como um agente preventivo de doenças.

Já está bem descrito na literatura que o exercício físico de caráter ou de predominância aeróbica age positivamente sobre o funcionamento do sistema cardiovascular. Em relação às alterações relacionadas ao sistema vascular, as respostas adaptativas ao exercício incluem principalmente alterações na função endotelial através da modulação do NO (Graham et al., 2004; Jordão et

al., 2017; Couto et al., 2019), que é produzido pelo endotélio e possui uma importante atuação no relaxamento da musculatura lisa vascular, sendo considerado um potente vasodilatador (Graham et al., 2004). A síntese e a biodisponibilidade do NO são essenciais para a função homeostática do endotélio, podendo a prática de exercícios físicos influenciar em ambas. Portanto, o exercício físico é considerado um indutor do NO, uma vez que o aumento da liberação e/ou inibição da sua degradação, está relacionado ao estresse de cisalhamento endotelial (Tinken et al., 2010).

A liberação do NO na parede vascular pode ocorrer decorrente de estímulos fisiológicos em resposta ao aumento do fluxo sanguíneo pela força exercida contra o endotélio e a pressão que o sangue exerce sobre a parede vascular, durante realização do exercício físico (Ghisi et al., 2010). Estes mecanismos promovem adaptações fisiológicas e metabólicas, o que acarreta o aumento da expressão da óxido nítrico síntase endotelial (eNOS) e, conseqüentemente, aumento na liberação/produção do NO e uma melhora na vasodilatação dependente do endotélio (Fleming, 2010). Sendo assim, o exercício físico de fato reduz as respostas contratéis (Jordão et al., 2017; Couto et al., 2019) por melhorar a resposta da modulação exercida pelo NO, promovendo a manutenção da integridade da função endotelial (McGowan et al., 2006; Bechara et al., 2008; Faria et al., 2010).

Sabe-se que o exercício físico aeróbico é capaz de reduzir a lesão endotelial e, conseqüentemente, melhorar o relaxamento vascular pelo aumento da biodisponibilidade de NO e a reduzida produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em ratos (Bechara, 2008; Braga et al., 2015; Tanaka, 2015; Jordão et al., 2015). De fato, o exercício aeróbico moderado reduz a resposta vasoconstritora à fenilefrina (Jordão et al., 2017; Yea et al., 2019), mediado pelo NO, uma vez que melhora não apenas a sua síntese e biodisponibilidade, mas também a sua ação no músculo liso. Conforme demonstrado em estudos com anéis de aorta torácica de ratos, o estresse de cisalhamento induzido pelo exercício físico leva ao aumento da sensibilidade do músculo liso vascular ao NO (Delp et al., 1993; Lash et al., 1997; McAllister et al., 2005). Foi relatado também este aumento da sensibilidade ao NO induzido pelo exercício físico em

outras artérias como nas coronárias (Haskell et al., 1993) e nas artérias mesentéricas (Chen et al., 2001).

1.1.1 Estresse oxidativo e sistema antioxidante

Na doença vascular, a função do endotélio é afetada pelo estresse oxidativo, que causa a diminuição da biodisponibilidade de NO, apoptose e angiogênese (Carvalho et al., 2001). O estresse oxidativo é uma condição que envolve a predominância da produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) e uma incapacidade das enzimas antioxidantes controlarem esta produção (Powers e Jackson, 2008). Dentre as principais EROs destacam-se: ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}), o peroxinitrito ($ONOO^-$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

O $O_2^{\cdot-}$ é formado pela redução univalente do oxigênio que é mediada por enzimas como a NADPH oxidase e xantinas oxidases, além da eNOS desacoplada. O $O_2^{\cdot-}$ possui uma destacada relevância entre as EROs por promover diretamente alterações na função vascular e também é fundamental na produção de outras EROs. Ele reage com o NO inativando-o e originando o $ONOO^-$, culminando na diminuição da biodisponibilidade de NO, processo responsável pela disfunção endotelial e, conseqüentemente, à diminuição da vasodilatação (Fernandes et al., 2017). Já o H_2O_2 é capaz de desempenhar diferentes mecanismos no tônus vascular, variando de acordo com o letio vascular e a sua concentração. Na presença de metais de transição, geralmente ferro ou cobre, o H_2O_2 é o componente essencial na reação de Fenton e Haber-Weiss que forma metabólitos altamente reativos, como OH^{\cdot} (Powers e Jackson, 2008), que é o mais reativo das EROs, visto que não possui uma defesa endógena capaz de neutralizar sua ação (Schneider e Oliveira, 2004).

Assim, o comprometimento na modulação endotelial induzida pelo NO é um fator chave para o desenvolvimento de DCV e o aumento das EROs, principalmente $O_2^{\cdot-}$, contribui para esse processo promovendo a degradação metabólica do NO e formando $ONOO^-$ (Fernandes et al., 2017). Além disso, em situações não-fisiológicas, a eNOS pode se tornar uma produtora de radicais

livres, uma vez que a eNOS desacoplada passa a produzir $O_2^{\cdot-}$ no lugar do NO (Fleming, 2010). Essa situação exacerba o estresse oxidativo, mecanismo que influencia nas doenças cardiovasculares e também contribui para um processo inflamatório, presente na doença vascular (Carvalho et al., 2001; Higashi et al., 2009).

A prática de exercícios físicos é capaz de gerar adaptações celulares relacionadas à tolerância oxidativa e melhora do sistema antioxidante vascular (Schneider e Oliveira, 2004), que são mecanismos naturais, enzimáticos ou não, encarregados de impedir a formação ou inativar as EROs (Powers e Jackson, 2008; Powers et al., 2010). Dentre as principais enzimas antioxidantes vascular podemos destacar a superóxido dismutase (SOD), que possui três isoformas: a citoplasmática CuZn-SOD (SOD-1), a mitocondrial Mn-SOD (SOD-2) e a extracelular EC-SOD (SOD-3). É um dos principais sistemas de defesas de remoção do $O_2^{\cdot-}$, dismutando-o em H_2O_2 , o qual será convertido em H_2O e O_2 pelas enzimas catalase e glutathiona peroxidase. Portanto, essas enzimas evitam o acúmulo de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 na célula, prevenindo a formação do OH^{\cdot} pelas reações de Fenton e Haber-Weiss (Wardman e Candeias, 1996; Powers e Jackson, 2008), esquematizado na figura 1.

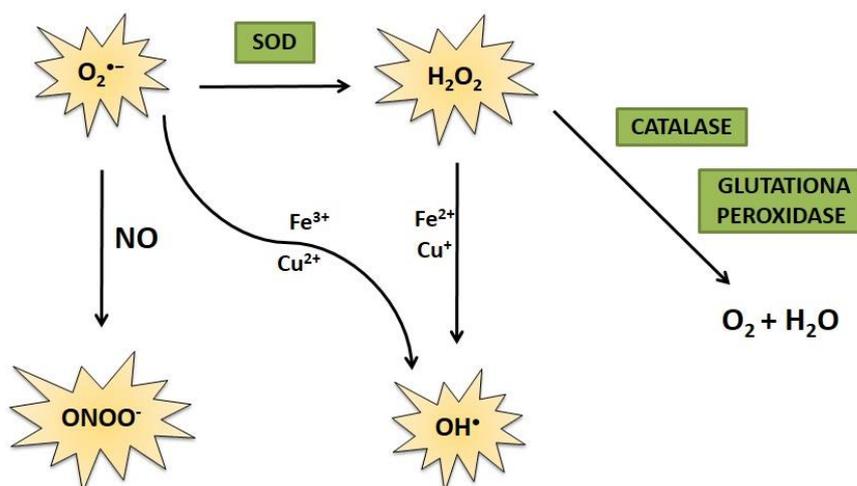


Figura 1: Esquema representativo da produção das principais espécies reativas do oxigênio e atuação das principais enzimas antioxidantes. Reação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) degrada o NO convertendo em peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) formado pela dismutação da SOD é convertido em O_2 e H_2O através da ação da catalase e da glutathiona. Formação de radical hidroxila (OH^{\cdot}) via reação de Fenton e Haber-Weiss.

Apesar de o estado oxidativo aumentar durante o exercício físico aeróbico, a longo prazo a síntese das enzimas antioxidantes (destacando a SOD e a catalase como as principais envolvidas) é aumentada, o que sugere um efeito crônico do exercício, como um mecanismo compensatório, contra o estresse oxidativo (Cooper et al., 2002; Schneider e Oliveira, 2004; Moraes et al., 2008; Powers et al., 2010). Portanto, o exercício físico aeróbico é essencial para a modulação das vias antioxidantes, sendo capaz de amenizar alterações patológicas presentes nos vasos, como mostra Gu et al. (2013) em seu estudo que utilizou ratos espontaneamente hipertensos (SHR) treinados e relatou aumento da atividade da SOD e da catalase, contribuindo para a diminuição da produção de EROs. Evidências mostram outras modalidades de exercício aeróbico, como a natação, também favorecem o aumento da expressão de enzimas antioxidantes nas artérias coronárias (Claudio et al., 2013; Claudio et al., 2017) e na aorta (Moraes et al., 2008; Jordão et al., 2017).

Como evidenciado, o exercício físico aeróbico reduz o estado oxidativo de células e tecidos por promover melhor eficácia dos mecanismos antioxidantes, como uma resposta adaptativa ao exercício (Cooper et al., 2002; Schneider e Oliveira, 2004; Powers et al., 2010), além de melhorar a vasodilatação pelo aumento na síntese e biodisponibilidade de NO (Graham et al., 2004; Yang et al., 2011), mediada pelo aumento da expressão da eNOS (Claudio et al., 2013).

1.2 Exercício Físico e sua relação com ferro

O ferro desempenha inúmeras funções no organismo, destacando o papel essencial no transporte de oxigênio e na produção de energia. Considerando esta estreita relação com exercício físico, o aporte de ferro adequado é importante para manutenção do desempenho físico em atletas de alto rendimento e nos demais praticantes de exercício físico (Alaunyte et al., 2015). O desequilíbrio das concentrações de ferro no organismo pode acarretar consequências fisiopatológicas. Por exemplo, a falta de ferro provoca a anemia do tipo ferropriva, com prejuízo do transporte de O₂ pelos eritrócitos, enquanto o excesso deste elemento pode causar toxicidade e está associada à formação

de radicais livres e peroxidação lípidica, comprometendo a função de diversos órgãos e sistemas (Muñoz et al., 2009).

A causa da diminuição do estoque de ferro é o desequilíbrio entre a quantidade absorvida, consumo e/ou perdas, que ocorre por diversos fatores como: necessidade aumentada desse metal (crescimento, menstruação, gestação), diminuição da oferta ou da absorção (baixa disponibilidade de ferro na dieta, doenças inflamatórias crônicas intestinais, gastrectomia, etc) e perdas de ferro (sangramento patológico por alterações do gastrointestinais) (Camaschella, 2015). A carência de ferro pode afetar negativamente o metabolismo aeróbico do organismo, em decorrência da diminuição na concentração sérica de hemoglobina, das enzimas envolvidas no processo oxidativo e da produção de energia (Auesrsperger et al., 2013; Alaunyte et al., 2015).

A anemia por deficiência de ferro é significativa em atletas de alto rendimento, como nos corredores de longa distância, em decorrência da rotina exaustiva de treinamento, condição descrita como anemia do atleta (Fuji et al., 2011; Diane, 2013; Fujii et al., 2014; Kobayashi et al., 2014). Fatores etiológicos que contribuem para depleção do ferro induzidos pelo exercício físico intenso são: ingestão insuficiente de Fe na dieta, hemorragia gastrintestinal, hemólise por impacto, suor e inflamação, além das perdas através do ciclo menstrual por atletas do sexo feminino (DellaValle, 2013; Alaunyte et al., 2015; Díaz et al., 2015). A prevalência do equilíbrio inadequado de ferro é mais suscetível em atletas do sexo feminino, pela combinação dos fatores das perdas de ferro e ciclo menstrual (DellaValle, 2013).

Como mencionado, a deficiência do ferro afeta o desempenho físico dos atletas, deteriorando o metabolismo aeróbico e prejudicando o rendimento dos treinos e competições (Diane et al., 2013; Díaz et al., 2015). Convencionalmente, a reposição oral de ferro é usada na prevenção ou no tratamento contra a deficiência de ferro (Tsalis et al., 2004), assim como as injeções intramusculares ou intravenosas (Pedlar et al., 2018) e a suplementação dietética de ferro (Burke et al., 2012). Embora a reposição de ferro nesses indivíduos seja de suma importância, a ingestão inadequada e não

monitorada pode levar à intoxicação ou até mesmo o excesso desse mineral no organismo (Auesrsperger et al., 2013; Alaunyte et al., 2015). O que facilita este quadro é o fácil acesso a medicamentos que contém ferro, como o sulfato ferroso, por ser vendido sem controle de receitas por prescrição médica (Schümann et al., 2012), por conta disto é um método que tem sido criticado devido aos efeitos colaterais e o aumento do risco de toxicidade associada ao uso exagerado/sem controle de suplementos de ferro (Burden et al., 2014; Peeling et al., 2014). Assim com a carência de ferro, o excesso de ferro também pode afetar o metabolismo aeróbio e o rendimento dos atletas causando fraqueza, fadiga e atrofia muscular, como consequências dos níveis excessivos de EROs (Reardon and Allen, 2013).

Estudo realizado em corredores apontou um quadro de deficiência de ferro significativo entre os atletas (Mettler e Zimmermann, 2010) e por conta disto a utilização da reposição deste metal. A depleção de ferro está presente em 28% das corredoras do sexo feminino, porém em menos de 2% dos do sexo masculino. No entanto, os sinais de excesso de ferro também foram evidentes, onde um em cada seis corredores do sexo masculino apresentaram tais características de sobrecarga de ferro (Mettler e Zimmermann, 2010).

Dados sugerem que até 79% dos atletas de elite utilizam suplementos de ferro (Bruinvels et al., 2016). Em ciclistas, um estudo mostrou que a suplementação de ferro é utilizada não é só apenas pela deficiência do mineral, mas também como uma tentativa de aumentar o número de glóbulos vermelhos e assim melhorar o desempenho nos treinos e competições (Zotter et al., 2004; Huang et al., 2006). No entanto, o consumo desnecessário de suplementos de ferro pode resultar em hiperferritinemia (Deugnier et al., 2002; Zotter et al., 2004; Lippi et al., 2005) e levar ao acúmulo hepático e esplênico de ferro (De Matos et al., 2013).

1.3 A homeostase de ferro no organismo

O ferro é um metal essencial para homeostase celular e participa de processos fisiológicos como síntese de DNA, respiração celular, transporte de

O₂, eritropoiese e reações de oxidação-redução. (Dunn et al., 2006; Ganz, 2013; Gudjoncik et al., 2014). A obtenção do ferro pode ocorrer através da alimentação (absorção pelo epitélio duodenal) e/ou reaproveitamento de eritrócitos senescentes (Dunn et al., 2006). O ferro da dieta é classificado como heme ou não-heme. O ferro heme está presente nas carnes vermelhas, vísceras, peixes e aves, e que é mais facilmente absorvido. Já o ferro não-heme apresenta-se nos vegetais folhosos, grãos e derivados animais, onde se encontra principalmente na forma férrica (Fe³⁺), tendo baixa solubilidade e biodisponibilidade (Grotto, 2010).

No epitélio duodenal, cerca de 10% do ferro encontra-se complexado com proteínas (heme) e os outros 90% encontram-se na forma não-heme. A absorção do ferro não-heme ocorre na porção duodenal do intestino pelo transportador de metal divalente (DMT-1). Para o ferro ser absorvido, precisa ser convertido da forma Fe³⁺ para a forma Fe²⁺, pela enzima ferrirredutase presente na membrana dos próprios enterócitos. Quando reduzido, o ferro é absorvido pelo enterócito pela ação do DMT-1 e associado à proteína ferritina. De acordo com a necessidade do organismo, o ferro é removido da ferritina e exportado para a circulação pela ferroportina (Muñoz et al., 2009; Ganz, 2013). No meio extracelular, o íon ferroso é novamente oxidado pela enzima hefaestina (Hp) na membrana basolateral dos enterócitos, o que permite sua ligação com a transferrina (Tf) (Muñoz et al., 2009). Já absorção do ferro heme (oriundo da hemoglobina, mioglobina e carnes vermelhas) ocorre por endocitose no enterócito, mediada pela proteína transportadora do heme-1 (HCP1). Depois de interiorizado, o ferro liberado do complexo como íon ferroso pela enzima heme-oxigenase passa a ser metabolizado de maneira semelhante ao ferro não-heme (Muñoz et al., 2009), como mostra a figura 2. O organismo humano absorve cerca de 1–2 mg de ferro por dia em uma dieta normal contendo entre 13–18 mg de ferro (Dunn et al., 2006, Grotto, 2012; Siddique & Kowdley, 2012; Ganz, 2013).

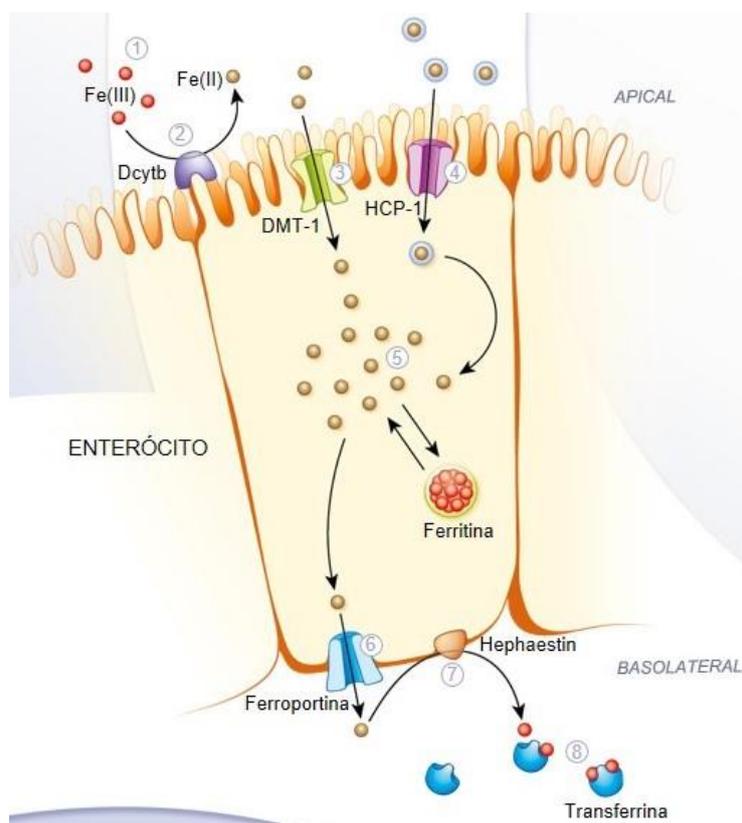


Figura 2. Proteínas envolvidas na absorção do ferro no epitélio duodenal. (1) Conversão do Fe^{3+} em (2) Fe^{2+} pela Dcyth (ferroredutase); (3) absorção do ferro pelo DMT-1 (transportador de metal divalente-1) para enterócito; (4) endocitose do ferro heme mediada pela HCP-1 (proteína transportadora do heme-1); (5) ferro na forma de ferritina (6) ferroportina responsável pelo fluxo de ferro para fora da célula; (7) Fe^{2+} é oxidado em Fe^{3+} pela enzima hephaestina; (8) ferro ligado a Tf (Adaptado de www.ironatlas.com).

Outros mecanismos de obtenção de ferro, além da absorção intestinal, acontece pela fagocitose e a degradação de hemácias senescentes que corresponde cerca de 25-30mg/dia de ferro para o organismo. Esta quantidade de ferro é suficiente para manter a hematopoese diária, que ocorre nos macrófagos do baço, medula óssea e no fígado pelas células de Kupffer. O ferro obtido na dieta ou a partir da degradação das hemácias é armazenado principalmente no fígado, baço e medula óssea, complexado à ferritina e disponibilizado para o sistema conforme a demanda (Grotto, 2008).

No plasma o ferro é transportado pela Tf (sintetizada no fígado, retina, testículo e cérebro) e ela atua como um quelante minimizando sua reatividade e facilitando seu transporte (Grotto, 2010). A Tf tem a capacidade de transportar até 12 mg de ferro, em condições normais, e esta capacidade

raramente é utilizada. Cerca de 4-6 mg de ferro circulam ligados a Tf, equivalente a aproximadamente 30-50% de saturação pelo ferro. Com o ferro complexado à Tf, a internalização é iniciada pela interação desse complexo com o receptor da Tf (TfR) (Dunn et al., 2006).

O ferro é armazenado no organismo na forma de ferritina e hemossiderina no baço, no fígado e na medula óssea (Grotto, 2010). Quando a necessidade de ferro for maior que a oferecida pela dieta, as reservas são mobilizadas pela hepcidina, um hormônio peptídico circulante, sintetizado pelos hepatócitos, de forma induzida (Ganz, 2013). Como o organismo não possui um meio ativo de excretar ferro, necessita de equilíbrio entre os locais absorção, utilização e estoque, em situações fisiológicas, o organismo consegue manter a homeostase do ferro principalmente pela ação da hepcidina. A excreção do ferro é feita lentamente e de maneira relativamente constante, por secreções corpóreas, descamação das células intestinais e epidérmicas e fluxo menstrual (Muñoz et al., 2009). Na figura 3, estão esquematizados os principais mecanismos envolvidos na homeostase do ferro no organismo.

