



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL – PPGBA**

**BELISA DUARTE RIBEIRO DE OLIVEIRA**

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO INTENSO CRÔNICO E AGUDO SOBRE OS  
NÍVEIS DE MELATONINA, CORTISOL, HORMÔNIOS SEXUAIS E  
IMUNOHISTOQUÍMICA OVARIANA DE RATAS**

**RECIFE**

**2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL – PPGBA**

**BELISA DUARTE RIBEIRO DE OLIVEIRA**

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO INTENSO CRÔNICO E AGUDO SOBRE OS  
NÍVEIS DE MELATONINA, CORTISOL, HORMÔNIOS SEXUAIS E  
IMUNOHISTOQUÍMICA OVARIANA DE RATAS**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como um dos pré-requisitos para obtenção do grau de Doutora em Biociência Animal. Área de Concentração em Morfofisiologia Animal.**

**Orientador**

**Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira**

**Co-orientadora**

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Valeria Wanderley Teixeira**

**RECIFE  
2016**

Ficha catalográfica

O48e

Oliveira, Belisa Duarte Ribeiro de

Efeito do exercício físico intenso crônico e agudo sobre os níveis de melatonina, cortisol, hormônios sexuais e imunohistoquímica ovariana de ratas / Belisa Duarte Ribeiro de Oliveira. – Recife, 2016.

108 f. : il.

Orientador: Álvaro Aguiar Coelho Teixeira.

Tese (Doutorado em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2016.

Referências.

1. Natação 2. Hormônios sexuais 3. Citocinas 4. Melatinina 5. Cortisol  
6. Ratas I. Teixeira, Álvaro Aguiar Coelho, orientador II. Título

CDD 636.08969

Dedico esta tese aos meus pais, Zélio Ribeiro e Marcia Duarte, meu porto seguro; ao meu esposo Vitor Caiaffo, presente de Deus com quem divido mais esta conquista; e à minha filha Lara, minha eterna fonte de alegria.

## AGRADECIMENTOS

**A Deus**, que guiou os caminhos da minha vida com mãos de amigo e mestre maior.

**Aos meus pais, Zélio Ribeiro e Márcia Duarte**, pelo dom da vida, pelo amor e pela atenção, e pelo apoio e investimento que sempre deram à minha educação. Sem eles, nada disso teria sentido.

**A Vitor Caiaffo**, pelo amor que nunca me faltou, pelas infindáveis ajudas nas minhas conquistas e simplesmente por estar ao meu lado. Seu companheirismo me foi fundamental.

**A minha filha Lara**, pela injeção diária de alegria que me fez levantar todos os dias desde que nasceu. Pelo pedido de perdão que devo pelas minhas ausências numa fase tão importante pra nós.

**Aos meus irmãos, Breno, Moema e Felipe Duarte** pelo carinho, apoio e torcida que sempre tiveram por mim. E, simplesmente, por fazerem parte da minha vida.

**A minha cunhada Andrea Lemos**, pelo apoio e incentivo que sempre me deu à pesquisa. Pela inspiração que me leva adiante no mundo científico.

**Aos professores Dr Álvaro e Dra. Valéria Teixeira**, pelo exemplo de união e liderança que me inspiram. Por terem me aceitado e acreditado no meu trabalho e pela honra que me deram em me deixar participar do laboratório de Histologia, meu profundo agradecimento.

**A todos os amigos do laboratório**, especialmente Ismaela Melo, Carolline Guimarães, Cintia Giselle e Aline Mariano, pelos ensinamentos, pela amizade e companheirismo nas horas mais incertas. Sem vocês, não tenho dúvidas, eu não teria conseguido.

**Ao professor Dr Anísio Francisco Soares**, pela gentileza de ceder o laboratório de Fisiologia para que os experimentos fossem realizados. Meu profundo agradecimento pela confiança.

**Ao professor Dr Pabyton Cadena**, pelos conhecimentos cedidos na construção da patente, e pela sua atenção na correção.

**Aos professores do Departamento de Morfologia e Fisiologia animal**, pelos ensinamentos e incentivo que sempre recebemos; e a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho fosse concretizado.

**Ao programa de Pós-Graduação em Biociência Animal**, pelo apoio à pesquisa e pelo incentivo ao projeto realizado.

**À Faculdade Asces**, pela compreensão nas faltas necessárias e pelo incentivo e investimento na minha formação.

**À minha amiga Soraya Alves Barbosa**, anjo que Deus me presenteou como colega de trabalho, pelo apoio que recebi todas as vezes que precisei da sua preciosa ajuda.