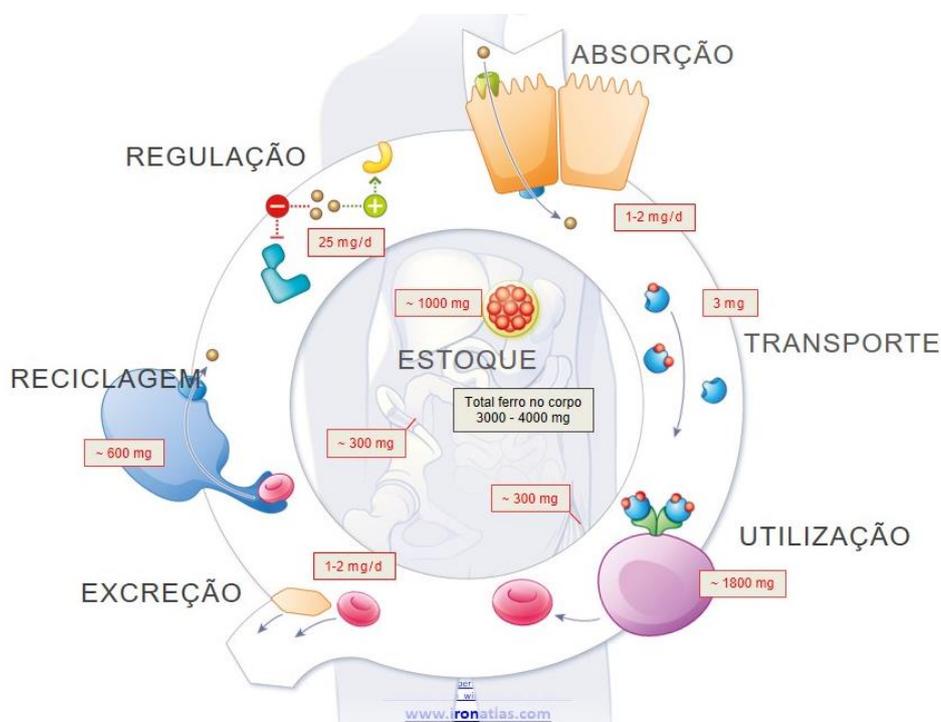


Figura 3: Homeostase corporal do ferro (Adaptado de www.ironatlas.com).

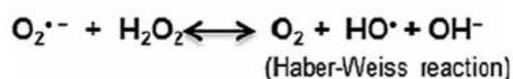
Em situação de sobrecarga crônica de ferro, o mecanismo envolvido depende da sua gênese e pode ser classificada em primária, quando resulta de uma alteração na regulação da absorção do ferro, ou secundária, quando decorre de mecanismos associados a determinadas doenças genéticas ou adquiridas. O termo sobrecarga de ferro é usado para descrever uma condição resultante do aumento do ferro circulante e dos depósitos desse metal em diferentes tecidos, normalmente associada à disfunção desses órgãos (Siddique & Kowdley, 2012). Uma vez que não há uma via fisiológica para regular a excreção do ferro do organismo, a suplementação irrestrita de ferro tem como consequência uma alta possibilidade de intoxicação pela sobrecarga de ferro circulante (Ganz, 2013).

A sobrecarga primária está associada a mutações nos genes que codificam proteínas envolvidas na homeostase do ferro, como a hemacromatose hereditária, que é uma doença autossômica recessiva resultante da perda da regulação do ferro na circulação, levando ao acúmulo de ferro, que se deposita em diversos tecidos (Siddique & Kowdley, 2012). Quando se refere à sobrecarga secundária, o fato comum a essas doenças é anemia: anemias hemolíticas (talassemias, esferocitose hereditária, anemia autoimune, entre outras), presença de doenças hematológicas (anemia sideroblástica, síndrome mielodisplásica) e doenças hepáticas (hepatite C, esteatose hepática não-alcolica) (Saad et al, 2010). A talassemia é a causa mais comum de sobrecarga de ferro secundária em consequência de uma hematopoese ineficiente. Vale ressaltar que a principal causa que agrava o status do ferro no organismo neste contexto, são as múltiplas transfusões sanguíneas (Gattermann, 2009; Siddique & Kowdley, 2012).

1.4 Sobrecarga de ferro e estresse oxidativo

Com a sobrecarga de ferro a capacidade de ligação a Tf fica totalmente saturada e o ferro pode circular livremente pelo plasma, intensificando seu depósito tecidual (Siddique & Kowdley, 2012; Ganz, 2013). Essa forma livre do ferro participa de reações (Reação de Fenton e Reação de Haber-Weiss) que

levam a produção de EROs, aumentando o estresse oxidativo e ocasionando lesões e destruição celular (Shazia et al., 2012).



A sobrecarga de ferro tem sido relacionada a muitas desordens morfofuncionais em diversos órgãos, sendo o fígado, o principal órgão afetado pois é seu principal local de armazenamento. (Siddique & Kowdley, 2012; Santos et al., 2012a; Santos et al., 2012b). Desta forma, o acúmulo de ferro resulta em disfunção sistêmica envolvendo órgãos como coração, fígado, baço, sistema endócrino, artérias, cérebro e pulmão (Day et al, 2003; Jiang et al, 2007; Lou et al, 2009; Ma et al, 2012). O depósito contínuo de ferro no fígado desencadeia um processo inflamatório que provoca um enrijecimento que pode evoluir para cirrose ou câncer. No pâncreas, o processo inflamatório, causado por ferro em excesso, pode prejudicar a capacidade de se produzir insulina, levando a um quadro de diabetes (Siddique & Kowdley, 2012; Santos et al., 2012a; Santos et al., 2012b). Disfunções no sistema reprodutor também foram evidenciadas em estudos com roedores, onde excesso de ferro provocou alterações no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal e aumento da produção de EROs em fêmeas (Rossi et al., 2016) e machos (Lucessoli et al., 1999). No coração, o efeito tóxico do ferro envolve a ocorrência de arritmias e disfunção cardíaca com altas taxas de mortalidade, basicamente por aumento da geração de radicais livres e diminuição das vias antioxidantes endógenas (Day et al., 2003; Oudit et al., 2003). Nosso grupo de estudo demonstrou comprometimento na função cardíaca de animais com sobrecarga de ferro aguda, o que resultou em aumento de EROs (OH^{\cdot} e H_2O_2) e prejuízo na contratilidade miocárdica, reduzindo a geração de força por diminuição da atividade da ATPase miosínica e da sensibilidade miofilamentar ao Ca^{2+} (Ávila et al., 2016).

Na função vascular a sobrecarga de ferro exhibe alterações na estrutura (Ribeiro Júnior et al., 2017; Fidelis et al 2020) e/ou na função da artéria (Day et al., 2003; Marques et al., 2015). Assim como ocorre no fígado, baço e em outros órgãos, em situação de excesso de ferro o acúmulo tecidual também é evidenciado em artérias (Cusma et al., 2013; Fidelis et al., 2019), o que acarreta em prejuízo da função endotelial, no tônus vascular e aumento de EROs local (Marques et al., 2015; Ribeiro Júnior et al., 2017). A relação entre sobrecarga de ferro e disfunção endotelial em modelo animal, foi demonstrado em trabalhos anteriores do nosso grupo, que descreveram alterações na reatividade vascular em vasos de diferentes leitos, tal como em aortas (Marques et al., 2015; Marques et al., 2019), artérias pulmonares de resistência (Bertoli et al., 2018) e artérias mesentéricas de resistência (Ribeiro Júnior et al., 2017).

Os impactos sobre função vascular se correlacionam com a concentração de ferro tecidual e, conseqüentemente, com o aumento do estresse oxidativo que, por sua vez, desencadeia mecanismos moleculares que podem levar a danos vasculares. Estudos experimentais e clínicos demonstraram uma associação entre sobrecarga de ferro, estresse oxidativo, depósito vascular e disfunção vascular (Gaenger et al., 2002; Kukongviriyapan et al., 2008; Cusma et al, 2013; Marques et al., 2015; Ribeiro Júnior et al., 2017; Fidelis et al, 2019).

Na sobrecarga de ferro, a disfunção endotelial também é caracterizada pela vasodilatação reduzida e/ou aumento da resposta vasoconstritora (Zhou et al., 2000; Anderson et al., 2000; Day et al., 2003), devido ao aumento da produção de EROs, que desencadeia alterações na função endotelial, como demonstrado em trabalhos clínicos e experimentais (Gaenger et al., 2002; Lou et al., 2009; Kramer et al., 2012; Pardo Andreu et al., 2009; Kukongviriyapan et al., 2008; Day et al., 2003). Estudos em roedores demonstraram aumento do estresse oxidativo após administração crônica de ferro (Lou et al., 2009; Kramer et al., 2012; Marques et al., 2015; Ribeiro Júnior et al., 2017; Bertoli et al., 2018) e também na administração aguda de ferro (Pardo Andreu et al., 2009; Lucesoli et al., 1999; Rossi et al., 2016), o que desencadeia mecanismos moleculares que levam a danos teciduais e sistêmicos. Em humanos,

observou-se uma associação entre o aumento do estresse oxidativo e o prejuízo da modulação endotelial em condições de sobrecarga de ferro de origem primária e secundária (Gaenger et al., 2002; Kukongviriyapan et al., 2008).

Sabe-se que a sobrecarga de ferro leva a prejuízo na modulação endotelial em resposta a uma redução da participação do NO (Russo et al., 2002). De fato, diferentes estudos demonstraram que o estresse oxidativo circulante e vascular contribui para disfunção endotelial bem como para a redução da biodisponibilidade de NO em situação de sobrecarga (Marques et al., 2015; Ribeiro Júnior et al., 2017; Bertoli et al., 2018). Assim como mostra Marques et al., (2015) em seu estudo, onde a administração crônica de ferro aumentou a produção de EROs e diminuiu a biodisponibilidade de NO, além de apresentar participação significativa da angiotensina II e aumento da NADPH oxidase na aorta. Nesse sentido, como a diminuição da biodisponibilidade de NO em condições patológicas muitas vezes ocorre como resultado de sua degradação metabólica por EROs, tais como ânion $O_2^{\cdot-}$, a hiperreatividade à fenilefrina em modelos de sobrecarga de ferro estaria relacionada ao aumento de $O_2^{\cdot-}$, como demonstra Ribeiro Júnior et al., (2017).

As alterações vasculares na sobrecarga de ferro estão associadas não só ao aumento da produção de EROs, mas também a uma resposta antioxidante reduzida (Marques et al., 2015; Ribeiro Júnior et al., 2017; Bertoli et al., 2018). Estudos demonstram redução dos mecanismos de defesa antioxidante, como a SOD e a catalase (Zhang et al., 2014; Badria et al., 2015). E esta alteração ocorre não só a nível de expressão, mas também a atividade enzimática é alterada como mostrou Marques et al., (2019) em aorta de camundongos apoE^{-/-}, onde a sobrecarga de ferro reduziu as atividades da SOD e da catalase. Em situação de desequilíbrio onde produção dos radicais livres supera a ação antioxidante do organismo, já é bem conhecido que o estado oxidante resultante promove disfunção endotelial, induz a danos vasculares e pode levar a uma peroxidação lipídica (Siddique & Kowdley, 2012; Fernandes et al., 2017).

1.5 Justificativa e Hipótese

Está bem descrito que a prática de exercício físico aeróbico impacta as DCV, principalmente sobre a função vascular, onde atua reduzindo as respostas contratéis mediado pelo aumento da síntese/biodisponibilidade de NO e melhorando o sistema antioxidante, mecanismos responsáveis pela melhora da função endotelial. Em contrapartida, a sobrecarga de ferro, promovida por uma suplementação exagerada de ferro para melhorar o desempenho esportivo, pode causar importantes danos cardiovasculares. O excesso de ferro tem relação com a disfunção endotelial, que é caracterizada por uma resposta hipercontrátil, por diminuir a modulação do NO, que é prejudicada pelas EROs. Partindo desse pressuposto, nosso estudo mimetiza a prática de exercício físico como promotor de saúde em indivíduos com sobrecarga de ferro, seja por suplementação de ferro não controlada, seja por doenças tal como hemocromatose e talassemia.

Assim, sabendo dos efeitos benéficos do exercício físico aeróbico sobre a função vascular, considerando a frequente associação da suplementação de ferro à prática de exercícios para melhorar o desempenho esportivo, que em excesso, promove efeitos deletérios sobre o sistema vascular, este estudo avalia a hipótese de que a sobrecarga crônica de ferro interfere nos efeitos benéficos do exercício aeróbico moderado sobre a função vascular de ratos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar se a sobrecarga crônica de ferro prévia interfere nos efeitos benéficos promovidos pelo treinamento físico aeróbico de intensidade moderada sobre a função vascular de ratos.

2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer um modelo experimental de sobrecarga de ferro em ratos;
- Estabelecer um protocolo de treinamento aeróbico de moderada intensidade em ratos;
- Determinar os efeitos da suplementação de ferro e exercício físico sobre os parâmetros hemodinâmicos de ratos;
- Descrever os efeitos da sobrecarga de ferro e do exercício aeróbico sobre a morfologia da aorta de ratos;
- Identificar o impacto da sobrecarga crônica de ferro prévia nos efeitos do treinamento aeróbico sobre a reatividade vascular de aorta de ratos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais Experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus albinus*), com idade aproximada de 8 semanas, pesando entre 200-300 gramas, cedidos pelo Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES. Durante o tratamento, os ratos foram mantidos em gaiolas coletivas, sob condições controladas de temperatura e umidade, com livre acesso a água e ração e o ciclo claro-escuro invertido de 12h. Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA nº 88/2015).

3.1.1 Protocolo de sobrecarga crônica com ferro

Inicialmente uma randomização foi feita para distribuição de dois grupos experimentais: animais injetados com ferro ou com solução salina. O grupo com sobrecarga de ferro (grupo Fe) recebeu injeções i.p. de ferro-dextrano (Ferrodex®, marca Fabiani, Fabiani Saúde Animal Ltda, São Paulo/SP, Brasil) na dose diária de 100 mg/Kg, 5 vezes por semana durante quatro semanas, totalizando 2000 mg/kg de dose acumulada; enquanto o grupo controle (grupo Ct) recebeu injeções i.p de solução salina (NaCl 0,9%) no mesmo período tempo. Todas as doses do tratamento (Ct e Fe) foram ajustadas semanalmente de acordo com a pesagem dos animais tal como descrito previamente (Marques et al., 2015). O protocolo de treinamento físico foi iniciado ao final das quatro semanas de administração do ferro ou solução salina.

3.1.2 Protocolo de Treinamento Físico Aeróbico

O programa de corrida foi realizado em uma esteira rolante (Figura 4) específica para ratos (Insight Instrumentos Ribeirão Preto, SP, Brasil), 5 dias por semana, durante 8 semanas, por 60 minutos. O protocolo de treinamento

físico aeróbico em esteira utilizado foi adaptado de Carneiro-Júnior et al. (2013), sendo descrito a seguir.

Antes do início do treinamento físico aeróbico, todos os animais foram aclimatados na esteira rolante por 5 dias, com duração de 10 min/dia, sem inclinação e com velocidade de 10 m/minuto. Para seleção dos animais aptos à corrida, consideramos como predisposição à corrida a participação dos animais na familiarização por no mínimo 3 dias, seja o animal correndo por vontade própria, ou até mesmo aqueles que precisavam de um estímulo manual para se manterem correndo. Os animais que não se adaptaram a corrida foram direcionados para experimentos piloto ou para o treinamento e aperfeiçoamento das técnicas, não sendo mais utilizados neste estudo.

Após esse período, os animais dos grupos Ct e Fe aptos à corrida, foram randomizados nos respectivos grupos experimentais:

- ✓ **Grupo controle sedentário (Ct):** animais que receberam solução salina i.p. e que não foram submetidos ao protocolo de exercício físico;
- ✓ **Grupo sobrecarga de Fe sedentário (Fe):** animais que receberam ferro-dextrano i.p., e que não foram submetidos ao protocolo de exercício físico;
- ✓ **Grupo controle treinado (CtEx):** animais que receberam solução salina i.p. e que foram submetidos ao protocolo de exercício físico;
- ✓ **Grupo sobrecarga de Fe treinado (FeEx):** animais que receberam ferro-dextrano i.p. e que também foram submetidos ao protocolo de exercício físico.



Figura 4. Esteira rolante para ratos.

3.1.2.1 Teste de velocidade máxima de corrida

Após 48 horas do período de adaptação, os animais aptos à corrida foram submetidos ao teste na esteira rolante para determinação da velocidade máxima de corrida (VMC). O teste foi iniciado com velocidade a 10 m/min, 0° de inclinação, com incrementos de 3 m/min na velocidade da esteira a cada 3 minutos, até a fadiga dos animais. O momento da fadiga foi definido quando os animais não mantiveram a corrida de acordo com a velocidade da esteira. A intensidade do protocolo de treinamento foi monitorada através do aumento progressivo do tempo e da velocidade de corrida, que considerou a intensidade como o percentual da VMC. O teste na esteira rolante para determinação da VMC foi realizado em cada animal de todos os grupos experimentais no início da primeira semana e ao final da oitava semana do programa de treinamento (48h após a sessão de treinamento), que são utilizados para comparação e avaliação da capacidade de corrida e tolerância à fadiga dos animais treinados em comparação aos grupos sedentários. Ao final da quarta semana, os animais dos grupos treinados (CtEx e FeEx) fizeram novo teste de VMC apenas para ajustar a velocidade de acordo com a intensidade estabelecida (velocidade de corrida). Na figura 5, mostra a representação esquemática dos protocolos experimentais do tratamento e o protocolo do treinamento físico.

O protocolo contou com sessões progressivas no tempo/dia de 30 min até atingir 60 min na primeira semana e 60 minutos/dia até o final da 8ª semana, e o detalhamento está descrito na sequência:

- Semanas 1 a 4: teste inicial de VMC em todos os grupos. Corrida estabelecida a 60% da VMC;
- Semana 5: segundo teste de VMC apenas para os grupos CtEx e FeEx e ajuste da velocidade a 65-70% da VMC;
- Semanas 5 a 8: Corrida estabelecida a 65-70% da VMC.
- Semana 8: teste final de VMC em todos os grupos.

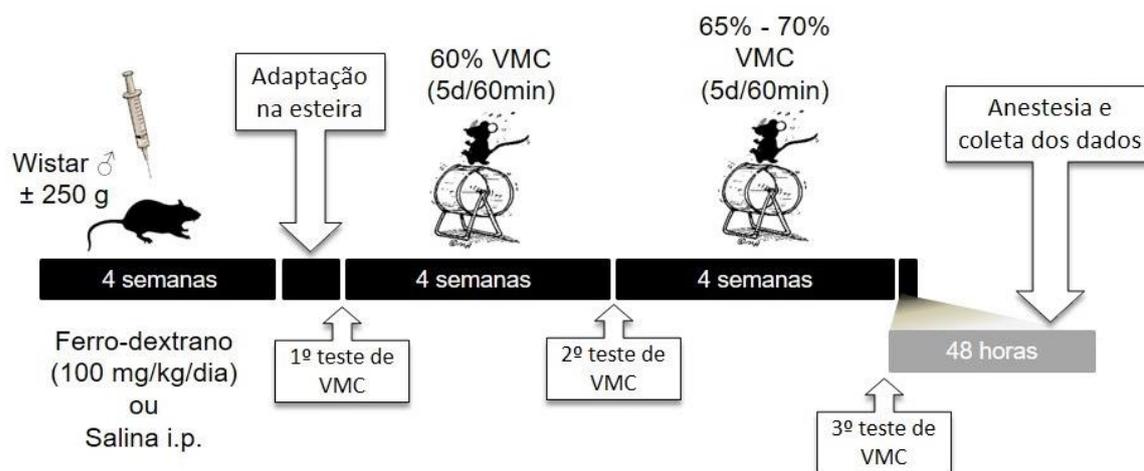


Figura 5. Representação esquemática dos protocolos experimentais.

3.2 Hemodinâmica Arterial

Após 48 h do último teste de velocidade máxima de corrida, os animais foram anestesiados com uretana por via i.p. (1,2 g/kg, Sigma, SP, Brasil) para avaliação direta dos parâmetros hemodinâmicos arteriais. O plano anestésico foi avaliado pela responsividade ao estímulo doloroso, e quando necessário, houve suplementação na dose do anestésico utilizado.

Após o procedimento anestésico, os animais foram submetidos à cirurgia de cateterização da artéria carótida direita com cânulas de polietileno PE-50 (Intramedic Polyethylene Tubing, Clay Adams, Becton and Dickinson Company, Nova Jersey, EUA) preenchidas com salina heparinizada (50 U/ml). A artéria carótida foi separada delicadamente do tecido conjuntivo, em seguida a cânula foi inserida e amarrada com um fio sem obstruir o fluxo de sangue. O cateter arterial foi acoplado a um transdutor de pressão (TSD 104A – Biopac) conectado a um pré-amplificador, que por sua vez foi conectado ao sistema de aquisição de dados, o qual utilizava uma taxa de amostragem de 2000 amostras/s (MP 30 Byopac Systems, Inc; CA) e processadas por um computador. Após 20 min de estabilização, foram analisados os seguintes parâmetros: pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC).

3.3 Determinação do ferro sérico e avaliação biométrica

Após o estudo hemodinâmico, e com os animais ainda anestesiados, as amostras de sangue foram coletadas por meio de punção na artéria aorta abdominal e acondicionadas em tubos sem heparina, para obtenção de soro por centrifugação a 1200g por 15 minutos (Eppendorf-Neitheier- Hinz GmbH 22331, Alemanha). A concentração de ferro e a capacidade total de ligação do ferro e capacidade de ligação do ferro não saturado (UIBC) foram mensuradas em amostras de soro, em duplicata, por método colorimétrico direto (Análise bioquímica automática, CMD 800ida marca Wienerlaboratories, Rosario, Argentina). O ferro sérico foi liberado da Tf em tampão acetato (150 mM) com pH 4,5 e reduzido pelo ácido ascórbico (30 mM). A seguir, o Fe^{+2} , ao reagir com agente colorimétrico sulfonato pyridyl bisphenyltriazine (ferrozine 0.2 mM), produzia a cor margenta, que foi mensurada a 560 nm. A porcentagem de saturação da Tf foi calculada pela razão entre o ferro sérico e a capacidade total de ligação.

Além disso, após eutanásia por exsanguinação com o animal anestesiado, foi retirado músculo esquelético gastrocnêmio (porção medial e lateral) que foi imediatamente pesado em balança de precisão e em seguida congelado a $-20^{\circ}C$. O fígado também foi retirado, pesado e congelado a $-20^{\circ}C$. Os valores absolutos foram corrigidos pela tíbia direita, devidamente dissecada e medida com auxílio de paquímetro, e representados em g/mm.

3.4 Determinação do ferro tecidual

O ferro depositado no fígado e no músculo esquelético gastrocnêmio (porção medial e lateral) foi quantificado por um espectrômetro de absorção atômica ZEE nit 700 (AnalytikJena, Jena, Alemanha). As medidas foram feitas por espectrometria de Absorção Atômica com chama (F-AAS), usando a correção de fundo contínuo (lâmpada de deutério). As medidas feitas em 4 replicatas por animal, para cada órgão analisado. A taxa de acetileno e a altura do queimador foram ajustadas para obtenção de sinais de absorbância máximos. O acetileno (99,5 %, White Martins, Rio de Janeiro, Brasil) e o ar

sintético (99,999 %, White Martins, Rio de Janeiro, Brasil) foram utilizados como combustível e gases oxidantes, respectivamente. As amostras de órgãos foram secas durante 72 horas a 60°C e depois foram maceradas. Uma decomposição ácida assistida por microondas (GO Multiwave Anton-Paar, Áustria) foi realizada com as amostras usando uma massa de 0,1 g, 3 mL de HNO₃ 65% p/p PA (Merck Millipore, EUA), 1 mL H₂O₂ 30% v/v PA (Proquimios, Rio de Janeiro, BRA) e 4 mL de água ultrapura (resistividade <18,2 MΩ, PURELAB Ultra, ELGA, Reino Unido). Após o arrefecimento, a solução foi diluída para 15 mL. O espaço em branco foi preparado nas mesmas condições que as amostras experimentais. O limite de detecção obtido para determinações de Fe foi 34,7 mg/Kg (Bressy et al., 2013).

3.5 Análise histológica

Amostras de aorta e fígado foram fixadas em formalina a 4%. Posteriormente, os tecidos foram processados e embebidos em parafina a 58°C. Secções com 5 µm de espessura foram obtidas e montadas em lâminas, sendo armazenadas até o momento da coloração. Para coloração, as lâminas permaneceram por no mínimo 1h em estufa a 60°C. A seguir, foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) ou ferrocianeto de potássio (azul da Prússia), para analisar morfometria da aorta e deposição de ferro *in situ*, respectivamente. Para coloração, inicialmente as lâminas contendo as secções de aorta ou fígado foram desparafinizadas através da imersão em três banhos consecutivos de xilol P.A., seguido de xilol P.A e álcool P.A (1:1). Para hidratação as lâminas foram imersas em 3 banhos de álcool P.A. e em banhos seriados de água destilada, em cada banho as lâminas permaneceram por 5 min. A seguir as colorações específicas foram seguidas.

Para a técnica de coloração com azul da Prússia as secções foram imersas durante 30 min em solução contendo ferrocianeto de potássio (5%) e ácido clorídrico (5%) (1:1). A seguir as lâminas foram imersas durante 5 min em água destilada, e imersas em banho com eosina (1h30min) para corar os componentes básicos, realizando a contra coloração. Após, foi feito banho com água destilada novamente por 5 min, seguido das etapas de hidratação e

desparafinização. Ao fim, foi inserido meio de imersão e montagem (bálsamo do Canadá) e lamínula sob as secções presentes na lâmina.

A coloração com H&E seguiu as etapas semelhantes à coloração com azul da Prússia, exceto a de imersão em solução de ferrocianeto de potássio que foi substituída pela imersão em solução contendo hematoxilina (para corar partes ácidas, especialmente os núcleos), onde as lâminas com secções de aorta foram inseridas por 4 min. Além disso, inclui-se a etapa de diferenciação com álcool ácido (1%) após o banho com eosina.

As imagens digitais foram coletadas no microscópio óptico Leica DM 2500 com aumento final de 100× (para fígado) e 400× (para aorta). Para a análise, foram utilizados 5 segmentos da aorta por animal para obter a média amostral do respectivo animal. A análise de morfometria e depósito de ferro na aorta (análise semi- qualitativa) foi realizada utilizando o *software ImageJ* (National Institutes of Health, Bethesda, EUA). A análise de deposição de ferro tecidual no fígado foi qualitativa (realizada por F-AAS) e as imagens foram utilizadas como representação ilustrativa do acúmulo de ferro tecidual no fígado.

3.6 Avaliação da reatividade da artéria aorta torácica

Após a avaliação hemodinâmica, os animais foram eutanasiados e a aorta torácica foi cuidadosamente removida e imersa rapidamente em uma placa de Petri contendo solução de Krebs-modificado, composta por (em mM): NaCl 127; KCl 4,7; CaCl₂.2H₂O 2,5; MgSO₄.7H₂O 1,2; KH₂PO₄ 1,17; NaHCO₃ 24; Glicose 11; EDTA 0,01, aerada com mistura carbogênica contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂. Esta solução foi mantida com pH 7,4. Na placa de Petri o tecido conectivo e adiposo foram cuidadosamente removido e aorta foi dividida em 6 a 7 segmentos cilíndricos de aproximadamente 4 mm de comprimento (Figura 6).

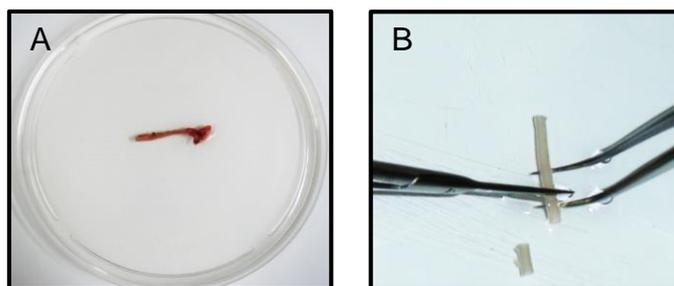


Figura 6. (A) Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, antes da manipulação para retirada do tecido conectivo e adiposo; (B) Após a retirada dos tecidos e sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 3-4 mm (Marques, 2015).

Cada anel vascular foi colocado em cubas contendo 5 mL de solução de Krebs-Henseleit aquecida a $36 \pm 0,5^\circ\text{C}$, continuamente gaseificada com mistura carbogênica. Dois fios de aço inoxidável em forma de triângulo foram passados através do lúmen dos segmentos, de forma que ficassem paralelos na luz do vaso. Um triângulo foi fixado à parede do banho e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. Assim, qualquer alteração do tônus do vaso foi captada pelo transdutor de força (TSD 125) conectado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems, Inc; Santa Bárbara, CA - USA) e este a um computador (Figura 7).

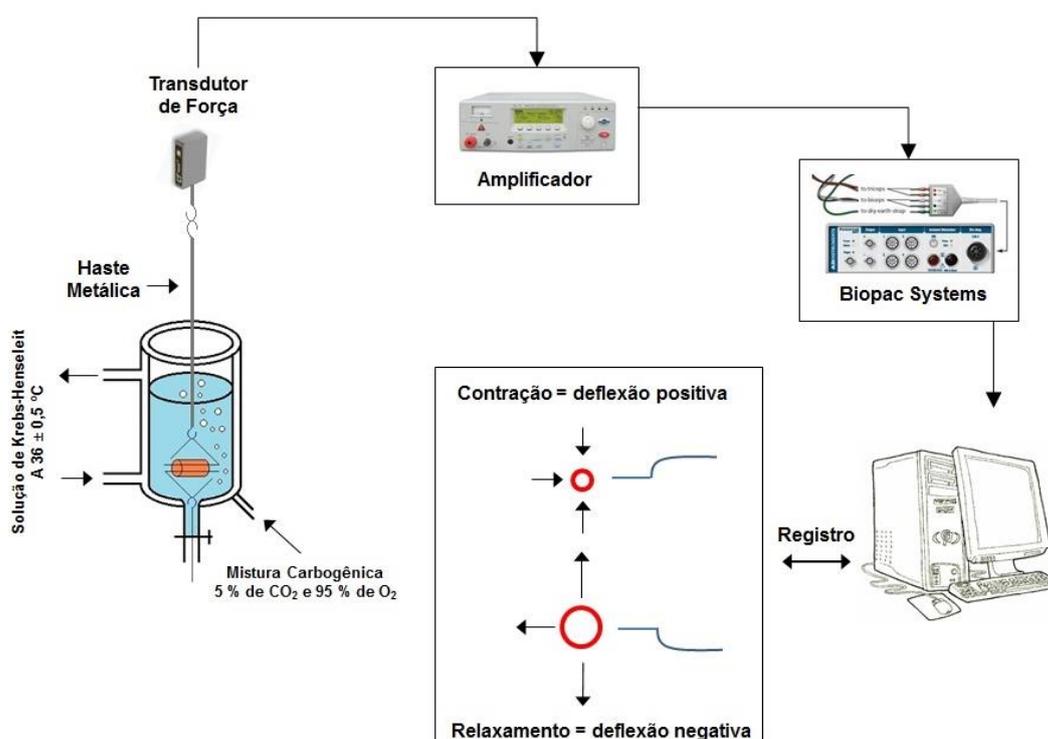


Figura 7. Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular in vitro (Marques, 2018).

3.6.1 Avaliação da reatividade vascular ao cloreto de potássio

Após o período de 45 minutos de estabilização, foi administrado ao banho 125 μ l de KCl 3 M (resultando numa concentração no banho de 70 mM) para verificar a atividade contrátil do músculo liso vascular induzida por despolarização. Após atingirem uma variação de um grama de força a partir do valor basal, estes anéis eram lavados com solução de Krebs-Henseleit até retornar a tensão de repouso (Figura 8B, C). Após 30 minutos de estabilização (Figura 8D), uma nova dose de KCl, semelhante à anterior, foi adicionada ao banho para a aquisição de uma contração máxima do músculo liso vascular, aferida após 30 minutos da adição, tempo necessário para atingir um platô no registro da contração (Figura 8E, F). Após este platô, os anéis foram novamente lavados três vezes com a solução de Krebs-Henseleit para atingir o valor basal (1.0 grama) e, após 30 minutos (Figura 8G, H), esses anéis foram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio.

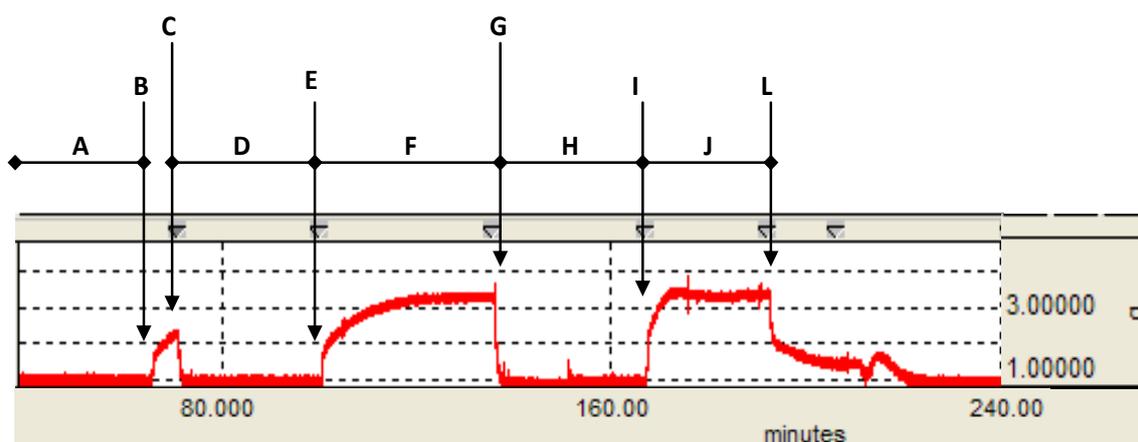


Figura 8. Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 0.9 a 1.3g); B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Pré-contracção com fenilefrina (PE) 10^{-6} M; J) Platô da contração induzida pela PE; L) Adição de acetilcolina (ACh) 10^{-5} M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical.

3.6.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio

A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico, acetilcolina. Para tal, os anéis de aorta foram pré-contraindidos com fenilefrina (PE) 10^{-6} M. Uma vez atingido o platô, uma dose única de acetilcolina (ACh) 10^{-5} M foi aplicada (Figura 8I, J, L). A integridade endotelial foi determinada por um relaxamento maior ou igual a 80%. Nenhum anel foi descartado, pois o comportamento da artéria é desconhecido devido a duração do tratamento e associação ao exercício físico.

3.6.3 Protocolos Experimentais

3.6.3.1 Resposta vasoconstritora à fenilefrina

Após a avaliação da integridade funcional do endotélio, a solução nutritora do banho foi trocada três vezes para que a tensão basal fosse estabelecida. Após 30 minutos de estabilização, foi realizada a incubação dos fármacos e, após mais 30 minutos foi iniciada a curva concentração-resposta à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M) de maneira cumulativa nos grupos estudados.

Todos os protocolos de reatividade vascular, a partir deste momento, foram realizados da seguinte forma: o fármaco a ser estudado foi incubado por 30 min (L-NAME, Tempol, DETCA e Catalase+DMSO), e foi realizada a curva concentração resposta à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M) (Figura 9).

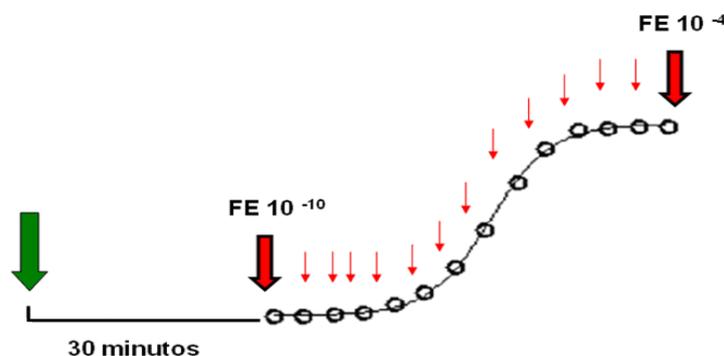


Figura 9. Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais. Incubação com o fármaco a ser estudado e depois de trinta minutos realizou-se a curva concentração-resposta à FE (10^{-10} a 3×10^{-4} M) (Marques, 2018).

Com a finalidade de estudar a participação do óxido nítrico (NO) sobre os efeitos vasculares promovidos pela associação da exposição da sobrecarga de ferro com o exercício físico, os anéis de aorta foram incubados com um inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 μ M).

A fim de investigar se a sobrecarga prévia de ferro interfere nos efeitos do exercício físico aeróbico na participação das espécies reativas de oxigênio e as vias antioxidantes, foram realizadas curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença de tempol (1 mM), um mimético da superóxido dismutase e, por tanto, um “varredor” de $O_2^{\cdot-}$; o ácido dietilditiocarbâmico (DETCA, 0.5 mM), um bloqueador da superóxido dismutase ou a catalase (1000 U/mL), um “varredor” enzimático de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) acrescida do dimetil-sulfóxido (DMSO, 100 mM), neutralizador da ação lesiva dos radicais hidroxila ($OH\cdot$).

3.7 Detecção *in situ* da produção de óxido nítrico e de ânion superóxido em aorta

A disponibilidade local de NO foi determinada utilizando 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2), segundo protocolo padronizado (Marques et al., 2015). Após isolamento e dissecação, as aortas foram incorporadas em um meio de congelamento (Killik-OCT Easy Path, Erviegas Ltda, SP, Brasil). As secções de aorta foram cortadas em criostato a 10 μ m de espessura e transferidas para lâminas gelatinizadas, congeladas até o momento do protocolo com DAF-2. As lâminas foram mantidas em estufa a 37°C por uma hora para retirar o meio de inclusão. A seguir as secções de aorta foram incubadas em idênticas condições a 37° C por 30 min com tampão fosfato (0,1 M) contendo $CaCl_2$ (0,45M). As lâminas foram secadas e incubadas durante 30 min a 37°C em câmara úmida protegida da luz com 8 μ M de DAF-2 diluído em solução tampão fosfato contendo $CaCl_2$.

O corante fluorescente oxidativo diidroetídio (DHE) foi utilizado para avaliar a produção/presença de $O_2^{\cdot-}$ *in situ*. A hidroetidina permeia livremente

as células e é oxidada na presença de $O_2^{\cdot-}$ ao brometo de etídio, que é aprisionado pela intercalação com o DNA. O brometo de etídio é excitado a 546 nm e tem um espectro de emissão de 610 nm. Os segmentos de tecido incorporadas em um meio de congelamento foram cortados em secções de 10 μm de espessura e colocados em uma lâmina de vidro. Para realização do protocolo, as lâminas foram mantidas em estufa a 37°C por uma hora para retirar o meio de inclusão. Em seguida, as secções de aorta foram incubadas com tampão Krebs-HEPES, em idênticas condições por 30 min a 37°C. Foram então secadas e incubadas com solução tampão de Krebs-HEPES contendo DHE (2 μM) em câmara úmida e protegida da luz, à temperatura de 37°C por 30 min.

As imagens digitais foram coletadas em um microscópio de fluorescência Leica DM 2500 acoplado a uma câmera Leica DFC 310 FX. Para a quantificação, cinco secções por animal foram amostradas para cada condição experimental. A densidade de fluorescência média foi calculada usando o *software Image J* (National Institutes of Health, Bethesda, EUA).

3.8 Expressão proteica por western blotting

Amostras congeladas de aorta foram trituradas e sonicadas com tampão RIPA gelado (Sigma Aldrich, St Louis, EUA), os homogeneizados foram centrifugados a 1200g, o sobrenadante foi coletado e a concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976). A solução de Laemmli foi adicionada a alíquotas contendo 40 μg de proteína de cada animal e as amostras foram carregadas em geis de 7,5, 10 ou 12% acrilamida (TGX Stain-Free Gels, Bio-Rad). As proteínas foram separadas por eletroforese em um sistema de células MiniPROTEAN Tetra (Bio-Rad) por 2 h a 120 V em tampão contendo 140 mM de glicina, 37 mM Tris base e 1% de dodecil sulfato de sódio (Sigma Aldrich, St Louis, EUA). Os geis foram então ativados por irradiação com UV (Sistema de Imagiologia ChemiDoc XRS +, Bio-Rad) durante 1 min, o que produziu um sinal fluorescente a partir dos resíduos de triptofano presentes nas proteínas e foi registrada uma imagem do gel emitindo essa fluorescência. As proteínas separadas foram transferidas para

membranas de nitrocelulose (BioRad) durante 18 h a 40 V, numa solução de transferência arrefecida com gelo contendo glicina 140 mM, base Tris 37 mM e 20% de metanol. O teor total de proteína para cada amostra foi determinado pela emissão de fluorescência pelos resíduos de triptofano das proteínas separadas (ChemiDoc XRS+, Bio-Rad). As membranas foram bloqueadas com leite desnatado a 5% (Molico, Nestlé) em solução Tris-tamponada (25 mM, NaCl 137 mM) com Tween 20 (0,2%, TBST) por 1 h sob agitação à temperatura ambiente e incubadas com anticorpos primários diluídos em TBST, incluindo: anti Cu/Zn superóxido dismutase (anti-Cu/Zn SOD, 1:1000, Sigma Aldrich, Germany), anti óxido nítrico-sintase endotelial (anti-eNOS, 1:200, BD transductions Laboratories, San Jose, CA, EUA), anti-eNOS fosforilada (anti-p-eNOS (Ser1177), 1:200, Millipore, San Francisco, EUA) e anti-catalase (1:1000, Sigma Aldrich, Germany), sob agitação durante a noite a 4°C. Depois de cuidadosamente lavadas, as membranas foram incubadas com conjugado de StrepTactin-HRP (1:5000) e anticorpos secundários anti-camundongo (1:5000, SigmaAldrich, St. Louis, EUA) ou anti-coelho (1:5000, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), diluídos em albumina de soro bovino a 3% (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) em TBST durante 1 h com agitação antes de serem novamente lavados com TBST. Um substrato quimioluminescente (ácido cumárico 0,2 mM, luminol 1,25 mM, Tris-HCl 0,1 M e peróxido de hidrogênio a 0,06%) foi adicionado às membranas e as imagens foram obtidas com um sistema ChemiDoc XRS+. A intensidade da luminescência foi quantificada e normalizada pelo conteúdo total de proteínas da amostra usando o Image Lab 6.0.1 Software (Bio-Rad).

3.9 Análise Estatística

Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para cada conjunto de dados, o teste de Grubbs (com alfa 0,05) foi utilizado para identificar e excluir dados aberrantes (*outlier*). As diferenças foram analisadas ANOVA duas-vias, seguidas do pós-teste de Fisher para múltiplas comparações, quando aplicável. Para comparar as magnitudes dos efeitos do tratamento na resposta vascular, foram calculadas as diferenças nas áreas abaixo das curvas (dAUCs) entre os grupos. Para a análise da expressão

proteica, os dados estão expressos como a razão entre os sinais no immunoblot correspondente à proteína estudada e a proteína total, normalizados pelo valor de uma amostra do grupo controle. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa GraphPrism Software 6 (San Diego, CA, EUA). O $p < 0,05$ foi considerado para indicar significância.

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos da sobrecarga de ferro e do treinamento aeróbico sobre a capacidade de corrida

Os parâmetros avaliados dos testes de velocidade máxima de corrida são apresentados na Tabela 1. Todos os animais foram submetidos ao teste de capacidade física em esteira rolante, até a exaustão, tanto no início quanto ao final do protocolo de treinamento físico aeróbico e o tempo total até a fadiga foi obtido como uma medida do desempenho de corrida. O teste de VMC inicial mostra que a capacidade de corrida de todos os grupos foram semelhantes, demonstrando homogeneidade entre os quatro grupos experimentais e nenhum efeito da sobrecarga de ferro na capacidade de corrida. No entanto, as oito semanas de treinamento com exercício aeróbico em esteira foram capazes de melhorar substancialmente o tempo até a exaustão e a velocidade no teste de VMC nos grupos exercitados (CtEx e FeEx) em comparação com os sedentários (Ct e Fe). E entre os grupos exercitados teve uma leve redução no tempo à fadiga no grupo FeEx em comparação ao CtEx.