**A todos os familiares e amigos** que direta ou indiretamente contribuíram com a conclusão de mais um projeto de vida profissional realizado.

**À CAPES**, pelo apoio financeiro ao desenvolvimento deste trabalho.

*"Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas que já não têm a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos que nos levam sempre aos mesmos lugares.*

*É o tempo da travessia...*

*E se não ousarmos fazê-la, teremos ficado para sempre, à margem de nós mesmos."*

*Fernando Pessoa*



## RESUMO

As últimas décadas têm sido marcadas pela tentativa de inserção das mulheres na prática esportiva, especialmente aquelas que exigem esforço físico intenso. A relação entre esforço físico intenso e suas consequências na histofisiologia ovariana, ainda não está completamente elucidada. Assim, avaliou-se a interferência do exercício físico intenso nos hormônios estrógeno, progesterona, prolactina, melatonina e cortisol, além da expressão do IL6, TNF $\alpha$ , VEGF, índice apoptótico e proliferação celular nos ovários de ratas submetidas a um protocolo de exercício intenso crônico (natação). Foram utilizadas 40 ratas distribuídas aleatoriamente nos seguintes grupos: GI (animais sedentários), GII (Animais não treinados submetidos ao exercício agudo no dia da eutanásia), GIII (Animais treinados mantidos em repouso no dia da eutanásia) e GIV (Animais treinados submetidos ao exercício agudo no dia da eutanásia). As fêmeas foram treinadas em um sistema de natação com protocolo de exercício intenso. Os hormônios sexuais e cortisol foram dosados pelo método ELISA e a melatonina por RIA. Para apoptose utilizou-se TUNEL, para medidas de proliferação celular, o anticorpo primário Ki-67 e para as citocinas, anticorpos específicos foram utilizados. A concentração plasmática de estrógeno, progesterona e prolactina comportaram-se de forma semelhante, com maiores valores ( $p < 0,05$ ) nas fêmeas dos grupos GIII e GIV, sem diferença entre eles. Em relação à melatonina, as mais altas concentrações ( $p < 0,05$ ) foram encontradas nas fêmeas dos grupos GIII e GIV e a mais baixa ( $p < 0,05$ ) nas fêmeas do grupo GII. As fêmeas deste último grupo apresentaram as mais altas dosagens de cortisol ( $p < 0,05$ ) quando comparadas as demais. Houve aumento na expressão do IL-6 e TNF- $\alpha$  nos ovários das fêmeas dos grupos GII e do VEGF nas fêmeas dos grupos III e IV. Ocorreu maior índice apoptótico e menor índice de proliferação nos ovários das fêmeas do grupo GII. Não houve diferenças desses parâmetros nos ovários das fêmeas dos grupos I, III e IV. Concluiu-se que o exercício intenso realizado agudamente tem um maior poder de depleção dos hormônios sexuais, prolactina e da melatonina e exacerbação do cortisol, enquanto que um protocolo de exercício intenso crônico parece exercer um efeito contrário, sugerindo uma adaptação fisiológica ao exercício e que o exercício intenso realizado de forma aguda e não treinado previamente parece ter um forte impacto na histofisiologia reprodutiva feminina, com maiores danos celulares e menores prognósticos de recuperação histológica.