Tabela 1. Efeitos do treinamento aeróbico e da sobrecarga crônica ferro sobre capacidade aeróbica dos ratos

Capacidade Física	Ct (n=10)	CtEx (n=10)	Fe (n=10)	FeEx (n=10)
Tempo até a fadiga, inicial (min)	17,3±1,1	17,7±0,8	16,1±0,8	16,8±1,2
Velocidade máxima, inicial (m/min)	23,1±1,5	23,8±0,9	21,4±0,9	22,8±1,2
Tempo até fadiga, final (min)	10,3±0,9	27,7±0,8*	8,3±0,8	25,1±1,0**
Velocidade máxima, final (m/min)	17,3±0,1	33,7±0,7*	14,1±0,8#	31,8±1,1*

Dados são expressos como média ± EPM. ANOVA de duas vias seguido pelo teste post-hoc de Fisher. O número de animais usado está indicado nos parênteses. *p<0.05 efeito do exercício (vs. respectivo sedentário); #p<0.05 efeito da sobrecarga de ferro (vs. respectivo controle).

4.2 Efeitos da sobrecarga de ferro e do treinamento aeróbico sobre as características fenotípicas do modelo experimental

A tabela 2 mostra as características do modelo experimental nos parâmetros de ferro no sangue. Observamos que os grupos Fe e FeEx apresentaram aumento significativo do ferro sérico e no índice de saturação da Tf quando comparados aos grupos controles (Ct e CtEx). Já a UIBC apresentou-se reduzida nos grupos tratados com ferro-dextrano. Apesar disso, o exercício físico aeróbico não foi capaz de modificar estes parâmetros.

Tabela 2. Efeitos da sobrecarga de ferro e do treinamento aeróbico nos parâmetros hematológicos em ratos

Parâmetros	Ct (n=10)	CtEx (n=10)	Fe (n=10)	FeEx (n=10)
Ferro Sérico (µg/dL)	168±21	181±11	515±75 [#]	425±25 [#]
UIBC (µg/dL)	383±37	366±25	64±11 [#]	61±6 [#]
Transferrina (mg/dL)	129,4±4,9	127,2±2,7	116,5±3,4 [#]	121,3±4,8
Saturação Transferrina (%)	31±4,1	35,6±3	90,3±1,8 [#]	87,8±1,5 [#]

Dados são expressos como média ± EPM. UIBC: capacidade de ligação do ferro não saturado. ANOVA de duas vias seguido pelo teste post-hoc de Fisher. O número de animais usado está indicado nos parênteses. [#]p<0.05 efeito da sobrecarga de ferro (vs. respectivo controle).

Caracterizando o modelo experimental de acordo com a presença de ferro tecidual, observamos que no músculo gastrocnêmio o peso apresentou-se reduzido nos grupos exercitados (CtEx e FeEx) (Figura 10A) e o acúmulo tecidual de ferro aumentou significativamente nos grupos injetados com ferro-dextrano (Fe e FeEx) em comparação com os respectivos grupos controles (Ct e CtEx) (Figura 10B), pela análise da espectrometria.

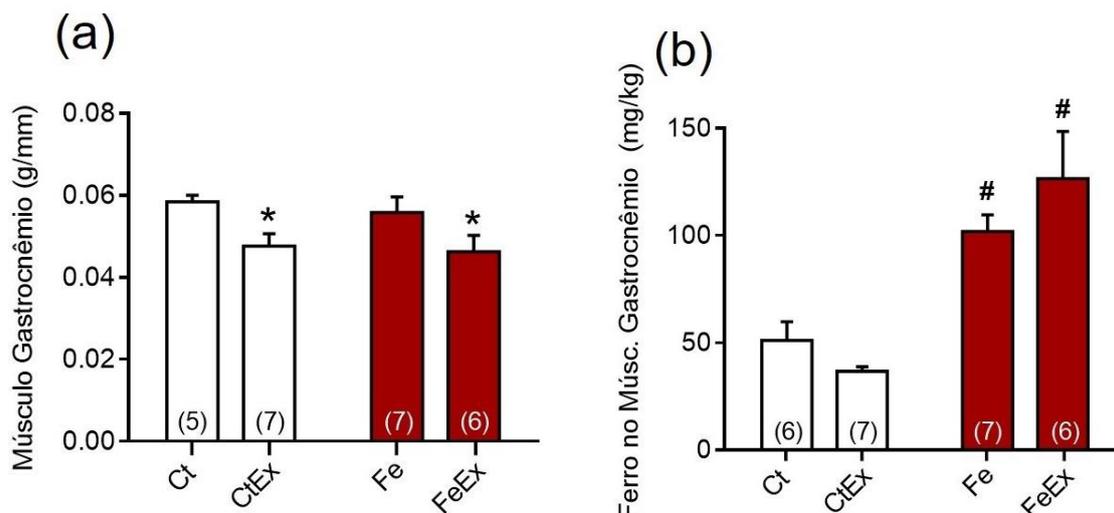


Figura 10. Efeitos da sobrecarga crônica de ferro e do treinamento físico aeróbico nos depósitos de ferro no músculo gastrocnêmio. (a) Peso dos músculos gastrocnêmios normalizado pelo comprimento da tíbia; **(b)** Teor de ferro nos músculos gastrocnêmios determinado pelo ensaio F-AAS. Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ efeito do exercício (vs. respectivo grupo sedentário); # $p < 0.05$ efeito da sobrecarga de ferro (vs. respectivo grupo controle). ANOVA de duas vias seguido pelo teste post-hoc de Fisher. O número de animais usado está indicado nos parênteses.

Da mesma forma, o depósito de ferro no fígado, medido pelo F-AAS, aumentou em ambos os grupos tratados com ferro, que também apresentaram pesos elevados desse órgão (Figura 11A e B). Confirmando o acúmulo tecidual pela coloração da azul da Prússia, identificamos uma deposição significativa de ferro nas células de Kupffer e no parênquima hepático nos grupos Fe e FeEx, enquanto nos grupos controle nenhum depósito foi exibido (Figura 11C). Semelhante ao que ocorreu com os níveis séricos de ferro, o protocolo de exercício aeróbico em esteira não foi capaz de alterar o acúmulo de ferro no músculo gastrocnêmio e no fígado nos animais que previamente receberam as injeções i.p. de ferro-dextrano.

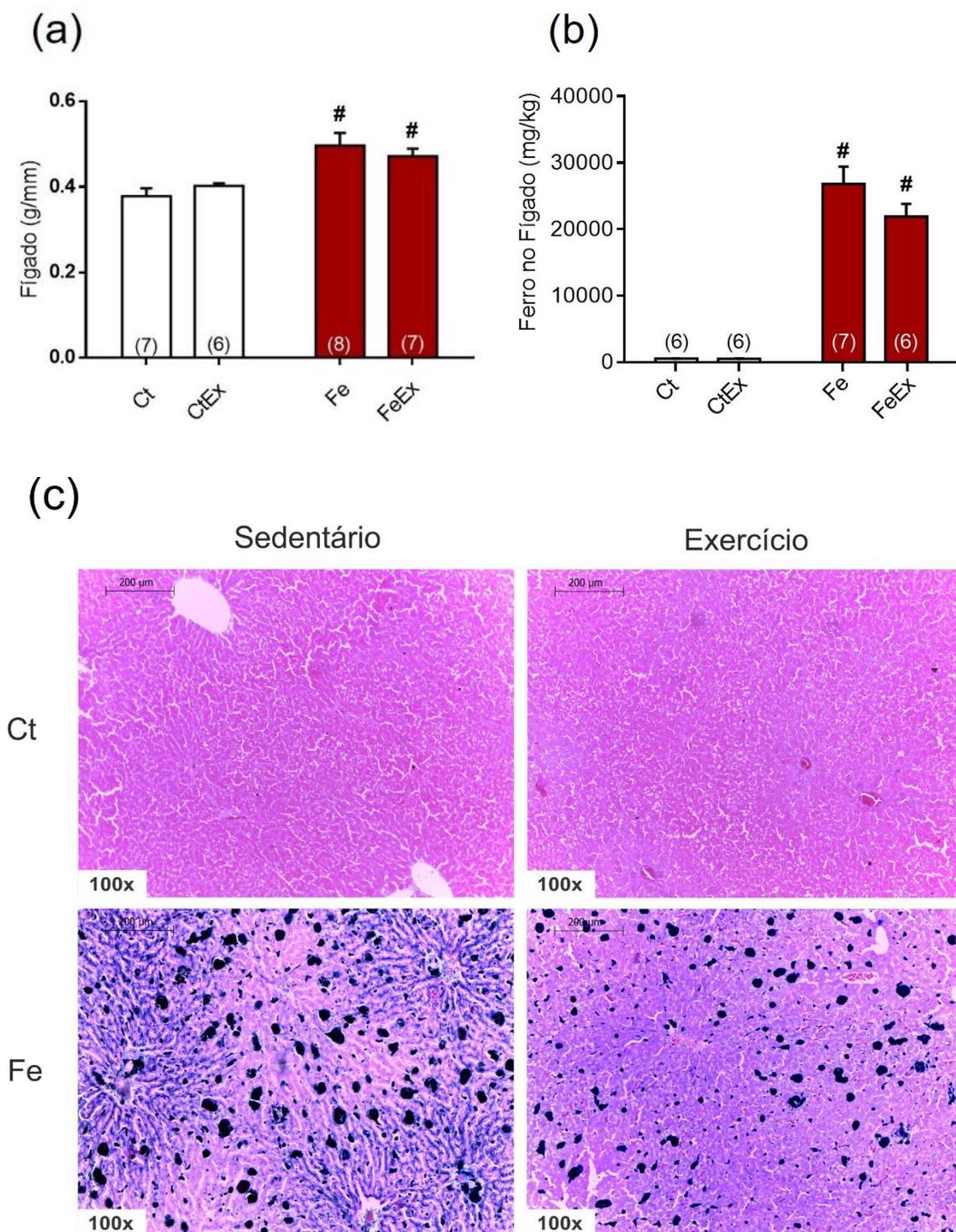


Figura 11. Efeitos da sobrecarga crônica de ferro e do treinamento físico aeróbico nos depósitos de ferro no fígado. (a) Peso do fígado normalizados pelo comprimento da tíbia; **(b)** Teor de ferro no fígado, determinado pelo ensaio AAS; **(c)** Depósitos de ferro nas seções histológicas do fígado evidenciados pelos pontos azuis escuros após coloração com azul da Prússia. Os dados são expressos como média \pm EPM. [#] $p < 0.05$ efeito da sobrecarga de ferro (vs. respectivo grupo controle). ANOVA de duas vias seguido pelo teste post-hoc de Fisher. O número de animais usado está indicado nos parênteses.

4.3 Efeitos da sobrecarga de ferro e do treinamento aeróbico sobre os parâmetros hemodinâmicos

Após a caracterização do modelo experimental, avaliamos o comportamento dos parâmetros hemodinâmicos arteriais (Tabela 3). Ademais, os dados hemodinâmicos (FC e PAD) dos ratos anestesiados foram semelhantes entre os grupos experimentais. Já o parâmetro da PAS apresentou-se reduzida no grupo CtEx em relação ao Ct e no grupo Fe em relação ao Ct, ou seja, o efeito do exercício físico e do ferro foram significantes e esses efeitos foram somados no grupo FeEx.

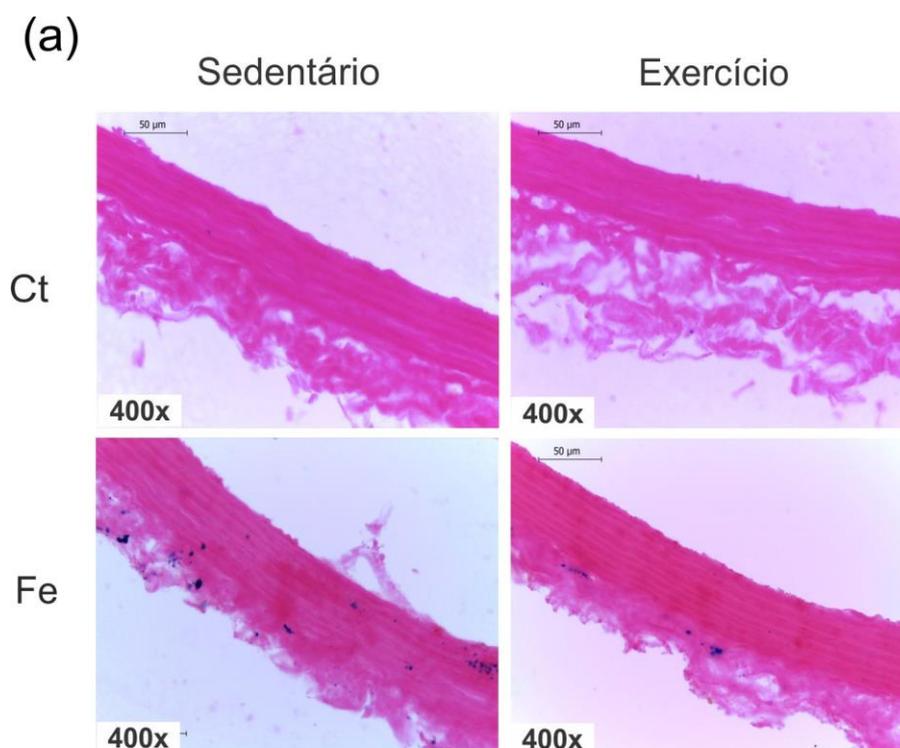
Tabela 3. Efeitos da sobrecarga de ferro e do treinamento aeróbico na hemodinâmica

Parâmetros	Ct (n=10)	CtEx (n=10)	Fe (n=10)	FeEx (n=10)
Pressão arterial sistólica (mmHg)	112±3	97±4*	99±3 [#]	87±3*
Pressão arterial sistólica (mmHg)	59±3	63±2	61±2	57±5
Frequência cardíaca (bpm)	318±22	325±22	344±13	299±28

Dados são expressos como média ± EPM. ANOVA duas vias e post-hoc de Fisher. O número de animais está indicado nos parênteses. *p<0.05 efeito do exercício (vs. respectivo sedentário); [#]p<0.05 efeito da sobrecarga de ferro (vs. respectivo controle).

4.4 Efeitos da sobrecarga de ferro e do treinamento aeróbico na morfologia e nos depósitos de ferro da aorta

Depois de caracterizado o modelo, iniciamos as análises vasculares com a morfometria da artéria. Nas secções de aortas coradas com azul da Prússia foram detectados pontos escuros correspondentes a depósitos de ferro nos grupos injetados com ferro-dextrano (Fe e FeEx), enquanto nos grupos controles (Ct e CtEx) nenhum sinal de depósito foi observado (Figura 12A). Além disso, pela medida semi-quantitativa de ferro, foi observado que os segmentos aórticos do grupo FeEx apresentaram depósitos menos evidentes na camada média em comparação com o grupo Fe não exercitado (Figura 12B). No entanto, na coloração do H&E, nenhuma alteração na espessura da parede foi encontrada entre os grupos, como mostra figura 13A e B.



(b)

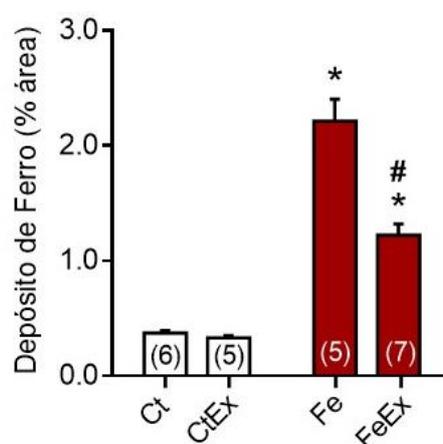


Figura 12. Efeitos da sobrecarga crônica de ferro e do treinamento físico aeróbico no depósito de ferro em aorta torácica de ratos. (a) Secções de aorta demonstrando depósitos de ferro indicado pelos pontos azuis escuros após coloração com azul da Prússia e **(b)** Análise quantitativa dos depósitos de ferro na aorta, expressa em porcentagem da área ocupada. Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ efeito do exercício (vs. respectivo grupo sedentário); # $p < 0.05$ efeito da sobrecarga de ferro (vs. respectivo grupo placebo). ANOVA duas vias seguido pelo teste post-hoc de Fisher. O número de animais usado está indicado nos parênteses.

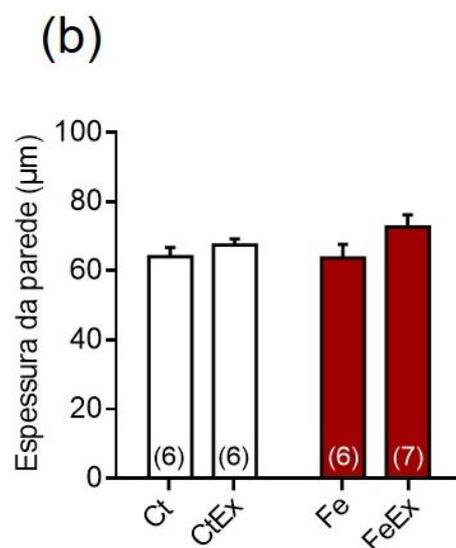
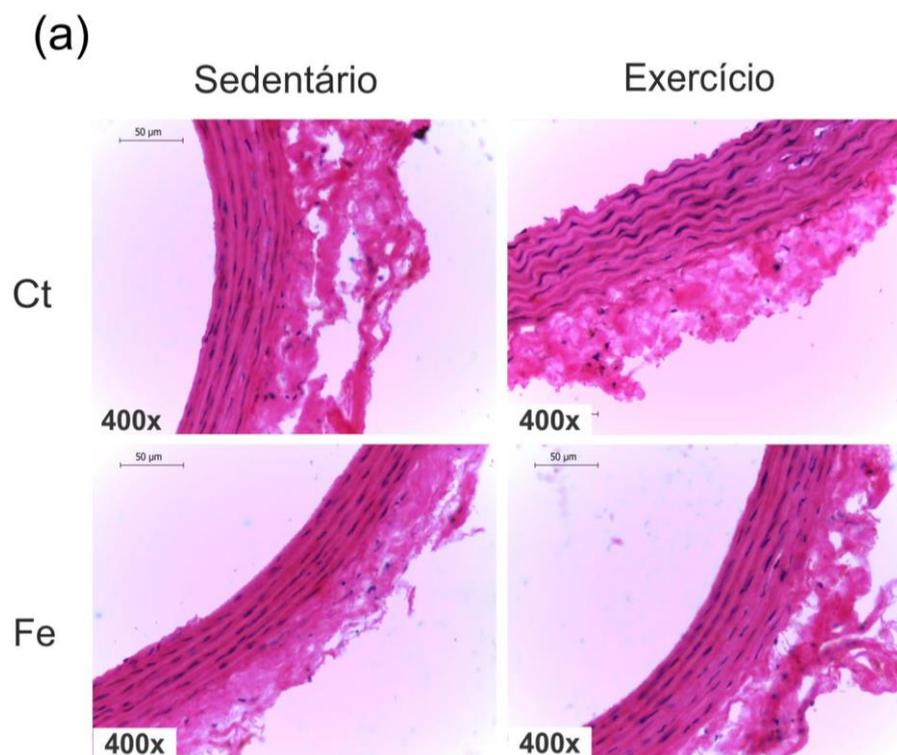


Figura 13. Efeitos da sobrecarga crônica de ferro e do treinamento físico aeróbico na morfologia da aorta torácica de ratos. (a) Coloração com hematoxilina e eosina de secções da aorta e **(b)** Espessura da parede da aorta. Os dados são expressos como média \pm EPM. ANOVA duas vias seguido pelo teste post-hoc de Fisher. O número de animais usado está indicado nos parênteses.

4.5 Efeitos da sobrecarga de ferro e do treinamento aeróbico na reatividade vascular da aorta

As respostas contráteis ao KCl (75mM) foram similares entre os grupos experimentais (Ct: 2.82 ± 0.18 ; Fe: 2.80 ± 0.09 ; CtEx: 2.54 ± 0.11 ; FeEx: 2.55 ± 0.09 g; $p > 0,05$), o que permitiu a normalização das respostas contráteis à fenilefrina pela respectiva contração máxima ao KCl do anel estudado. Investigamos se a sobrecarga prévia de ferro sobre o exercício físico levaria a alterações na função vascular e observamos que o protocolo de exercício aeróbico atenuou a resposta vasocontrátil induzida pela fenilefrina no grupo CtEx (Figura 14A). Entretanto, nos anéis do grupo submetido previamente as injeções de ferro-dextrano, o exercício não foi capaz de promover um efeito hipocostrátil (Figura 14B).

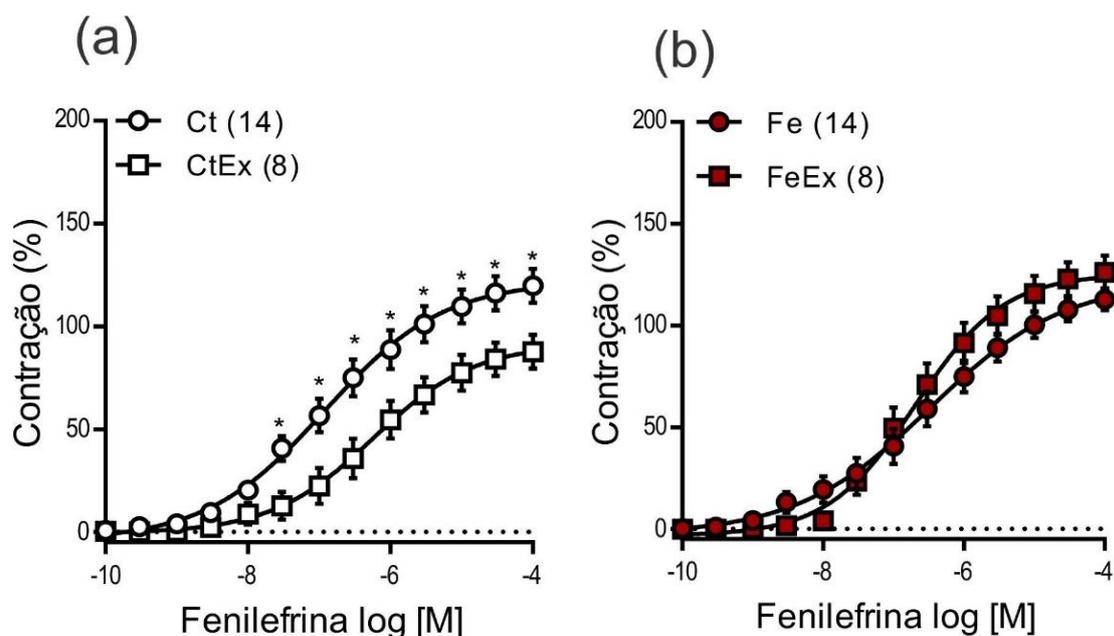
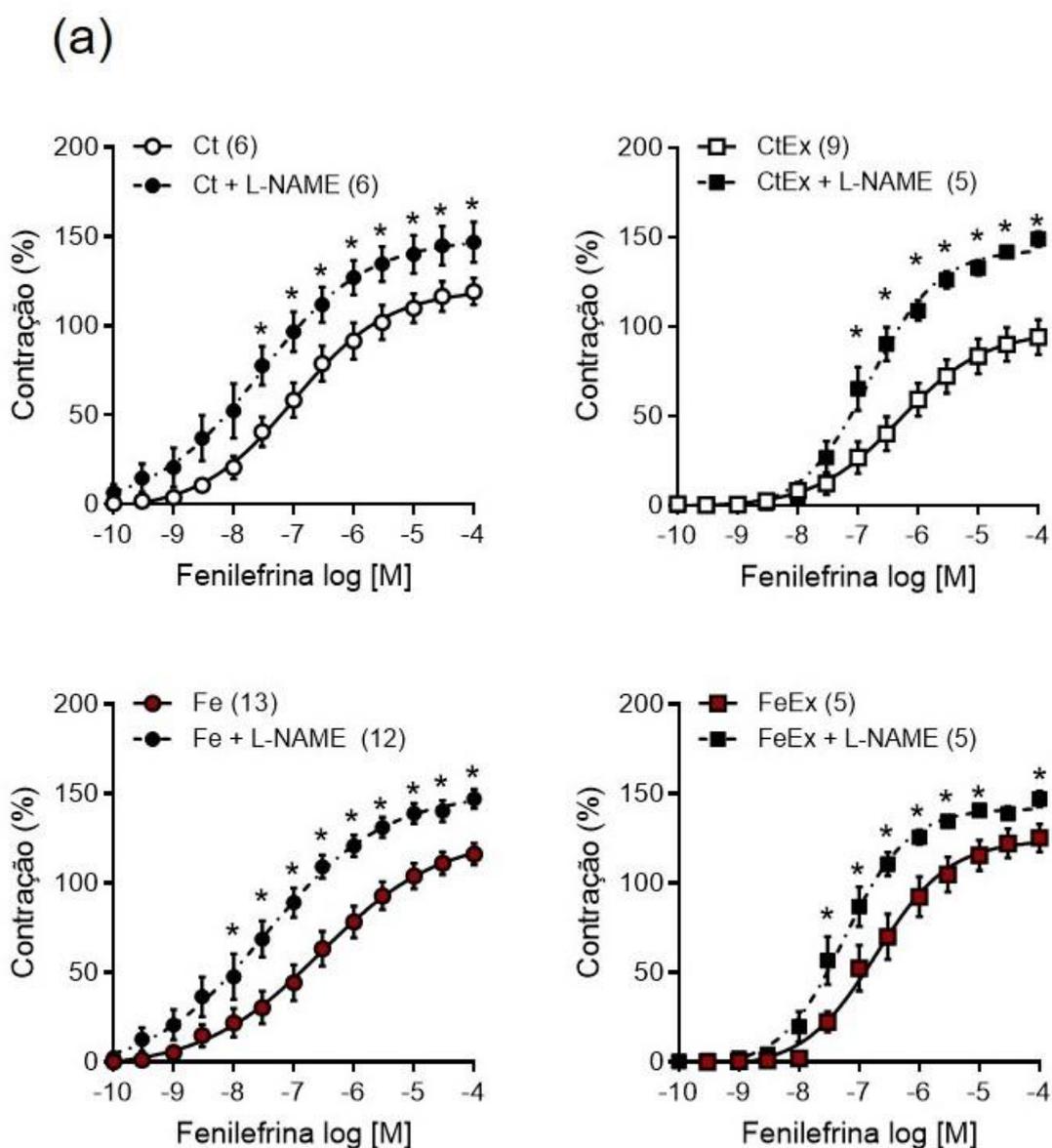


Figura 14. Efeitos da sobrecarga crônica de ferro e do treinamento físico aeróbico nas curvas concentração-resposta à fenilefrina na aorta torácica de ratos. (a) Grupos controle sedentário vs. controle exercitado; (b) Grupos ferro sedentário vs. sobrecarga de ferro exercitado. Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ vs. grupo sedentário. ANOVA duas vias seguido pelo teste post-hoc de Fisher. O número de animais usado está indicado nos parênteses.

4.5.1 Efeitos da sobrecarga de ferro e do treinamento aeróbico sobre a participação da via do óxido nítrico na reatividade vascular da aorta

Para avaliar a participação do NO na modulação da resposta contrátil à fenilefrina, os anéis foram pré-incubados com L-NAME (100 μ M), um inibidor não seletivo da NOS. Como observado na figura 15A, a incubação com L-NAME aumentou a resposta contrátil à fenilefrina em todos os grupos experimentais, porém o efeito da incubação com L-NAME teve uma magnitude maior no CtEx, enquanto o FeEx foi comparado aos grupos não exercitados (Ct e Fe), como demonstrado na comparação dos valores da dAUC (Figura 15B).



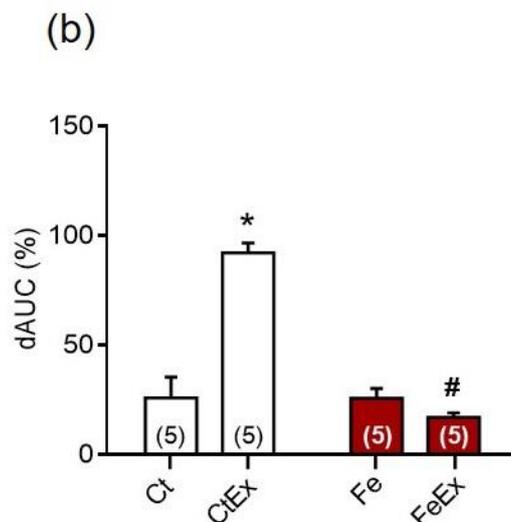


Figura 15. O papel do óxido nítrico nas curvas concentração-resposta à fenilefrina na sobrecarga de ferro e do treinamento físico aeróbico na aorta torácica de ratos. (a) Efeito da incubação com 100 μ M L-NAME nas curvas concentração-resposta à fenilefrina, e **(b)** A magnitude do efeito foi mensurada através das diferenças da área sob a curva com e sem L-NAME (dAUC). Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ vs. animal com L-NAME, nas curvas concentração-resposta à fenilefrina. * $p < 0.05$ efeito do exercício (vs. respectivo grupo sedentário); # $p < 0.05$ efeito da sobrecarga de ferro (vs. respectivo grupo controle). ANOVA duas vias seguido pelo teste post-hoc de Fisher. O número de animais usado está indicado nos parênteses.

Além disso, a fluorescência emitida pela técnica do DAF-2 mostrou aumento da detecção no grupo CtEx em relação ao Ct, mas não de FeEx em relação ao ferro (Figura 16A-B). Curiosamente, a análise de Western blot mostrou expressão inalterada da eNOS, fosfo-eNOS (ser1177) e da razão fosfo-eNOS/eNOS entre os grupos experimentais (Figura 17A-C).

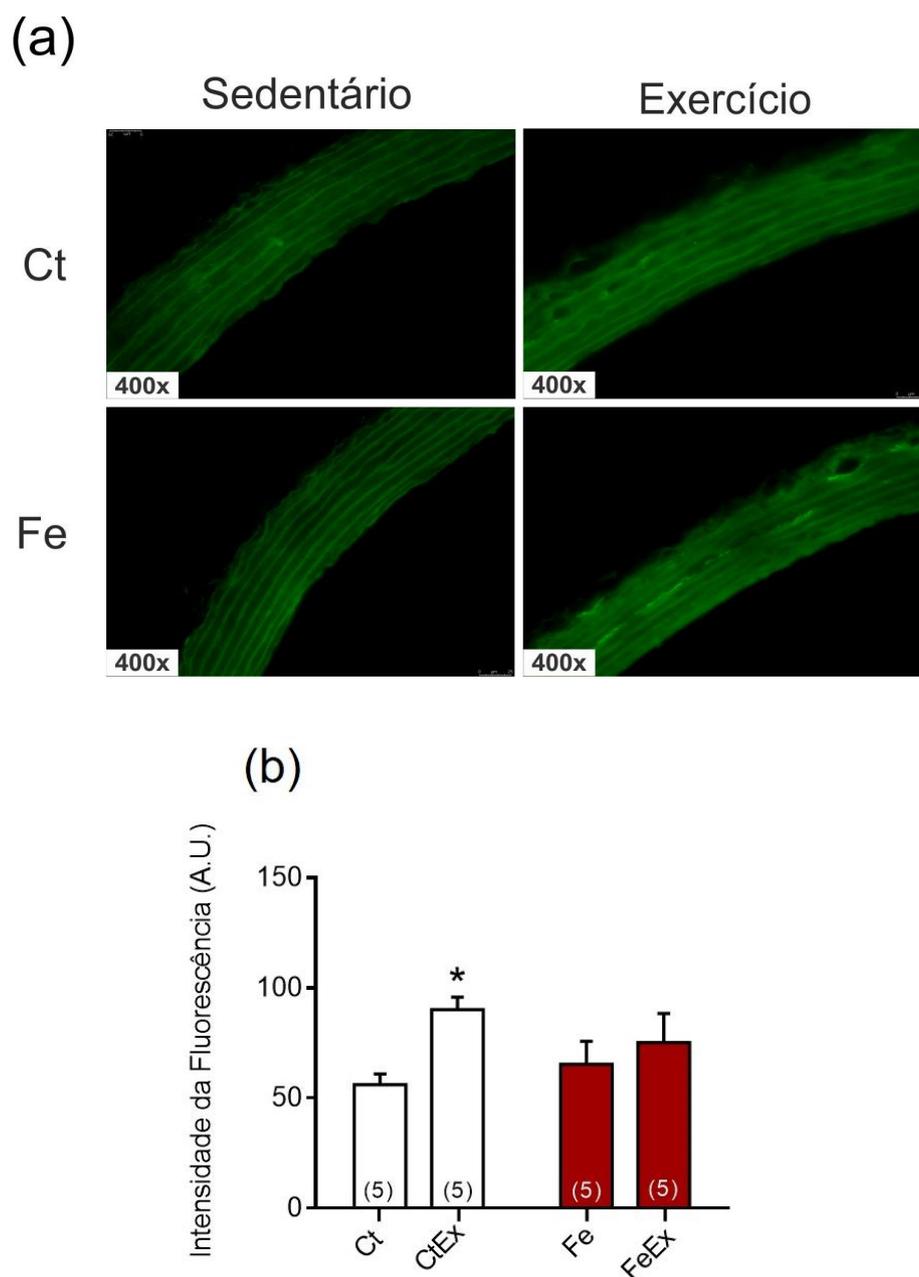


Figura 16. Detecção *in situ* de NO em segmentos de aorta torácica de ratos. (a) Microfotografias de seções de aorta na presença da sonda fluorescente (NO sensível) 4,5-diaminofluoreceim (DAF-2) e **(b)** Análise quantitativa da fluorescência emitida pelo NO nas seções aórticas. Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ efeito do exercício (vs. respectivo grupo sedentário). ANOVA duas vias seguido pelo teste post-hoc de Fisher. O número de animais usado está indicado nos parênteses.

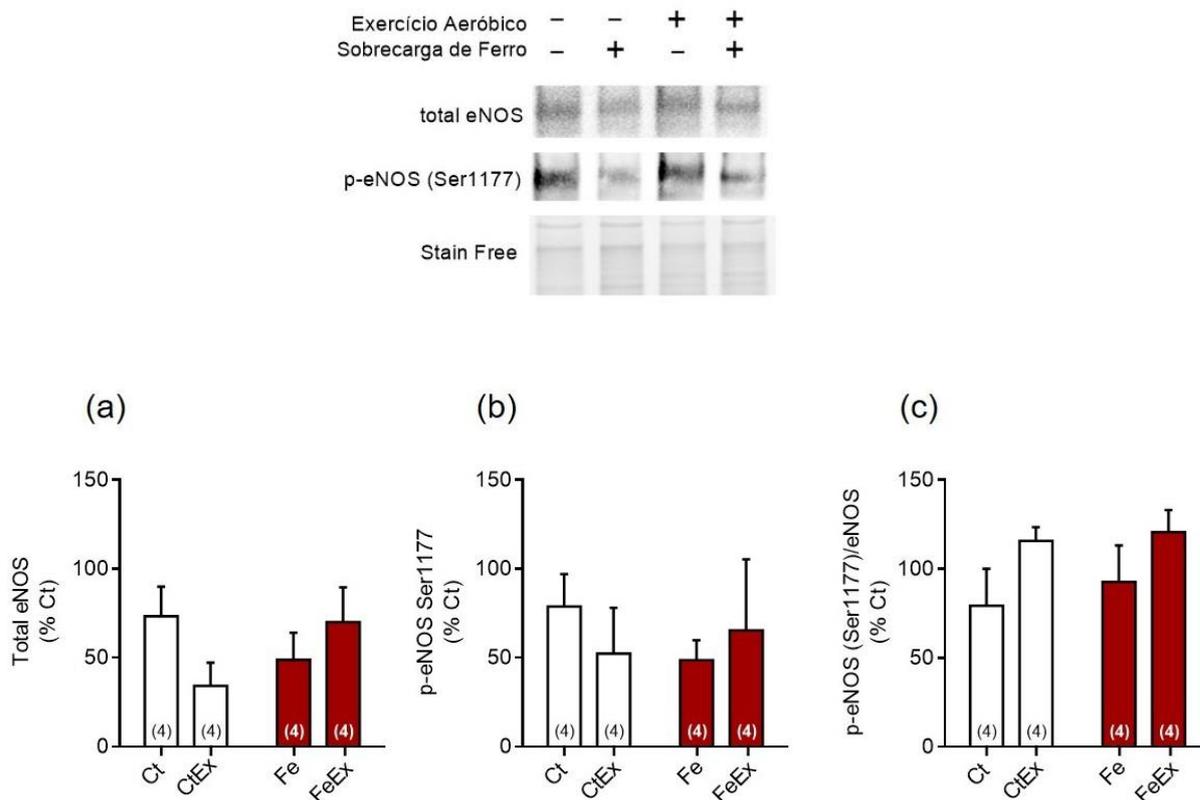


Figura 17. Efeitos da sobrecarga crônica de ferro e do treinamento físico aeróbico na expressão da eNOS. (a) Expressão proteica da **(b)** eNOS, **(c)** p-eNOS (Ser1177) e **(h)** a razão p-eNOS(Ser1177)/eNOS. Os dados são expressos como média \pm EPM. ANOVA duas vias seguido pelo teste post-hoc de Fisher. O número de animais usado está indicado nos parênteses.

4.5.2 Efeitos da sobrecarga de ferro e do treinamento aeróbico sobre a produção de $O_2^{\bullet-}$ na aorta

A produção de $O_2^{\bullet-}$ pode estar associada à redução da disponibilidade de NO e, dessa maneira, também promover aumento da reatividade vascular. Por conseguinte, para investigar se o efeito da sobrecarga de ferro estava associado ao aumento desta EROs, os anéis de aorta foram incubados com tempol (1 μ M), um mimético da SOD. Entretanto, como mostrado na figura 18, a incubação com tempol não teve efeitos significativos nas curvas de contração a fenilefrina e a produção *in situ* de $O_2^{\bullet-}$ usando o corante fluorescente DHE (Figura 19A-B) permaneceu inalterada nos grupos experimentais.

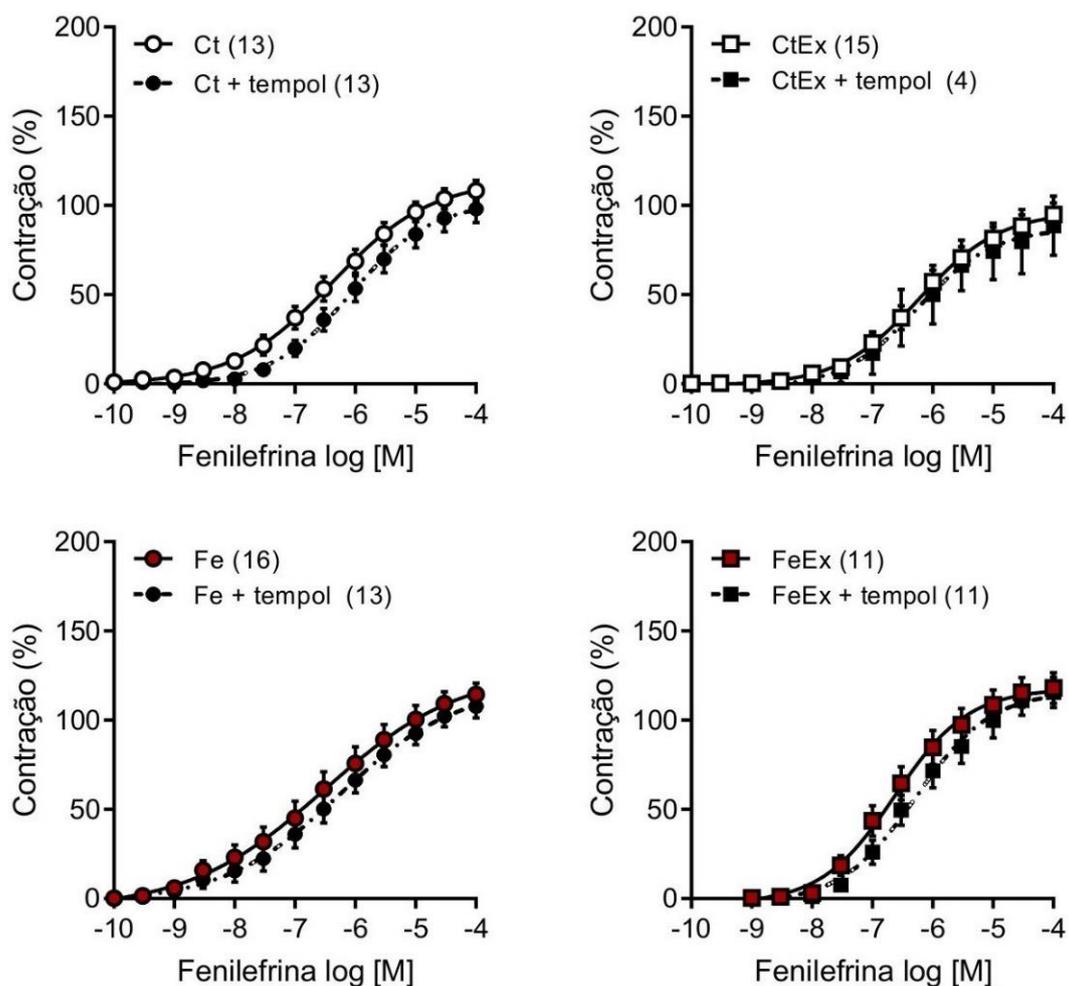


Figura 18. O papel das espécies reativas de oxigênio nos efeitos vasculares na sobrecarga de ferro e no treinamento físico aeróbico na aorta torácica de ratos. Efeito da incubação com 1 μ M TEMPOL nas curvas concentração-resposta à fenilefrina. Os dados são expressos como média \pm EPM. Nenhuma diferença estatística foi identificada pela ANOVA duas vias seguida pelo teste post-hoc de Fisher. O número de animais usado está indicado nos parênteses.