**Palavras-Chave:** Natação, hormônios sexuais, cortisol, melatonina, citocinas, apoptose, proliferação celular, ratas

## ABSTRACT

The last decades have been marked by an attempt to women's integration in sports, especially those that require intense physical exertion. The link between intense physical exertion and its consequences in ovarian histophysiology, is not yet fully elucidated. Thus, we evaluated the interference of intense physical exercise in the hormones estrogen, progesterone, prolactin, melatonin and cortisol, as well as IL6 expression, TNF $\alpha$ , VEGF, apoptotic index and cell proliferation in rat ovaries submitted to a chronic intense exercise protocol (swimming). We used 40 rats divided into the following groups: GI (animals without physical activity), GII (sedentary animals submitted to acute exercise on euthanasia day), GIII (animals trained kept at rest on euthanasia day) and GIV (Animals trained submitted to acute exercise on euthanasia day). Females were trained in a swimming system with intense exercise protocol. Sex hormones and cortisol were measured by ELISA and melatonin by RIA. For apoptosis measurement, TUNEL was used, for cellular proliferation measurement, we used primary antibody Ki-67 and for cytokines, specific antibodies were used. The plasma concentration of estrogen, progesterone and prolactin behaved similarly, with higher values ( $p < 0.05$ ) in females of GIII and GIV, with no difference between them. In relation to melatonin, higher concentrations ( $p < 0.05$ ) were observed in females of GIII and GIV and lower ( $p < 0.05$ ) in GII females. Females of the latter group had the highest cortisol doses ( $p < 0.05$ ) when comparing the others. An increase in the expression of IL-6 and TNF- $\alpha$  in the ovaries of females of GII and VEGF in females in Groups III and IV. There was a higher apoptotic index and lower proliferation index in the ovaries of females of the GII. There were no differences in these ovaries parameters of females in groups I, III and IV. We concluded that intense exercise performed sharply has greater power depletion of sex hormones, prolactin and melatonin and exacerbation of cortisol, whereas a chronic intense exercise protocol seems to have the opposite effect, suggesting a physiological adaptation to exercise and that intense exercise performed acutely and untrained previously seems to have a strong impact on women's reproductive histophysiology with greater cell damage and minor prognostic histological recovery.

**Keywords:** Swimming, sex hormones, cortisol, melatonin, cytokines, apoptosis, cell proliferation, rats

# SUMÁRIO

## CAPITULO I

1.	INTRODUÇÃO .....	16
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1.	Morfofisiologia do ovário.....	19
2.1.1.	Anatomia ovariana.....	19
2.1.2.	Aspectos histológicos e funcionais do ovário.....	20
2.1.3.	Fisiologia do ciclo sexual feminino.....	22
2.1.4.	Fisiologia ovariana em ratas: Ciclo menstrual e ciclo estral.....	27
2.2.	O exercício físico e seu papel na fisiologia endócrina do sistema reprodutor feminino.....	29
2.2.1.	O exercício físico e sua influência no ciclo hormonal reprodutivo.....	29
2.2.2.	O exercício físico e sua ação reguladora nos ritmos circadianos.....	33
2.2.3.	A melatonina, seu papel sistêmico e sua função na fisiologia ovariana.....	35
2.2.4.	Relação do exercício físico e a síntese de melatonina.....	40

## CAPÍTULO II

Efeito do treinamento aeróbico intenso sobre os níveis de melatonina, cortisol e hormônios sexuais em ratas.....		57
Resumo.....		58
Introdução.....		59
Materiais e Métodos.....		60
Resultados.....		63
Discussão.....		65

Referências.....	69
Figuras.....	75

### **CAPÍTULO III**

<b>Avaliação imunohistoquímica dos ovários de ratas submetidas a exercício físico intenso crônico.....</b>	<b>78</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>79</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>80</b>
<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>82</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>86</b>
<b>Discussão.....</b>	<b>87</b>
<b>Referências.....</b>	<b>92</b>
<b>Figuras.....</b>	<b>98</b>

### **CAPÍTULO IV**

<b>PATENTE DEPOSITADA (“EQUIPAMENTO DE TREINAMENTO DE NATAÇÃO PARA ROEDORES”)</b> .....	<b>102</b>
<b>Campo da Invenção.....</b>	<b>102</b>
<b>Antecedentes da Invenção.....</b>	<b>102</b>
<b>Descrição da Invenção.....</b>	<b>103</b>
<b>Reinvindicações.....</b>	<b>104</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>106</b>
<b>Figuras.....</b>	<b>107</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>109</b>

### **ANEXOS**

Declaração do Comitê de Ética em pesquisa em animais

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

Figura 1. Ilustração do aspecto morfológico do ovário contendo os folículos em maturação, nas fases folicular, ovulação e luteínica

Figura 2. Fotomicrografia de ovário, destacando a medula e o córtex, onde folículos são desenvolvidos

Figura 3. Variação hormonal ao longo do ciclo ovariano

Figura 4. Demonstração esquemática da variação hormonal do ciclo menstrual em mulheres

Figura 5. Demonstração esquemática da variação hormonal do ciclo estral em ratas.