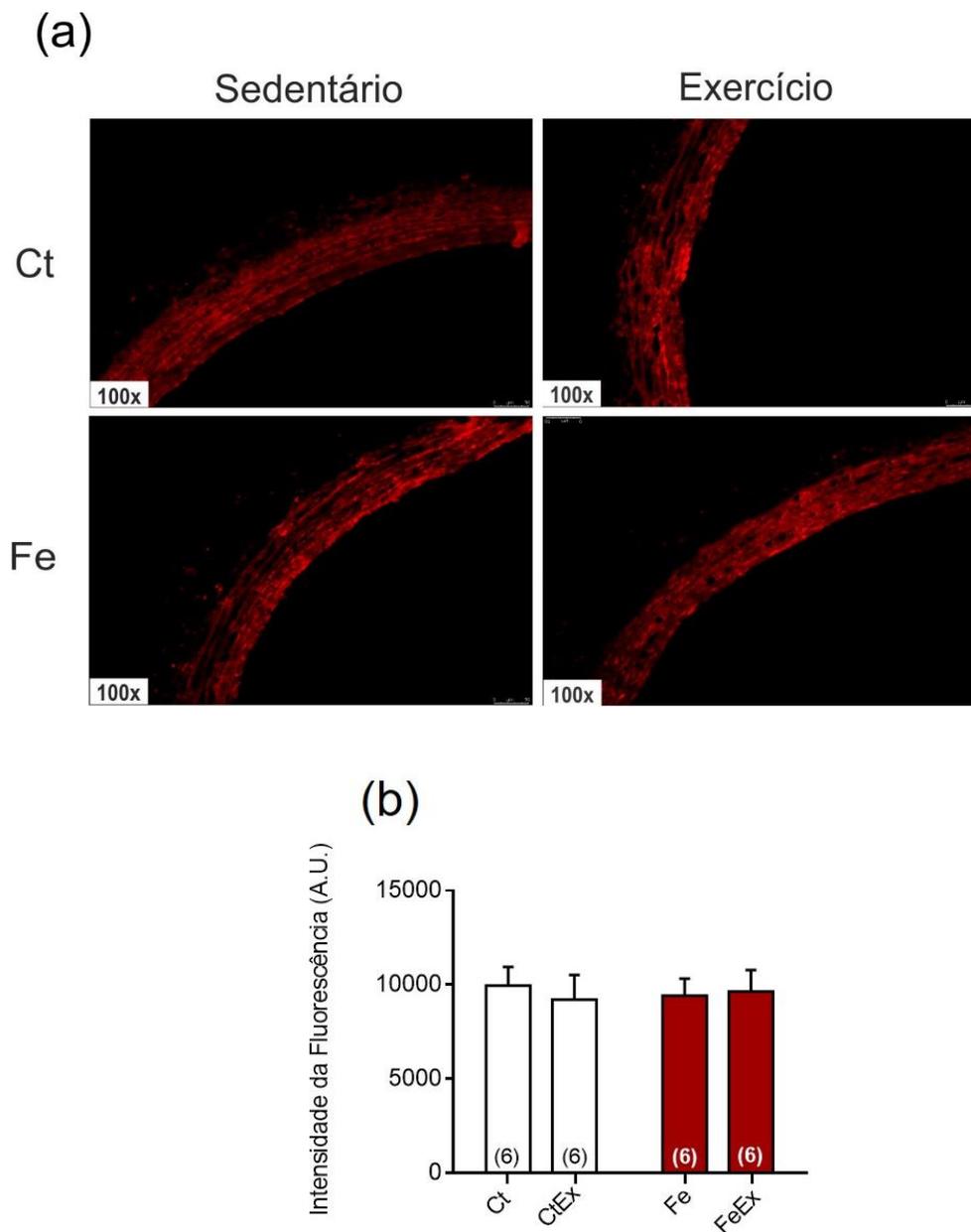
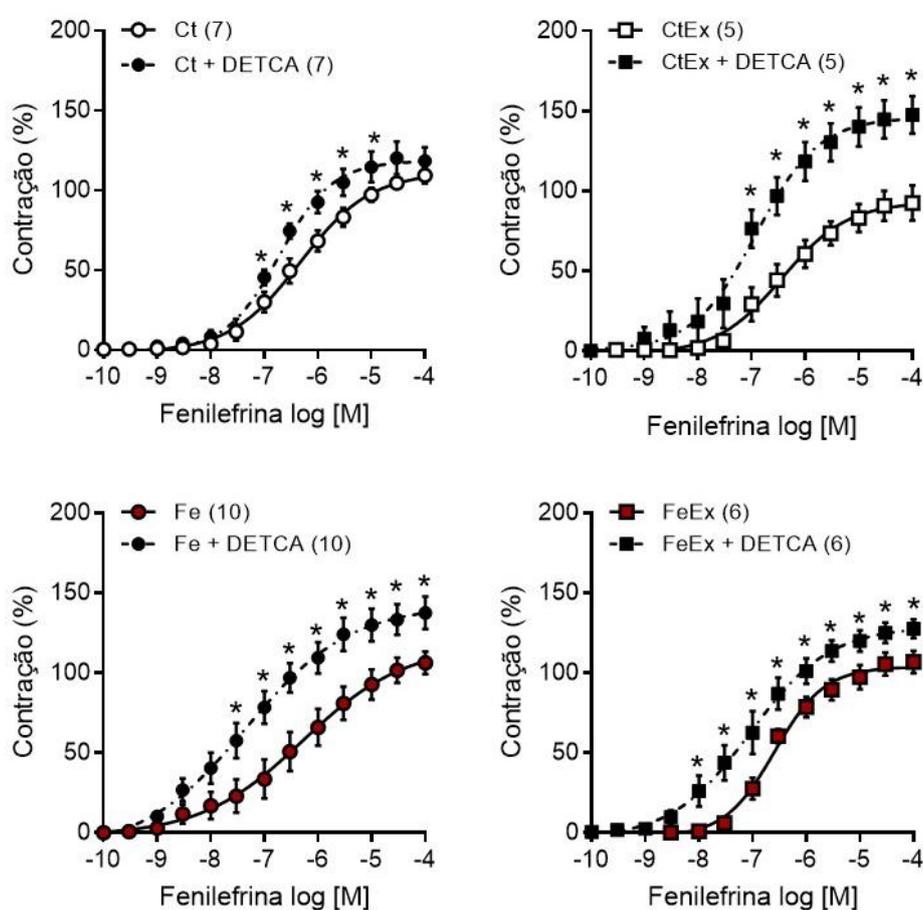


Figura 19. Produção *in situ* de $O_2^{\cdot-}$ em segmentos de aorta torácica de ratos. (a) Microfotografias de secções de aorta marcadas com DHE, e **(b)** Representação gráfica da quantificação de ânion superóxido nas secções de aorta. Os dados são expressos como média \pm EPM. Nenhuma diferença estatística foi identificada pela ANOVA duas vias seguido pelo teste post-hoc de Fisher. O número de animais usado está indicado nos parênteses.

4.5.3 Efeitos da sobrecarga de ferro e do treinamento aeróbico sobre a defesa antioxidante mediada pela SOD na aorta

Diante da produção aparentemente inalterada de $O_2^{\cdot-}$ nos anéis dos grupos injetados com ferro-dextrano, foi investigado se a atividade da SOD poderia estar alterada nesses grupos. A incubação com o inibidor da SOD, o DETCA (0,5 mM) aumentou as respostas contráteis a fenilefrina em todos os grupos (Figura 20A), mas em maior magnitude nos anéis isolados de animais exercitados que não foram previamente expostos à sobrecarga de ferro (CtEx) (Figura 20B). A magnitude do efeito do DETCA na curva de fenilefrina no grupo FeEx foi semelhante à do grupo Fe, sugerindo que a sobrecarga de ferro poderia restringir a supra-regulação da atividade e/ou expressão da SOD induzida pelo exercício físico. As análises de Western blot para expressão da proteína SOD1, no entanto, não mostraram diferença entre os grupos experimentais (Figura 20C).

(a)



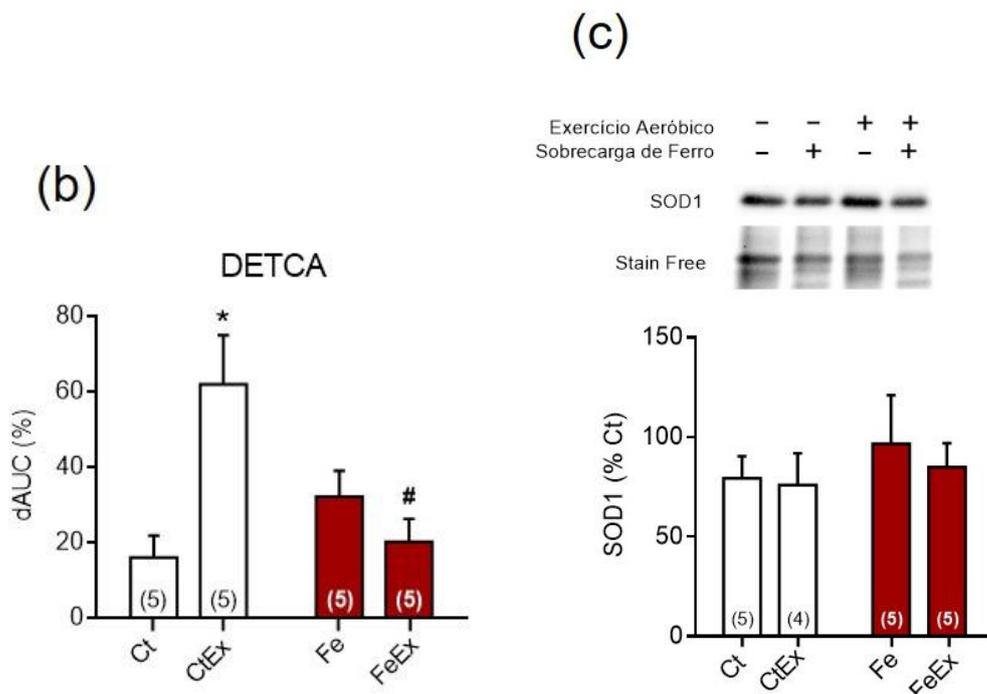


Figura 20. O papel da superóxido dismutase nos efeitos vasculares da sobrecarga de ferro e do treinamento físico aeróbico em aorta torácica de ratos. (a) Efeito da incubação com a superóxido dismutase, DETCA 0.5 mM. **(b)** A magnitude do efeito foi mensurada pela diferença da área sob as curvas (dAUC) **(c)** Expressão da SOD1. Os dados são média \pm EPM. * $p < 0.05$ vs. anel com DETCA nas curvas concentração-resposta. * $p < 0.05$ efeito do exercício (vs. respectivo grupo sedentário); # $p < 0.05$ efeito da sobrecarga de ferro (vs. respectivo grupo controle). ANOVA duas vias com post-hoc de Fisher. O número de animais está nos parênteses.

4.5.4 Efeitos da sobrecarga de ferro e do treinamento aeróbico no papel do peróxido hidrogênio e do radical hidroxila na aorta

Além do ânion superóxido, avaliamos se a participação de outro tipo de EROs estaria alterada no nosso modelo experimental, com a co-incubação com os antioxidantes catalase (1000UI/ml) e DMSO (100 mM), sequestradores de H_2O_2 e OH^\bullet respectivamente. Observamos uma redução na resposta contrátil à fenilefrina nos grupos sobrecarga de ferro (Figura 21A), entretanto quando avaliamos esta magnitude do efeito sobre área abaixo da curva, não evidenciamos uma diferença estatística (Figura 21B). Curiosamente, a expressão da proteína catalase apresentou-se aumentada nos grupos com sobrecarga de ferro (Fe e FeEx), o que não foi influenciado pelo exercício físico (Figura 21C).

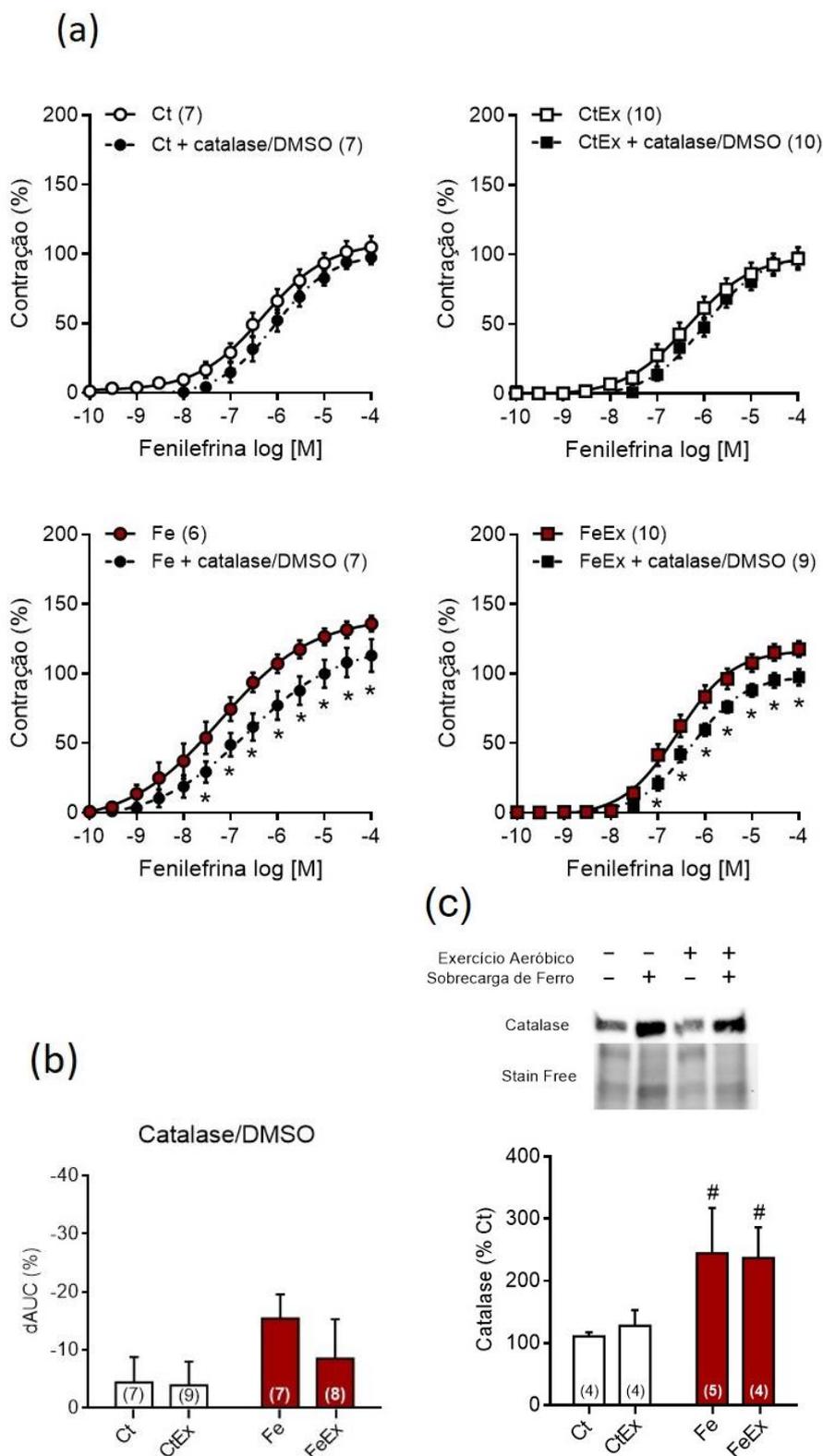


Figura 21. O papel do peróxido de hidrogênio e do radical hidroxila nos efeitos vasculares da sobrecarga de ferro e do treinamento físico aeróbico. (a) Efeito da co-incubação com 1000 U/ml catalase e 100 mM DMSO e **(b)** a magnitude do efeito dada pela diferença das áreas sob as curvas (dAUC). **(c)** Expressão da catalase. Os dados são média \pm EPM. * $p < 0.05$ vs. anel com catalase nas curvas concentração-resposta. # $p < 0.05$ efeito da sobrecarga de ferro (vs. respectivo grupo controle). ANOVA duas vias e post-hoc de Fisher. O número de animais está nos parênteses.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, investigamos os efeitos do exercício físico aeróbico na reatividade vascular de ratos previamente submetidos à sobrecarga de ferro. Os principais achados deste estudo, inéditos na literatura, sugerem que os efeitos benéficos do exercício físico aeróbico sobre a função vascular, tal como aumento da participação do NO e da SOD associados à redução da resposta contrátil, foram impedidos pela sobrecarga prévia de ferro. Além disso, foi evidenciado um aumento da expressão da catalase nos grupos tratados com ferro, possivelmente como uma resposta compensatória ao estresse oxidativo aumentado.

O modelo experimental para sobrecarga crônica de ferro utilizado neste estudo foi semelhante ao descrito anteriormente por Marques et al., (2015) e Ribeiro-Junior et al., (2017). Como esperado, todos os ratos injetados com ferro exibiram aumento do nível de ferro sérico, saturação da Tf e deposição tecidual nos órgãos, o que indica eficiência no protocolo utilizado no presente trabalho em mimetizar um quadro de sobrecarga de ferro.

Além disso, o protocolo com injeções crônicas de ferro-dextrano utilizado no presente estudo também levou ao acúmulo de ferro no músculo esquelético (gastrocnêmio) dos ratos, semelhante aos estudos clínicos (Torrance et al., 1968; Davidsen et al., 2007) e experimentais (Reardon & Allen, 2013; Ikeda et al., 2016) que sugerem uma relação direta entre concentração de ferro corporal e o aumento do ferro no tecido muscular esquelético, o que pode reduzir o desempenho no exercício físico.

É sugerido que pacientes com hemocromatose e talassemia, ambas condições sendo causas importantes de sobrecarga crônica de ferro em humanos, exibem capacidade reduzida para prática de exercício físico (Hahalis et al., 2008; Brandhagen et al., 2002; Davidsen et al., 2007). De fato, os níveis aumentados de ferro circulante e os depósitos de ferro no músculo esquelético podem contribuir para o comprometimento da aptidão muscular, devido à fraqueza e fadiga, como resultado do estresse oxidativo aumentado (Reardon & Allen, 2013). Embora não tenhamos medido os níveis de estresse oxidativo muscular esquelético, por não ser esse nosso objetivo principal, nossos

resultados mostraram que a capacidade de corrida, avaliada pelos parâmetros do teste de tolerância à fadiga e capacidade máxima de corrida, foi levemente reduzida pela sobrecarga de ferro, tanto no grupo sedentário ou no grupo exercitado. Todavia, é digno de nota que, pela ANOVA duas vias, o fator “exercício” foi significativamente mais forte para melhorar estes parâmetros do que o fator “ferro” para prejudicá-los. Além disso, o treinamento aeróbico não alterou o acúmulo de ferro no músculo gastrocnêmio em nenhum grupo, permanecendo o grupo FeEx com níveis de acúmulo de ferro muscular significativamente elevados em relação aos grupos não injetados com ferro, e semelhante ao nível do grupo Fe sedentário.

Nesse sentido, vários estudos demonstram que a sobrecarga de ferro, de fato, induz danos morfológicos e funcionais em vários órgãos em consequência do estresse oxidativo aumentado e do comprometimento do sistema antioxidante (Oudit et al., 2004; Zhang et al., 2014; Badria et al., 2015; Rossi et al., 2016; Bertoli et al., 2018). Os danos causados nos órgãos estão diretamente relacionados aos níveis altos de ferro sérico e acúmulo tecidual, tal como descrito para o fígado (Santos et al., 2012a; Santos et al., 2012b; Siddique & Kowdley 2012), o coração (Lou et al., 2009; Brewer et al., 2013), as glândulas endócrinas (Edwards et al., 1983; Mendler et al., 1999) e o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (Lucesoli et al., 1999; Rossi et al., 2016). Especificamente no sistema endócrino-reprodutor feminino, nós demonstramos previamente que mesmo sobrecargas agudas de ferro-dextrano em ratas já foram capazes de aumentar a geração de EROs e causar danos sobre diferentes sítios do eixo hipotálamo-hipofise-gonadal (Rossi et al., 2016).

Semelhante ao depósito de ferro no músculo esquelético, o protocolo de treinamento físico não foi capaz de alterar o acúmulo deste metal no fígado tampouco o nível de ferro circulante. Considerando que o ferro desempenha papel chave em processos de transporte de oxigênio e produção de energia, parece óbvio que o equilíbrio no metabolismo do ferro deve ser mantido em indivíduos que buscam a prática de exercício físico e também em atletas. Além disso, os efeitos do próprio exercício físico sobre a homeostase do ferro tem sido objetos de estudo. Há algumas décadas, alguns autores sugeriram que o tipo de modalidade e intensidade do exercício físico podem estar relacionados

a alterações hematológicas, tais como mudanças nos níveis do ferro circulante (Clement & Asmundson, 1982; Selby & Eichner, 1986). Por exemplo, no exercício mais intenso (resistido ou aeróbico de intensidade alta), foi relatado que a hemólise ocorre devido a fatores físicos, como o rompimento de glóbulos vermelhos na circulação devido o impacto ao chão, ou o aumento do atrito entre os glóbulos vermelhos e a parede das artérias devido ao aumento do fluxo sanguíneo (Kobayashi et al., 2014).

Outros fatores como o ácido láctico e o estresse oxidativo, também são atribuídos ao rompimento da membrana do eritrócito (Telford et al., 2003). Portanto, o desenvolvimento da hemólise induzida pelo exercício físico é atribuído não apenas a fatores físicos, mas também a fatores químicos. Além disso, ocorre alteração na síntese de mioglobina (Swearingen, 1986) e redução na síntese de eritropoietina, desacelerando a atividade eritropoiética (Parr et al., 1984). Portanto, fatores presentes em exercícios físicos mais intensos, sejam isoladamente ou em conjunto, tal como hemólise induzida por impacto, inflamação, sangramento gastrointestinal, suor e as perdas de ferro durante o ciclo menstrual pelas atletas do sexo feminino, poderiam ser responsáveis por alterações na concentração do ferro corporal caracterizadas inclusive por redução do ferro circulante (Dellavalle, 2013; Alaunyte et al., 2015; Díaz et al., 2015).

Assim, tal como revisado por Mateo & Laínez (2000), e mais recentemente por Sim et al. (2019), é frequente que atletas, principalmente do sexo feminino, procurem atendimento médico apresentando astenia, dificuldade para prática de treinos e uma relativa queda do rendimento esportivo, como consequência de deficiência de ferro, processo este denominado como anemia do atleta. Além disso, Liu et al., (2006) mostraram que o treinamento de natação de alta intensidade reduziu as reservas de ferro em ratas após dez semanas de treinamento, o que não foi evidenciado no grupo de intensidade moderada. Assim, acreditamos que o treinamento aeróbico de intensidade moderada de oito semanas que usamos no presente estudo não foi capaz de interferir significativamente na sobrecarga de ferro gerada em ratos machos adultos.

No que diz respeito aos parâmetros hemodinâmicos, não foi observada uma variação tão expressiva na pressão arterial. Esse resultado foi acompanhado de alterações de respostas da aorta, que é considerada uma artéria de condutância e não causa interferência na resistência sistêmica e, portanto, tem pouco efeito sobre a pressão arterial. O exercício físico aeróbico de fato tem sido associado a alterações importantes, principalmente na redução da pressão arterial sistólica em hipertensos (Ishikawa et al., 1999; Forjaz et al., 1998; Takata et al., 2003), e evidenciado também em normotensos adultos (Grassi et al., 1994). Da mesma forma, nossos resultados corroboram com outros estudos clínicos e experimentais de sobrecarga de ferro que apresentaram uma redução na pressão arterial sistólica significativa (Oudit et al., 2003; Oudit et al., 2004; Kramer et al., 2012). Em contrapartida, outros trabalhos não mencionam variação na pressão arterial (Gaenger et al., 2002; Cardoso et al., 2005; Kukongviriyapan et al., 2008; Cusmà Piccione et al., 2013).

É sabido que o treinamento físico aeróbico e até mesmo a prática de exercícios físicos estão relacionados à prevenção e tratamento de distúrbios cardiovasculares e metabólicos, como hipertensão, insuficiência cardíaca, diabetes mellitus, obesidade e aterosclerose (Yang et al., 2011; Braga et al., 2015; Carneiro-Junior et al., 2013; Takata et al., 2003; Belotto et al., 2010). De fato, o exercício físico é capaz de melhorar a capacidade cardiorrespiratória e a função cardíaca, além de reduzir a mortalidade em modelos experimentais e humanos, sendo inclusive constante em políticas de saúde pública em todo o mundo. É também consenso que o treinamento físico pode promover alterações agudas e crônicas na função vascular (Rodrigues et al., 2013). Como discutido mais adiante, um dos mecanismos pelos quais o exercício aeróbico promove esses efeitos é pelo aumento na biodisponibilidade de NO e/ou sua produção devido ao aumento do fluxo sanguíneo e do estresse de cisalhamento resultantes de uma adaptação gerada pelo exercício físico (Tinken et al., 2010, Graham & Rush, 2004; Fleming, 2010).

Outra resposta adaptativa ao exercício físico aeróbico é a melhora do sistema antioxidante. As enzimas antioxidantes agem bloqueando a formação de EROs ou interagindo com elas, tornando-as menos deletérias. O

treinamento físico de intensidade moderada é uma condição que favorece a homeostase oxidativa das células e tecidos, por diminuir os níveis basais de danos oxidativos e/ou aumentar a resistência ao estresse oxidativo (Schneider et al., 2004), como demonstra Gu et al., (2013) em seu estudo, em que o treinamento físico aumentou as atividades da SOD e da catalase em ratos espontaneamente hipertensos, contribuindo para diminuir as EROs. Evidências mostram que diferentes modalidades de exercício aeróbico (corrida ou natação) são favoráveis para as defesas antioxidantes, inclusive na parede vascular (Rush et al., 2000; Moraes et al., 2008; Claudio et al., 2013; Claudio et al., 2017). Como mencionado, o treinamento aeróbico pode minimizar os prejuízos cardiovasculares modulando positivamente o sistema antioxidante, porém nosso estudo indica que em uma situação de sobrecarga de ferro, estes efeitos benéficos são restringidos ou impedidos.

À semelhança do que se nota no conteúdo de ferro em diferentes sítios do organismo, também foram observados depósitos de ferro na parede vascular dos ratos submetidos a sobrecarga de ferro, conforme relatado anteriormente (Day et al., 2003) e inclusive em modelos experimentais semelhantes ao utilizado neste trabalho (Marques et al., 2015; Ribeiro Júnior et al., 2017; Fidelis et al., 2019; Marques et al., 2019). De maneira interessante, embora o exercício físico não tenha alterado o ferro circulante e os depósitos desse metal no fígado e no músculo esquelético, foi evidenciada uma reduzida deposição do ferro na parede vascular do grupo FeEx em comparação com o grupo Fe sedentário. Ainda assim, ambos os grupos injetados com ferro-dextrano apresentaram níveis consideravelmente elevados de ferro na parede vascular.

Nesse sentido, como o excesso de ferro aumenta o estresse oxidativo, que por sua vez desencadeia mecanismos moleculares que podem levar a danos vasculares, tem sido patente que estudos experimentais e clínicos demonstrem uma associação entre sobrecarga de ferro, estresse oxidativo, remodelamento e disfunção vascular (Gaenger et al., 2002; Day et al., 2003; Kukongviriyapan et al., 2008; Cusmà Piccione et al., 2013; Marques et al., 2015; Ribeiro Júnior et al., 2017; Fidelis et al., 2019). Por outro lado, como já mencionado, o exercício físico aeróbico é descrito como sendo capaz de

promover benefícios à estrutura e função da vasculatura, reduzindo a hipertrofia da parede (Brown 2003; Ye et al., 2019), rigidez (Tanaka et al., 2002) e a hiperreatividade contrátil (Bechara et al., 2008; Roque et al., 2013).

Em concordância com tais evidências, em nosso estudo os anéis isolados da aorta dos ratos submetidos ao treinamento aeróbico de oito semanas em esteira exibiram redução na resposta vasoconstrictora à fenilefrina, associada ao aumento da modulação pelo NO. De fato, está bem descrito na literatura que o exercício aeróbico promove melhora significativa na função endotelial através do aumento da biodisponibilidade do NO (Graham & Rush, 2004; Jordão et al., 2017; Couto et al., 2018), melhorando a resposta vasodilatadora (Hambrecht et al., 2000; Thompson et al., 2003) e reduzindo a resposta vasoconstritora (Jordão et al., 2017; Ye et al., 2019).

Os principais estímulos fisiológicos para síntese do NO são a força de arraste promovida pelo fluxo sanguíneo contra o endotélio e a pressão que o sangue exerce sobre a parede vascular (Tinken et al., 2010, Graham & Rush, 2004; Fleming, 2010). Em decorrência disso, um dos fatores que podem influenciar em sua biodisponibilidade é a prática de exercícios físicos, pois, por meio da tensão de cisalhamento na parede vascular em resposta ao esforço, esta promove adaptações fisiológicas e metabólicas importantes. Porém, de maneira interessante, esse efeito pode variar de acordo com o tipo de artéria, já que Roque et al., (2013) evidenciaram que o treinamento físico não afetou as respostas contráteis alteradas das artérias coronárias de ratos hipertensos, mas normalizou a hiperresponsividade das artérias mesentéricas aos níveis do grupo controle.

Por outro lado, quando o protocolo do exercício físico aeróbico foi realizado em ratos previamente tratados com ferro-dextrano para induzir sobrecarga sistêmica de ferro, este efeito anti-contrátil foi impedido. Ademais, o aumento da modulação pelo NO evidente no grupo CtEx em comparação ao grupo Ct foi perdido quando comparados os grupos FeEx e Fe. Embora a incubação com L-NAME tenha deslocado a curva de vasoreatividade concentração-resposta à fenilefrina em todos os grupos, este efeito foi mais pronunciado somente no grupo exercitado sem sobrecarga prévia de ferro. O

mesmo ocorreu na estimativa da biodisponibilidade do NO pela fluorescência ao DAF. Isso sugere que o estado de sobrecarga de ferro tenha atuado contrariamente aos efeitos potencialmente benéficos do exercício físico.

Essa ideia estaria em acordo com o sugerido não só por estudos clínicos (Gaenger et al., 2002; Yunker et al., 2006; Hahalis et al., 2008; Kukongviriyapan et al., 2008), mas também por trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa que relataram uma relação direta entre sobrecarga de ferro e disfunção vascular no modelo em ratos, caracterizada por resposta hipercontrátil devido ao comprometimento endotelial na aorta (Marques et al., 2015; Marques et al., 2019) artéria mesentérica de resistência (Ribeiro júnior et al., 2017) e artéria pulmonar de resistência (Bertoli et al., 2018). Apesar das evidências mencionadas e o fato de a sobrecarga de ferro prévia impedir os efeitos vasculares benéficos do exercício aeróbico, paradoxalmente, o grupo Fe no presente estudo não diferiu do grupo Ct. Se considerarmos que os estudos anteriormente mencionados que descrevem os efeitos danosos do ferro sobre a vasculatura de ratos foram feitos após 4 semanas de sobrecarga, e que no presente estudo a sobrecarga de ferro foi interrompida no final da 4ª semana, poderíamos especular que uma recuperação da função vascular poderia ocorrer ao longo das semanas subsequentes, levando à aparente normalidade na avaliação “in vitro” da reatividade vascular dos anéis de aorta realizada na 12ª semana.

De acordo com nossos resultados funcionais, os dados sugerem que o exercício aumentou o papel do NO na aorta do grupo CtEx, em resposta a biodisponibilidade elevada e/ou melhor resposta vascular ao NO liberado, enquanto a sobrecarga de ferro prejudicou ou impediu isso de ocorrer. Tanto a hipótese de aumento da liberação endotelial quanto de maior resposta vascular ao NO induzidos pelo treinamento físico são apoiadas por estudos anteriores. Durante o exercício físico, o aumento do fluxo sanguíneo gera estresse hemodinâmico na parede vascular, que induz não apenas a liberação de NO (Graham & Rush 2004; Fleming 2010; Tinken et al., 2010) mas também leva ao aumento da sensibilidade do músculo liso vascular ao NO disponível em anéis de aorta (Lash & Bohlen 1985; Delp et al., 1993), coronária (Haskell et al., 1993) e de artérias mesentéricas (Chen et al., 2001). Estas energias mecânicas na

parede da artéria são responsáveis pelas alterações agudas durante o exercício físico. Tal atuação mecânica induz a formação de eNOS (Tinken et al., 2010; Fleming, 2010) que, por sua vez, produz óxido nítrico. O aumento na produção de NO é, provavelmente, o principal fator responsável pelos benefícios vasculares que o exercício aeróbico produz, uma vez que sua biodisponibilidade reduzida pode gerar uma série de efeitos deletérios sobre o sistema vascular, como disfunção endotelial e conseqüentemente um processo de vasodilatação diminuída (Graham & Rush, 2004).

Além dos danos diretos sobre as células que compõem os vasos sanguíneos, as EROs promovem disfunção endotelial também por reduzirem a biodisponibilidade do NO. Essa redução advém da reação do $O_2^{\cdot-}$ com a molécula de NO produzida pelas células endoteliais com conseqüente redução na oferta de NO para o processo de vasodilatação e, assim, menor resposta relaxante dependente do endotélio. Esse efeito pode ser devido a aumento da síntese de EROS mas também pode estar associado a uma redução na expressão de enzimas antioxidantes, tal como a SOD (Green et al., 2004). Assim, o papel da SOD na função vascular se destaca por proteger as células dos efeitos tóxicos das EROs e aumentar a biodisponibilidade de NO para as células musculares lisas, mantendo uma adequada regulação do tônus vascular (Yang et al., 2011; Claudio et al., 2017; Jordão et al., 2017).

Dessa maneira, enquanto a atividade antioxidante reduzida tem sido implicada no dano oxidativo em várias doenças vasculares, o exercício aeróbico atua benéficamente não apenas por reduzir os sistemas enzimáticos na produção de EROs, mas também é um importante ativador dos sistemas de defesa antioxidante (Green et al., 2004). Em destaque, sabe-se que o exercício físico é capaz de estimular a expressão da enzima SOD, aumentando assim a degradação do $O_2^{\cdot-}$ (Valko et al., 2007; Yang et al., 2011; Claudio et al., 2013; Jordão et al., 2017). E de fato, pudemos perceber que a incubação com o inibidor da SOD, o DETCA, foi capaz de aumentar de forma significativa a reatividade vascular à fenilefrina no grupo CtEx em comparação com o efeito promovido no grupo Ct. Entretanto, similar ao identificado para a reatividade vascular e o papel do NO, esse aumento na participação da SOD promovido pelo exercício físico aeróbico não foi observado nos anéis isolados do grupo

exercitado que fora previamente submetido à sobrecarga de ferro, sugerindo uma perda do efeito antioxidante aumentado pelo exercício. Como a expressão proteica da SOD1 não foi alterada em nenhum dos grupos, o efeito diferenciado da incubação dos anéis com o inibidor da SOD sobre a vasoconstrição induzida pela fenilefrina pode ter sido devido ao aumento da atividade enzimática promovido pelo exercício físico aeróbico, que por sua vez, seria reduzida pela sobrecarga de ferro. De acordo com estudos anteriores, o exercício físico pode aumentar a participação da SOD na modulação da vasorreatividade (Cooper et al., 2002; Claudio et al., 2013; Fernandes et al., 2017), enquanto a sobrecarga crônica de ferro devido à beta-talassemia (Hershko 2010) ou o acúmulo de ferro na parede arterial em estudos experimentais (Zhang et al., 2014; Badria et al., 2015; Marques et al., 2019) foram associados à diminuição dos mecanismos de defesa antioxidante, tal como SOD e catalase.

Além disso, ao longo dos últimos anos nosso grupo de pesquisa tem demonstrado que as alterações na função vascular devido à sobrecarga crônica de ferro em ratos estão associadas ao aumento do estresse oxidativo, não apenas por uma capacidade antioxidante reduzida, mas também devido ao aumento da produção de EROs (Marques et al., 2015; Ribeiro Júnior et al., 2017; Bertoli et al., 2018; Marques et al., 2019). Como já mencionado, entre as EROs, o $O_2^{\cdot-}$ desempenha um papel importante na alteração da reatividade vascular devido à degradação metabólica do NO (Zhou et al., 2000; Higashi et al., 2009). No entanto, no presente modelo de sobrecarga de ferro de 4 semanas e observação ao final da 12ª semana, tanto o efeito do TEMPOL, um varredor de $O_2^{\cdot-}$ na reatividade vascular, como a produção *in situ* de $O_2^{\cdot-}$ pela técnica do DHE, não foram diferentes entre os grupos experimentais, sugerindo aparentemente não haver biodisponibilidade alterada de $O_2^{\cdot-}$ na aorta.

Entretanto, é importante ressaltar que a aparente produção inalterada de $O_2^{\cdot-}$ pode ser devido a alguma conversão desta para outro tipo de EROs. De fato, a dismutação de $O_2^{\cdot-}$ resulta na produção de H_2O_2 , que também desempenha um papel importante na reatividade vascular, não apenas diretamente, mas também pode participar das reações de Fenton e Haber-Weiss na presença de ferro, formando assim metabólitos secundários

prejudiciais como $\bullet\text{OH}$ (Wardman et al., 1996; Cai et al., 2005; Thakali et al., 2006). Embora o efeito da incubação da catalase não tenha sido alterado nos dois grupos de sobrecarga de ferro, a expressão proteica da catalase foi aumentada nesses anéis de aorta. Curiosamente, Marques et al., (2015) descreveram efeito significativo da incubação com a catalase em aortas de ratos com sobrecarga de ferro avaliadas imediatamente ao fim da 4ª semana de tratamento, indicando aumento da produção local de H_2O_2 , possivelmente sem resposta antioxidante eficiente, uma vez que a expressão da proteína da catalase não fora alterada naquele estudo. Utilizando este mesmo raciocínio, nossos dados sugerem então que, durante as 8 semanas subsequentes após as 4 semanas de injeções de ferro, o H_2O_2 deve passar a não mais desempenhar um papel na função vascular, provavelmente como resultado de uma *upregulation* compensatória da catalase.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, apesar dos conhecidos efeitos benéficos do exercício físico aeróbico sobre a função vascular, nossos resultados indicam, pela primeira vez, que a sobrecarga prévia de ferro impediu essas melhorias. O efeito anticonstrítil mediado pelo aumento da biodisponibilidade do NO e de uma resposta antioxidante eficiente promovido pelo exercício aeróbico foi anulado em aortas torácicas de ratos com sobrecarga de ferro e posteriormente exercitados.

Ainda que se caracterize como uma pesquisa básica em modelo animal, o valor prático deste estudo se baseia na ideia de que embora o exercício aeróbico possa ser indicado para melhorar a função vascular e reduzir o risco cardiovascular como um agente promotor de saúde, atenção deve ser dada aos praticantes de exercício físico que fazem o uso de suplementação de ferro, pois o excesso de ferro prejudica órgãos e sistemas induzindo estresse oxidativo. E atenção deve ser dada também aos pacientes com sobrecarga de ferro, nos quais a quelação de ferro e as terapias antioxidantes devem ser prioritárias para garantir os efeitos benéficos do exercício físico, considerando que estes efeitos serão anulados ou até mesmo podem complicar possíveis

alterações vasculares. Consideramos uma questão importante a ser discutida e que pode estimular e incentivar mais pesquisas clínicas e experimentais sobre esse assunto.

7 REFERÊNCIAS

Alaunyte I, Stojceska V, Plunkett A (2015) Iron and the female athlete: a review of dietary treatment methods for improving iron status and exercise performance. *J Int Soc Sports Nutr* 12:38.

Auersperger I, Branko S, Leskosek B, Knap B, Jerin A, Lainscak M (2013) Exercise-induced changes in iron status and hepcidin response in female runners. *PLoS One* 8(3):e58090.

Avila RA, Silva MASC, Peixoto JV, Kassouf-Silva I, Fogaça RTH, dos Santos L (2016) Mechanisms involved in the in vitro contractile dysfunction induced by different concentrations of ferrous iron in the rat myocardium. *Toxicol In Vitro* 36:38-45.

Badria FA, Ibrahim AS, Badria AF, Elmarakby AA (2015) Curcumin Attenuates Iron Accumulation and Oxidative Stress in the Liver and Spleen of Chronic Iron-Overloaded Rats. *PLoS One* 10(7):2255-62.

Bartfay WJ, Bartfay E (2000) Iron-overload cardiomyopathy: evidence for a free radical--mediated mechanism of injury and dysfunction in a murine model. *Biol Res Nurs* 2(1):49-59.

Bechara LRG, Tanaka LY, dos Santos AM, Jordão CP, de Sousa LGO, Bartholomeu T, Ramires PR (2008) A single bout of moderate-intensity exercise increases vascular NO bioavailability and attenuates adrenergic receptor-dependent and -independent vasoconstrictor response in rat aorta. *J Smooth Muscle Res* 44(3-4):101-111.

Belotto MF, Magdalon J, Rodrigues HG, Vinolo MAR, Curi R, Pithon-Curi TC, Hatanaka E (2010) Moderate exercise improves leucocyte function and decreases inflammation in diabetes. *Clin Exp Immunol* 162(2):237-43.

Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, Chamberlain AM, Chang AR, et al (2019) Heart disease and stroke statistics update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 139(10):e56-e528.

Bertagnolli M, Schenkel PC, Campos C, Mostarda CT, Casarini DE, BellóKlein A, et al (2008) Exercise training reduces sympathetic modulation on cardiovascular system and cardiac oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 21(11):1188-93.

Bertoli SR, Marques VB, Rossi EM, Carneiro MT, Simões MR, dos Santos L (2018) Chronic iron overload induces vascular dysfunction in resistance pulmonary arteries associated with right ventricular remodeling in rats. *Toxicology Letters* 295:296-306.

Braga VA, Couto GK, Lazzarin MC, Rossoni LV, Medeiros A (2015) Aerobic exercise training prevents the onset of endothelial dysfunction via increased nitric oxide bioavailability and reduced reactive oxygen species in an experimental model of menopause. *PLoS One* 10(4):1-13.

Brandhagen DJ, Fairbanks VF, Baldus W (2002) Recognition and management of hereditary hemochromatosis. *Am Fam Physician* 65(5):853-60.

Brasil. Ministério da Saúde (MS). Informações de Saúde. Estatísticas Vitais Brasília: MS; 2016

Bressy, FR, Brito GB, Barbosa IS, Teixeira LSG, Korn MGA (2013) Determination of trace element concentrations in tomato samples at different stages of maturation by ICP OES and ICP-MES following microwave-assisted digestion. *Microchemical Journal* 109:145-149.

Brewer C, Otto-Duessel M, Wood RI, Wood JC (2013) Sex differences and steroid modulation of cardiac iron in a mouse model of iron overload. *Transl Res* 163(2):151-9.

Brown MD (2003) Exercise and coronary vascular remodelling in the healthy heart. *Exp Physiol* 88(5):645-58.

Bruinvels G, Burden R, Brown N, Richards T, Pedlar C (2016) The prevalence and impact of heavy menstrual bleeding (menorrhagia) in elite and non-elite athletes. *PLoS One*, 11(2), e0149881.

Burden RJ, Morton K, Richards T, Whyte GP, Pedlar CR (2015) Is iron treatment beneficial in, iron-deficient but non-anaemic (IDNA) endurance athletes? A systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med* 49(21):1389-97.

Burke DE, Johnson JV, Vukovich MD, Kattelman KK (2012) Effects of lean beef supplementation on iron status, body composition and performance of collegiate distance runners. *Food Nutr Sci* 3(6):810-21.

Cai H (2005) Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms and consequences, *Cardiovasc. Res* 68(1):26–36.

Camaschella C (2015) Iron deficiency anemia. *N Engl J Med* 372(19):1832-43.
h

Campos JC, Queliconi BB, Dourado PMM, Cunha TF, Zambelli VO, Bechara LRG, Kowaltowski AJ, Brum PC, Mochly-Rosen D, Ferreira JCB (2012) Exercise training restores cardiac protein quality control in heart failure. *PLoS One* 7(12):e52764.

Cardoso LM, Pedrosa ML, Silva ME, Moraes MF, Colombari E, Chianca DA (2005) Baroreflex function in conscious rats submitted to iron overload. *Braz J Med Biol Res* 38(2):205-214.

Carneiro-Junior MA, Quintao-Junior JF, Drummond LR, Lavorato VN, Drummond FR, da Cunha DN, et al (2013) The benefits of endurance training in cardiomyocyte function in hypertensive rats are reversed within four weeks of detraining. *J Mol Cell Cardiol.* 57:119-12.

Carvalho, M.H.C., Nigro, D., Lemos, V.S., Tostes, R.C.A., Fortes, Z.B., 2001. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Rev Bras Hipertens.* 8(1).

Chen SJ, Wu CC, Yen MH (2001) Exercise training activates large-conductance calcium-activated K(+) channels and enhances nitric oxide production in rat mesenteric artery and thoracic aorta. *J Biomed Sci* 8(3):248-55.

Cheng LJ, Yang CC, Hsu LY, Lin MT, Jen JC, Chen HI (1999) Acute Exercise Enhances Receptor-Mediated Endothelium-Dependent Vasodilation by Receptor Upregulation. *J Biomed Sci* 6(1):22-27.

Claudio ER, Endlich PW, Santos RL, Moyses MR, Bissoli NS, Gouvea SA, et al (2013) Effects of chronic swimming training and estrogen therapy on coronary vascular reactivity and expression of antioxidant enzymes in ovariectomized rats. *PLoS One* 8(6):e64806.

Claudio ER, Almeida SA, Mengal V, Brasil GA, Santuzzi CH, Tiradentes RV, et al., (2017) Swimming training prevents coronary endothelial dysfunction in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res.* 50(1):e5495.

Clement DB, Asmundson RC (1982) Nutritional intake and hematological parameters in endurance runners. *Phys Sportsmed* 10(3):37-43.

Cooper CE, Volvaard NB, Choueiri T, Wilson MT (2002) Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 30(2):280-5.

Couto GK, Paula SM, Gomes-Santos IL, Negrão CE, Rossoni LV (2018) Exercise training induces eNOS coupling and restores relaxation in coronary arteries of heart failure rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 314(4):H878-H887.

Cusmà Piccione M, Piraino B, Zito C, Khandheria BK, Di Bella G, De Gregorio C, Oreto L, et al (2013) Early identification of cardiovascular involvement in patients with beta-thalassemia major. *Am J Cardiol* 112(8):1246-1251.

Davidson ES, Liseth K, Omvik P, Hervig T, Gerds E (2007) Reduced exercise capacity in genetic haemochromatosis. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 14(3):470-475.

Day SM, Duquaine D, Mundada LV, Menon RG, Khan BV, Rajagopalan S, et al (2003) Chronic iron administration increases vascular oxidative stress and accelerates arterial thrombosis. *Circulation* 107(20):2601-2606.