Figura 6. Esquema tridimensional da melatonina

### CAPÍTULO II

Figura 1. Concentração plasmática dos níveis de estrógeno no grupo controle (G1) e experimentais (GII-sedentário submetido a exercício agudo no dia da eutanásia, GIII-treinado em repouso no dia da eutanásia e GIV-treinado submetido a exercício agudo no dia da eutanásia)

Figura 2. Concentração plasmática dos níveis de progesterona no grupo controle (G1) e experimentais (GII-sedentário submetido a exercício agudo no dia da eutanásia, GIII-treinado em repouso no dia da eutanásia e GIV-treinado submetido a exercício agudo no dia da eutanásia)

Figura 3. Concentração plasmática dos níveis de prolactina no grupo controle (G1) e experimentais (GII-sedentário submetido a exercício agudo no dia da eutanásia, GIII-treinado em repouso no dia da eutanásia e GIV-treinado submetido a exercício agudo no dia da eutanásia)

Figura 4. Concentração plasmática dos níveis de melatonina no grupo controle (G1) e experimentais (GII-sedentário submetido a exercício agudo no dia da eutanásia, GIII-treinado em repouso no dia da eutanásia e GIV-treinado submetido a exercício agudo no dia da eutanásia)

Figura 5. Concentração plasmática dos níveis de cortisol no grupo controle (G1) e experimentais (GII-sedentário submetido a exercício agudo no dia da eutanásia, GIII-

treinado em repouso no dia da eutanásia e GIV-treinado submetido a exercício agudo no dia da eutanásia)

### **CAPÍTULO III**

Figura 1. Fotomicrografia dos ovários de ratas submetidas à avaliação da expressão da interleucina 6 (IL-6) nos grupos avaliados (A-GI; B – GII; C-GIII e D-GIV). Setas indicam expressão de aumentada citocina inflamatória nos grupos treinados intensa e cronicamente (GIII e GIV)

Figura 2. Fotomicrografia dos ovários de ratas submetidas à avaliação da expressão do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) nos grupos avaliados (A-GI; B – GII; C-GIII e D-GIV). Setas indicam expressão de aumentada do marcador nos grupos treinados intensa e cronicamente (GIII e GIV)

Figura 3. Fotomicrografia dos ovários de ratas submetidas à avaliação da expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) nos grupos avaliados (A-GI; B – GII; C-GIII e D-GIV). Destaca-se coloração citoplasmática marrom-dourada nos grupos treinados GIII e GIV

Figura 4. Porcentagem de células apoptóticas nos 4 grupos experimentais (GI-controle; GII-sedentário submetido ao exercício físico intenso agudo no dia da eutanásia; GIII-treinado com exercício físico intenso, em repouso no dia da eutanásia; GIV- treinado com exercício físico intenso, submetido ao exercício físico intenso agudo no dia da eutanásia)

### **CAPÍTULO IV**

Figura 1. ESQUEMA COMPLETO DO EQUIPAMENTO DE TREINAMENTO DE NATAÇÃO PARA ROEDORES

Figura 2. ESQUEMA DA VISTA SUPERIOR DO ITEM 5 DA FIGURA 1

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

A4 – Receptor de Androstenediona

AMPC - Adenosina-monofosfato-cíclico

ELISA- Ensaio imunoenzimático absorvente

FSH - Hormônio folículo estimulante

GI – Grupo controle

GII – Grupo sedentário, submetido ao exercício agudo extenuante no dia da eutanásia

GIII - Grupo treinado com exercício físico intenso crônico, em repouso no dia da eutanásia

GIV - Grupo treinado com exercício físico intenso crônico, submetido ao exercício agudo extenuante no dia da eutanásia

GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas

HCG – Gonadotrofina coriônica humana

IA – Índice apoptótico

IGF1 – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IL-6 – Interleucina 6

IPC – Índice de proliferação celular

Kg – quilograma

LH - hormônio luteinizante

mg – miligrama

NEP – Norepinefrina

P4 – Receptor de prostaglandina

PGF2 $\alpha$  – Prostaglandina F2 alfa

SCN - Núcleo supraquiasmático

TNF-  $\alpha$  – Fator de crescimento tumoral

VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial



# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUÇÃO

A prática de atividades físicas e de esportes em geral sempre foi contemplada pelos humanos de ambos os sexos. No entanto, em dado período da história, há um afastamento das mulheres da prática esportiva e da prática de atividades físicas em geral, sob inúmeros discursos, dentre eles destacando-se, como na Grécia Antiga, o fato de torná-las masculinizadas, ou ainda, com a alegação de que elas não teriam condições físicas ou fisiológicas para tal (OLIVEIRA; CHEREM; TUBINO, 2009). Com este cenário exposto, as últimas décadas tem sido marcadas pela tentativa de inserção das mulheres na prática esportiva, especialmente aquelas que exigem esforço físico intenso, anteriormente exclusiva do sexo masculino (OLIVEIRA, 2006).