DellaValle DM (2013) Iron supplementation for female athletes: effects on iron status and performance outcomes. *Curr Sports Med Rep* 12(4):234-9.

Delp MD, McAllister RM, Laughlin MH (1993) Exercise training alters endothelium dependent vasoreactivity of rat abdominal aorta. *J Appl Physiol* 75(3):1354-63.

De Matos LD, Azevedo LF, Vieira ML, Nomura CH, Hamerschlak N, et al. (2013) The use of exogenous iron by professional cyclists pervades abdominal organs but not the heart. *Int J Cardiol* 167(5):2341-3.

Deugnier Y, Loreal O, Carre F, Duvallet A, Zoulim F, Vinel JP et al. (2002) Increased body iron stores in elite road cyclists. *Med Sci Sports Exerc* 34:876–880.

Díaz V, Peinado AB, Barba-Moreno L, Altamura S, Butragueño J, González-Gross M et al (2015) Elevated hepcidin serum level in response to inflammatory and iron signals in exercising athletes is independent of moderate supplementation with vitamin C and E. *Physiol Rep* 3(8):1-6.

Dubnov G, Constantini NW (2004) Prevalence of iron depletion and anemia in top-level basketball players. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 14(1):30-37.

Edwards CQ, Kelly TM, Ellwein G, Kushner JP (1983) Thyroid disease in hemochromatosis. Increased incidence in homozygous men. *Arch Intern Med* 143(10):1890-3.

Erbs S, Höllriegel R, Linke A, Beck EB, Adams V, Gielen S, et al (2010) Exercise training in patients with advanced chronic heart failure (NYHA IIIb) promotes restoration of peripheral vasomotor function, induction of endogenous regeneration, and improvement of left ventricular function. *Circ Heart Fail* 3(4):486-94.

Faria TO, Targueta GP, Angeli JK, Almeida EA, Stefanon I, Vassallo DV et al. (2010) Acute resistance exercise reduces blood pressure and vascular reactivity, and increases endothelium-dependent relaxation in spontaneously hypertensive rats. *Eur J Appl Physiol*. 110: 359-366.

Fernandes T, Gomes-Gatto CV, Pereira NP, Alayafi YR, das Neves VJ, Oliveira EM (2017) NO Signaling in the Cardiovascular System and Exercise. *Adv Exp Med Biol* 1000:211-245.

Fidelis HG, Mageski JGA, Goes SCE, Botelho T, Marques VB, Ávila RA, Dos Santos L (2019) Angiotensin II receptor type 1 blockade prevents arterial remodeling and stiffening in iron overloaded rats. *Br J Pharmacol*

Fleming I (2010) Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Pflugers Arch* 459(6):793-806.

Forjaz, CLM, Santaella DF, Rezende, LO, Barreto ACP, Negrão CE (1998) Exercise duration determines the magnitude and duration of post-exercise hypotension. *Arq Bras Cardiol* 70(2):99-104.

Fujii T, Asai T, Matsuo T, Okamura K (2011) Effect of resistance exercise on iron status in moderately iron-deficient rats. *Biol Trace Elem Res* 144(1-3):983-991. <https://doi.org/10.1007/s12011-011-9072-3>

Fujii T, Matsuo T, Okamura K (2012) The effects of resistance exercise and post-exercise meal timing on the iron status in iron-deficient rats. *Biol Trace Elem Res* 147(1-3):200–205.

Fujii T, Matsuo T, Okamura K (2014) Effects of Resistance Exercise on Iron Absorption and Balance in Iron-Deficient Rats. *Biol Trace Elem Res* 161(1):101-106. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-0075-8>

Gaenger H, Marschang P, Sturm W, Neumayr G, Vogel W, Patsch J, Weiss G (2002) Association between increased iron stores and impaired endothelial function in patients with hereditary hemochromatosis. *J Am Coll Cardiol* 40(12):2189-2194.

Ganz, T (2013) Systemic iron homeostasis. *Physiol Rev* 93(4):1721-1741.

Ghisi GLM, Durieux A, Pinho R, Benetti M (2010) Exercício Físico e Disfunção Endotelial. *Arq Bras Cardiol*. 95(5): e130-e137

Graham DA, Rush JW (2004) Exercise training improves aortic endothelium-dependent vasorelaxation and determinants of nitric oxide bioavailability in spontaneously hypertensive rats. *J Appl Physiol* 96(6):2088-96.

Green DJ, Maiorana A, O'Driscoll G, Taylor R (2004) Effect of exercise training on endothelium derived nitric oxide function in humans. *J Physiol J Physiol* 561(1):1-25.

Gu Q, Wang B, Zhang XF, Ma YP, Liu JD, Wang XZ (2013) Contribution of hydrogen sulfide and nitric oxide to exercise-induced attenuation of aortic remodeling and improvement of endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem* 375(1-2):199-206.

Gudjoncik A, Guenancia C, Zeller M, Cottin Y, Vergely C, Rochette L (2014) Iron, oxidative stress, and redox signaling in the cardiovascular system. *Mol Nutr Food Res* 58(8):1721-1738.

Hahalis G, Kremastinos DT, Terzis G, Kalogeropoulos AP, Chrysanthopoulou A, Karakantza M et al (2008) Global vasomotor dysfunction and accelerated vascular aging in beta-thalassemia major. *Atherosclerosis* 198(2):448-457.

Hambrecht R, Wolf A, Gielen S, Linke A, Hofer J, Erbs S (2000) Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 342(7):454-60.

Haskell WL, Sims C, Myll J, Bortz WM, St Goar FG, Alderman EL (1993) Coronary artery size and dilating capacity in ultradistance runners. *Circulation* 87(4):1076-82.

Hershko C (2010) Pathogenesis and management of iron toxicity in thalassemia. *Ann N Y Acad Sci* 1202:1-9.

Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, & Kihara Y (2009) Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* 73(3):411-418.

Huang SH, Johnson K, Pipe AL (2006) The use of dietary supplements and medications by Canadian athletes at the Atlanta and Sydney Olympic Games. *Clin J Sport Med* 16:27–33.

Ikeda Y, Imao M, Satoh A, Watanabe H, Hamano H, Horinouchi Y, et al (2016) Iron-induced skeletal muscle atrophy involves an Akt-forkhead box O3-E3 ubiquitin ligase-dependent pathway. *J Trace Elem Med Biol* 35:66-76.

Jordão CP, Fernandes T, Tanaka LY, Bechara LRG, de Sousa LGO, Oliveira EM, Ramires PR (2017) Aerobic swim training restores aortic endothelial function by decreasing superoxide levels in spontaneously hypertensive rats. *Clinics* 72(5):310-316.

Kobayashi Y, Nakatsuji A, Aoi W, Wada S, Kuwahata M, Kido Y (2014) Intense exercise increases Protein oxidation in spleen and liver of Mice. *Nutr Metab Insights* 7:1-6. <https://doi.org/10.4137/NMi.s13668>

Kramer JH, Spurney CF, Iantorno M, Tziros C, Chmielinska JJ, Mak IT, Weglicki WB (2012) d-Propranolol protects against oxidative stress and progressive cardiac dysfunction in iron overloaded rats. *Can J Physiol Pharmacol* 90(9):1257-68.

Kukongviriyapan V, Somparn N, Senggunprai L, Prawan A, Kukongviriyapan U, Jetsrisuparb A (2008) Endothelial dysfunction and oxidant status in pediatric patients with hemoglobin E-beta thalassemia. *Pediatr Cardiol*. 29(1):130-5.

Kuru O, Sentürk ÜK, Koçer G, Ozdem S, Başkurt OK, Cetin A, et al (2009) Effect of exercise training on resistance arteries in rats with chronic NOS inhibition. *J Appl Physiol* 107(3):896-902.

Lash JM, Bohlen HG (1985) Time- and order-dependent changes in functional and NO-mediated dilation during exercise training. *J Appl Physiol* 82(2):460-8.

Lee SK, Kim CS, Kim HS, Cho EJ, Joo HK, Lee JY, Lee EJ, Park JB, Jeon HB (2009) Endothelial nitric oxide synthase activation contributes to post-exercise hypotension in spontaneously hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun* 382(15):711-714.

Lippi G, Schena F, Franchini M, Salvagno GL, Guidi GC (2005) Serum ferritin as a marker of potential biochemical iron overload in athletes. *Clin J Sport Med* 15:356–8.

Liu YQ, Duan XL, Chang YZ, Wang HT, Qian ZM (2006) Molecular analysis of increased iron status in moderately exercised rats. *Mol Cell Biochem* 282(1-2):117-23.

Lou LX, Geng B, Chen Y, Yu F, Zhao J, Tang CS (2009) Endoplasmic reticulum stress involved in heart and liver injury in iron-loaded rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36(7):612-618.

Lucesoli F, Fraga, CG (1999) Oxidative stress in testes of rats subjected to chronic iron intoxication and alpha-tocopherol supplementation. *Toxicology* 132(2-3):179-86.

Ma X, Patterson KJ, Gieschen KM, Bodary PF (2013) Are serum hepcidin levels chronically elevated in collegiate female distance runners?. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 23(5):513-21.

Marques VB, Nascimento TB, Ribeiro Junior RF, Broseghini-Filho GB, Rossi EM, Graceli JB, dos Santos L (2015) Chronic iron overload in rats increases vascular reactivity by increasing oxidative stress and reducing nitric oxide bioavailability. *Life Sci* 143:89-97.

Marques VB, Leal MAS, Mageski JGA, Fidelis HG, Nogueira BV, Vasquez EC, et al (2019) Chronic iron overload intensifies atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice: Role of oxidative stress and endothelial dysfunction. *Life Sci* 233:116702.

Mcallister RM, Price EM (2010) Effects of exercise training on vasodilatory protein expression and activity in rats. *Eur J Appl Physiol* 110(5):1019-1027.

McGowan CL, Levy AS, Millar PJ, Guzman JC, Morillo CA, McCartney N, Macdonald MJ (2006) Acute vascular responses to isometric handgrip exercise and effects of training in persons medicated for hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:H1797-802.

Mendler MH, Turlin B, Moirand R, Jouanolle AM, Sapey T, Guyader D (1999) Insulin resistance-associated hepatic iron overload. *Gastroenterology* 117(5):1155-63.

Mettler S, Zimmermann MB. Iron excess in recreational marathon runners. *Eur J Clin Nutr.* 2010;64:490–4.

Moraes C, Davel APC, Rossoni LV, Antunes E, Zanesco A (2008) Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. *BMC Physiology* 29: 8–12.

Oudit GY, Trivieri MG, Khaper N, Husain T, Wilson GJ, Liu P, Sole MJ, & Backx PH (2004) Taurine supplementation reduces oxidative stress and improves cardiovascular function in an iron-overload murine model. *Circulation* 109(15):1877-1985.

Parr RB, Bachman MA, Moss RA. Iron deficiency in female athletes. *Phys Sports Med* 1984;12:81-6.

Patil RD, DiCarlo SE, Collins HL (1993) Acute exercise enhances nitric oxide modulation of vascular response to phenylephrine. *Am J Physiol* 265:1184-1188.

Pedlar CR, Bruignara C, Bruinvels G, Burden R (2018) Iron balance and iron supplementation for the female athlete: A practical approach. *Eur J Sport Sci* 18(2):295-305.

Peeling P, Sim M, Badenhorst CE, Dawson B, Govus AD, et al. (2014) Iron Status and the Acute Post-Exercise Hepcidin Response in Athletes *PLoS ONE* 9(3): e93002.

Powers SK, Jackson MJ (2008) Exercise induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological Reviews*, v.88, p1243-1276.

Powers SK, Duarte J, Kavazis AN, Talbert EE (2010) Reactive oxygen species are signaling molecules for skeletal muscle adaptation. *Experimental Physiology*, v.95, n.1, p.1-9.

Rattmann, Y.D, Mecanismos vasculares envolvidos nos efeitos vasculares da *Dicksonia sellowiana* (PRESL.) HOOK. 2009.145f. Tese de Doutorado em Farmacologia. Universidade Federal do Paraná.

Reardon TF, Allen DG (2013) Iron injections in mice increase skeletal muscle iron content, induce oxidative stress and reduce exercise performance. *Exp Physiol* 94(6):720–730.

Ribeiro Júnior RF, Marques VB, Nunes DO, Stefanon I, dos Santos L (2017) Chronic iron overload induces functional and structural vascular changes in small resistance arteries via NADPH oxidase-dependent O₂- production. *Toxicol Lett* 279:43-52.

Rodrigues AC, Rodrigues de Oliveira RA, Marins JCB, Natali AJ (2013) Efeitos do treinamento físico aeróbico contínuo e resistido na função endotelial mediada pelo óxido nítrico: uma revisão sistemática. *Rev Bras Ativ Fis e Saúde* 18(3):286-290.

Roque FR, Briones AM, García-Redondo AB, Galán M, Martínez-Revelles S, Avendaño MS et al (2013) Aerobic exercise reduces oxidative stress and improves vascular changes of small mesenteric and coronary arteries in hypertension. *Br J Pharmacol* 168(3):686-703.

Rossi EM, Marques VB, Nunes DO, Carneiro MT, Podratz PL, Merlo E, dos Santos L, Graceli JB (2016) Acute iron overload leads to hypothalamic-pituitary-gonadal axis abnormalities in female rats. *Toxicol Lett* 240(1):196-213.

Rush JWE, Laughlin MH, Woodman CR, Price EM (2000) SOD-1 expression in pig coronary arterioles is increased by exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: 2068–2076.

Rush JWE, Denniss SG, Graham DA (2005) Vascular nitric oxide and oxidative stress: Determinants of endothelial adaptations to cardiovascular disease and to physical activity. *Can J Appl Physiol* 30(4):442-474.

Santos PC, Dinardo CL, Cancado RD, Schettert IT, Krieger JE, Pereira AC (2012) Non-HFE hemochromatosis. *Rev Bras Hematol Hemoter* 34(4):311-316.

Santos PC, Krieger JE, Pereira AC (2012) Molecular diagnostic and pathogenesis of hereditary hemochromatosis. *Int J Mol Sci* 13(2):1497-1511.

Schmidt MI, Duncan BB, Silva GA, Menezes AM, Monteiro CA, Barreto SM, Chor D, Menezes PR (2011) Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. *Lancet* 377(9781):1949-1961.

Schmidt W, Maassen N, Trost F, Böning D (1988) Training induced effects on blood volume, erythrocyte turnover and haemoglobin oxygen binding properties. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 57(4):490-8.

Schneider CD, Oliveira AR (2004) Oxygen free radicals and exercise: mechanisms of synthesis and adaptation to the physical training. *Rev Bras Med Esporte* 10(4):308-313.

Schumacher Y, Schmid A, König D, Berg A (2002) Effects of exercise on soluble transferrin receptor and other variables of the iron status. *Br J Sports Med* 36(3):195-199.

Schümann, K. et al. Oral administration of ferrous sulfate, but not of iron polymaltose or sodium iron ethylenediaminetetraacetic acid (NaFeEDTA), results in a substantial increase of non-transferrin-bound iron in healthy ironadequate men. *Food and Nutrition Bulletin*, v. 33, n. 2, p. 128–136, 2012.

Selby GB, Eichner ER (1986) Endurance swimming, intravascular hemolysis, anemia, and iron depletion. *Am J Med* 81(5):791-4.

Sharman JE, La Gerche A, Coombes JS (2015) Exercise and cardiovascular risk in patients with hypertension. *Am J Hypertens* 28(2):147-58.

Shazia QQ, Mohammad ZH, Rahman T, Shekhar HU (2012) Correlation of oxidative stress with serum trace element levels and antioxidant enzyme status in beta thalassemia major patients: a review of the Literature. *Anemia* 2012:270923.

Siddique A, Kowdley KV (2012) Review article: the iron overload syndromes. *Aliment Pharmacol Ther* 35(8):876-893.

Sim, M., Garvican-Lewis, L. A., Cox, G. R., Govus, A., McKay, A. K. A., Stellingwerff, T., & Peeling, P. (2019). Iron considerations for the athlete: a narrative review. *European Journal of Applied Physiology*, 119(7), 1463–1478.

Skarpańska-Stejnborn A, Basta P, Trzeciak J, Szcześniak-Pilaczyńska Ł (2015) Effect of intense physical exercise on hepcidin levels and selected parameters of iron metabolism in rowing athletes. *Eur J Appl Physiol* 115(2):345-51.

Stevens B, Pezzullo L, Verdian L, Tomlinson J, George A, Bacal F (2018) The economic burden of heart conditions in brazil. *Arq Bras Cardiol* 111(1):29-36.

Takata KI, Ohta T, Tanaka H (2003) How much exercise is required to reduce blood pressure in essential hypertensives: a dose-response study. *Am J Hypertens* 13:593-600.

Swearingen JV (1986) Iron deficiency in athletes: consequence or adaption in strenuous activity. *J Orthop Sports Phys Ther* 7:192-5.

Tanaka H, Dinunno FA, Monahan KD, Clevenger CM, DeSouza CA, Seals DR (2000) Aging, habitual exercise, and dynamic arterial compliance. *Circulation* 102(11):1270-5.

Tanaka H, Seals DR, Monahan KD, Clevenger CM, DeSouza CA, Dinunno FA (2002) Regular aerobic exercise and the age-related increase in carotid intima-media thickness in healthy men. *J Appl Physiol* 92(4):1458-64.

Tanaka LY, Bechara LR, dos Santos AM, Jordão CP, de Sousa LG, Bartholomeu T, et al (2015) Exercise improves endothelial function:

a local analysis of production of nitric oxide and reactive oxygen species. *Nitric Oxide* 45:7-14.

Thakali K, Davenport L, Fink GD, Watts SW. Thakali K, Davenport L, Fink GD, Watts SW (2006) Pleiotropic effects of hydrogen peroxide in arteries and veins from normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* 47(3):482-7.

Teixeira BC, Lopes AL, Macedo RCO, Correa CS, Ramis TR, Ribeiro JL et al. (2014) Inflammatory markers, endothelial function and cardiovascular risk. *J Vasc Bras*.13 (2): 108-115.

Telford RD, Sly GJ, Hahn AG, Cunningham RB, Bryant C, Smith J (2003) Footstrike is the major cause of hemolysis during running. *J Appl Physiol*. 94:38–42

Thijssen DH, Maiorana AJ, O'Driscoll G, Cable NT, Hopman MT, Green DJ (2010) Impact of inactivity and exercise on the vasculature in humans. *Eur J Appl Physiol*. 108(5):845-75.

Tsalis G, Nikolaidis MG, Mougios V (2004) Effects of iron intake through food or supplement on iron status and performance of healthy adolescent swimmers during a training season. *Int J Sports Med* 25:306-13.

Thompson MA, Henderson KK, Woodman CR, Turk JR, Rush JW, Price E, Laughlin MH (2003) Exercise preserves endothelium-dependent relaxation in coronary arteries of hypercholesterolemic male pigs. *J Appl Physiol* 96(3):1114-26.

Tinken TM, Thijssen DH, Hopkins N, Dawson EA, Cable NT, Green DJ (2010) Shear stress mediates endothelial adaptations to exercise training in humans. *Hypertension* 55(2):312-318.

Torrance JD, Charlton RW, SchmamanA, Lynch SR & Bothwell TH (1968) Storage iron in "muscle". *J Clin Pathol* 21(4):495-500.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39(1):44-84.

Wardman P, Candeias LP (1996) Fenton Chemistry: An Introduction. *Radiation Research* 145(5):523-531.

Yang L, Lo CW, Lee JT, Su CT (2011) Enhancement of vasorelaxation in hypertension following high-intensity exercise. *Chin J Physiol* 54(2):87-95.

Ye F, Wu Y, Chen Y, Xiao D, Shi L (2019) Impact of moderate and high-intensity exercise on the endothelial ultrastructure and function in mesenteric arteries from hypertensive rats. *Life Sci* 1222:36-45.

Yunker LM, Parboosingh JS, Conradson HE, Faris P, Bridge PJ, Buithieu J, ET AL (2006) The effect of iron status on vascular health. *Vasc Med* 11(2):85-91.

Zanesco A, Zaros PR (2009) Exercício físico e menopausa. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 31(5):254-61.

Zhang Z, Liu D, Yi B, Liao Z, Tang L, Yin D, He M (2014) Taurine supplementation reduces oxidative stress and protects the liver in an iron-overload murine model. *Mol Med Rep* 10(5):2255-62.

Zhou XJ, Laszik Z, Wang XQ, Silva FG, Vaziri ND (2000) Association of renal injury with increased oxygen free radical activity and altered nitric oxide metabolism in chronic experimental hemosiderosis. *Lab Invest* 80(12):1905-14.

Zotter, H. (2004). Abnormally high serum ferritin levels among professional road cyclists. *British Journal of Sports Medicine* 38(6): 704-708. doi:10.1136/bjism.2003.006635

ANEXO I – Certificado de aprovação na CEUA




UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos do Exercício Físico aeróbico na Sobrecarga crônica de ferro em ratos", Protocolo nº.88/2015, sob a responsabilidade de Leonardo dos Santos que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata(exceto o homem), para fins de pesquisa científica(ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal(CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS(CEUA) DO(A) Centro de Ciências da Saúde- Maruípe-Vitória-ES em reunião de 04/12/2015.

Vigência do Projeto	Início: março/2016 Término: Novembro/2019
Espécie/Linhagem	Ratos Wistar
Nº de Animais	Experimento Piloto:0 Protocolo Experimental:160 Total:160
Peso/Idade	Peso: 200-300g Idade:2 meses
Sexo	Macho
Origem	Mamíferos

Vitória (ES), 04 de dezembro de 2015.



ANEXO II – Artigo publicado

Esta tese foi integralmente publicada na forma de artigo original na revista Biological Trace Element Research em março de 2020.

Chronic Iron Overload Restrains the Benefits of Aerobic Exercise to the Vasculature

Emilly Martinelli Rossi, Renata Andrade Ávila, Maria Tereza W. D. Carneiro, Camila C. P. Almenara & Leonardo dos Santos

Biological Trace Element Research

ISSN 0163-4984

Biol Trace Elem Res

DOI 10.1007/s12011-020-02078-y