A relação entre esforço físico intenso e suas consequências na imunidade começou a ser abordada no início do século passado por Larrabee (LARRABEE, 1902), que relatou um grande aumento do número de neutrófilos no sangue entre os quatro atletas que correram a Maratona de Boston em 1901. Larrabee observou que as alterações nas contagens de glóbulos brancos eram diferenciadas quando comparadas a patologias e sugeriu que em esforços que vão além dos limites fisiológicos, condições semelhantes poderiam resultar no desenvolvimento de processos inflamatórios (NIEMAN, 1997). A partir de então, vários estudos foram desenvolvidos com a intenção de descobrir o mecanismo fisiológico que envolve atividades físicas intensas em processos inflamatórios e imunológicos nos diversos órgãos e sistemas, como pulmão (COOPER et al., 2007; KRÜGER; MOOREN, 2014), coração (OBERT et al., 1998; DUMANOIR et al., 2007;) sistema hematopoiético (RUSHALL; BUSCH, 1980; MACKINNON et al., 1997;) e endócrino (LI et al., 2012).

Porém, foi somente em 1939 que Hans Selye correlacionou exercícios físicos extenuantes e sua relação com disfunções do ciclo ovariano, relatando a supressão da reprodução em ratas submetidas a exercício físico intenso não gradativo. Depois da observação de tais achados, outros estudos associaram a prática de exercícios intensos a vários distúrbios do ciclo ovulatório em mulheres, incluindo retardo puberal, alterações na fase lútea, anovulação e amenorreia (BLAKE; STEIN; VOMACHKA, 1984; MOSAVAT; MOHAMED; MIRSANJARI, 2013).

O assunto foi continuamente discutido no meio científico até que em 1992, o Colégio Americano de Medicina do Esporte apresentou como tema central de sua conferência a patologia então chamada de Tríade da Atleta, que foi definida como uma síndrome que descreve um espectro de distúrbios relacionados com a reserva energética, a função ovariana e a densidade mineral óssea em mulheres atletas (GEORGE; LEONARD; HUTCHINSON, 2011; LAGOWSKA; JESZKA, 2011;). A tríade foi reconhecida como um problema de saúde que pode diminuir o desempenho físico e até mesmo causar morbidade e ou mortalidade nessas mulheres e seus sintomas clínicos mais comuns incluem distúrbios alimentares, amenorreia hipotalâmica funcional e redução da densidade mineral óssea (NAZEM; ACKERMAN, 2012; OTIS et al., 1997).

O treinamento de alta intensidade, a baixa disponibilidade energética, baixos níveis de leptina, peso ou gordura corporal e hormônios produzidos por stress psicológico são alguns dos fatores que tem sido estudados como causadores de alterações de vias endócrinas que levam a distúrbios do ciclo menstrual (LAGOWSKA; JESZKA, 2011; BUCK LOUIS et al., 2011) . Além destes, estudos mostram que o exercício, mesmo em pessoas saudáveis, podem levar a respostas inflamatórias intensas, caracterizadas por mobilização de leucócitos com aumento do seu número na circulação central, e um aumento na circulação de potentes mediadores inflamatórios, tal como a interleucina 6 (IL-6), uma citocina pleiotrópica (SUZUI et al., 2004; COOPER et al., 2007) produzida por células imunitárias, em vários tecidos.

Apesar de respostas pró-inflamatórias serem comuns em vários estudos, em 1999, autores (OSTROWSKI et al., 1999) observaram que o exercício extenuante levou também a um aumento dos inibidores de citocinas e de citocinas anti-inflamatórias, que restringem a magnitude e a duração da resposta inflamatória. Tais autores sugerem que o mecanismo de estímulo inicial do sistema inflamatório que desperta ambas as vias de resposta pró e anti-inflamatórias é visto não só no exercício, mas em outras condições, como sépsis e lesões por queimadura.

Além dos fatores já elucidados, sabe-se também que outras substâncias sistêmicas podem influenciar a liberação pulsátil de gonadotrofina e estar envolvidas nestas mudanças induzidas pelo exercício físico. Dentre as estudadas, podemos citar a naloxona, opiáceo antagonista que causa alterações na amplitude de hormônio luteinizante (LH) e nas pulsações hormonais do folículo estimulante (FSH) (EVANS;

CURRIE; RAWLINGS, 1992); o cortisol, que tem efeitos negativos na produção de hormônios sexuais (CHATARD et al., 2002; KRÜGER et al., 2011) e a melatonina, que em doses elevadas, e em combinação com a progesterona, é capaz de suprimir a ovulação, possivelmente interferindo na liberação de LH (FERNANDO; ROMBAUTS, 2014; VOORDOUW et al., 1992).

Estudos apontam que, além de alterações endócrinas, respostas inflamatórias sistêmicas e locais também são responsáveis por danos morfofisiológicos em diversos órgãos afetados pela consequência da alta intensidade do exercício (JAHREIS et al., 1991; GLEESON et al., 1995), em particular durante as fases de intensa competição (HOWLETT et al., 1984; MALINA et al., 2013). Autores relatam que além dos efeitos hormônios gonadais, o exercício físico intenso pode provocar perturbações em concentrações de leucócitos (MOOREN et al., 2002; KRÜGER; MOOREN, 2014; PARK; LEE, 2015) e imunoglobulinas (JAHREIS et al., 1991), com efeitos intensidade-dependentes e variáveis também com a associação da liberação de cortisol (KALANTARIDOU et al., 2010; KRÜGER et al., 2011).

Apesar das alterações hormonais sofridas pela mulher submetida ao exercício físico intenso e sua possível influência no ciclo ovariano serem documentadas em alguns estudos relativos ao estrogênio, cortisol, GH e até testosterona (JAHREIS et al., 1991; ELIAKIM; NEMET, 2013; MIRI et al., 2014; SIM et al., 2015), relatos a respeito dos níveis de melatonina (DAVIS et al., 2014) e seu papel mediador (e possivelmente inibitório) no sistema reprodutivo dessas mulheres ainda não estão completamente elucidados.

A complexidade das interferências ovarianas sofridas pelo exercício físico intenso, a correlação entre alterações morfofuncionais no ovário e hormônios não gonadais, além da escassez de estudos imunohistoquímicos que envolvam este órgão, nos leva a buscar respostas que façam a ponte entre esses fatores e elucidem os mecanismos dos distúrbios de reprodução em atletas. Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar as alterações imunohistoquímicas dos ovários e verificar padrões hormonais sexuais e não sexuais (melatonina e cortisol) de ratas submetidas ao exercício físico intenso crônico.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Morfofisiologia do ovário

#### 2.1.1. Anatomia ovariana

Os ovários formam o par de órgãos sexuais femininos primários que produzem os ovócitos e os hormônios sexuais, como estrógenos e progesterona. São por isso considerados órgãos importantes do aparelho reprodutor feminino e são homólogos com os testículos (BABINSKI, 2012). Possuem duas funções distintas, porém intimamente relacionadas e interdependentes: a) a função reprodutiva, representada pela ovogênese; b) a função trófico-morfofisiológica, com ações hormonais (progesterona e estrogênio) de abrangência bem mais ampla que a primeira, pois atua de forma sistemêmica no organismo feminino (GUYTON; HALL, 2006; APPLGATE, 2012).

Na mulher, os ovários estão situados na cavidade pélvica, em geral abaixo da abertura superior da pelve, na chamada fosseta ovárica. Seu eixo maior tem obliquidade súpero-inferior, látero-medial e ântero-posterior. Encontram-se em posição ântero-lateral em relação ao reto, posterior ao ligamento largo, à frente da articulação sacroilíaca (REIFFENSTUHL; PLATZER; PAUL-GEORGE, 1999; MOORE; DALLEY; AGUR, 2014) e preso ao ligamento largo do útero pelo mesovário, uma dobra especial do peritônio, que leva vasos sangüíneos ao ovário. Esta situação é resultado de uma migração que, à semelhança do testículo, começa na região lombar medialmente ao mesonefro (APPLGATE, 2012; BABINSKI, 2012), mas, ao contrário daquele, detém-se na pelve, onde encontram sua posição definitiva, geralmente no final da vida intra-uterina (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014).

Anatomicamente, apresentam uma variação ampla de forma, volume e dimensões, não apenas quando considerados os vários períodos fisiológicos femininos como infância, puberdade, menarca, gestação e climatério-menopausa. Conforme o momento do ciclo, podem apresentar variações de tamanhos e formas (GUYTON; HALL, 2006). Contudo, normalmente, apresenta-se na forma de amêndoa,

é alongado no sentido craniocaudal e achatado no sentido transversal (BABINSKI, 2012). A superfície é lisa nos extremos da vida e rugosa no período menstrual, devido às elevações decorrentes do desenvolvimento regular dos folículos ovarianos (REIFFENSTUHL; PLATZER; PAUL-GEORGE, 1999).

Em mulheres pré-púberes, a face do ovário é coberta por uma lâmina lisa do epitélio superficial ovárico – uma lâmina simples de células simples – que dá à face uma aparência rósea acinzentada e fosca, contrastando com a face brilhante do mesovário do peritônio adjacente com o qual é contínua (HOFFMAN et al., 2012).

Após a puberdade, a superfície torna-se progressivamente fibrosada e distorcida com cicatrizes (BABINSKI, 2012) por causa da ruptura repetida dos folículos ováricos e da liberação dos ovócitos, que são parte da ovulação. Isto lhe confere o aspecto de uma “ameixa seca”, exceto no período periovulatório, quando há maior variação, devido à presença de folículos ovarianos em vários estágios de maturação ou de um corpo lúteo (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014).

### *2.1.2. Aspectos histológicos e funcionais do ovário*

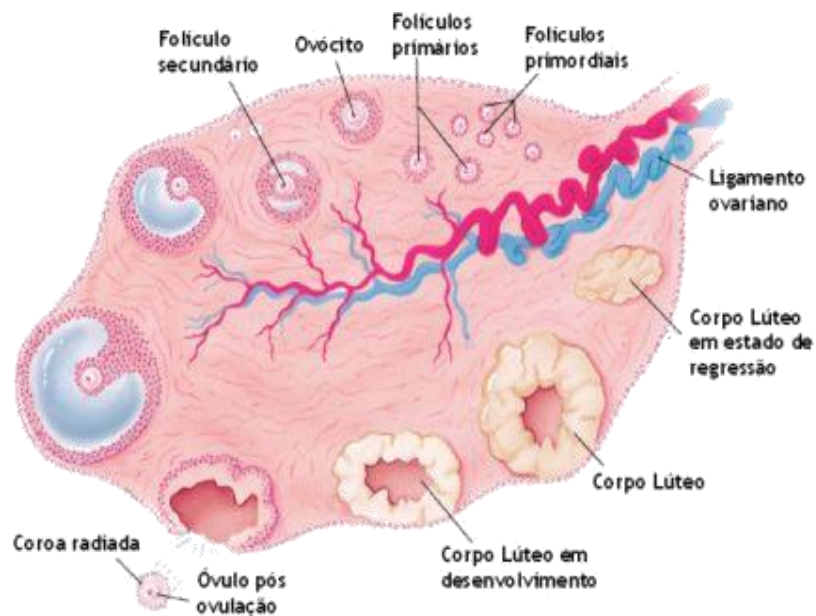
Os ovários de todos os mamíferos têm uma estrutura histológica básica semelhante (Figura 1). Seu aspecto geral, entretanto, varia consideravelmente de acordo com as diferenças do ciclo ovariano das diferentes espécies e com o estágio do ciclo no qual é examinado (GARTNER; HIATT, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Os folículos do ovário estão envolvidos pelo estroma e são constituídos por um ovócito primário e por células foliculares associadas a ele dispostas em uma única camada esférica, ou várias camadas concêntricas, em torno do ovócito primário. As células foliculares, de um modo semelhante ao epitélio germinativo, originam-se do epitélio mesotelial e, possivelmente, também de uma segunda fonte, os cordões sexuais primitivos do mesonefro, um precursor do metanefro, a estrutura que dá origem ao rim definitivo (GARTNER; HIATT, 2007).

Na mulher sexualmente madura, os ovários são formados por estruturas sólidas que contêm um estroma de suporte de tecido conjuntivo, dominado na medula por

muitas células que se assemelham aos fibroblastos, com matriz intercelular e colágeno (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013), algumas contendo gotículas de lipídeos (GARTNER; HIATT, 2007).

Figura 1. Ilustração do aspecto morfológico do ovário contendo os folículos em maturação, nas fases folicular, ovulação e luteínica. *Fonte: Adaptado de RAFF; LEVITZKY (2012)*

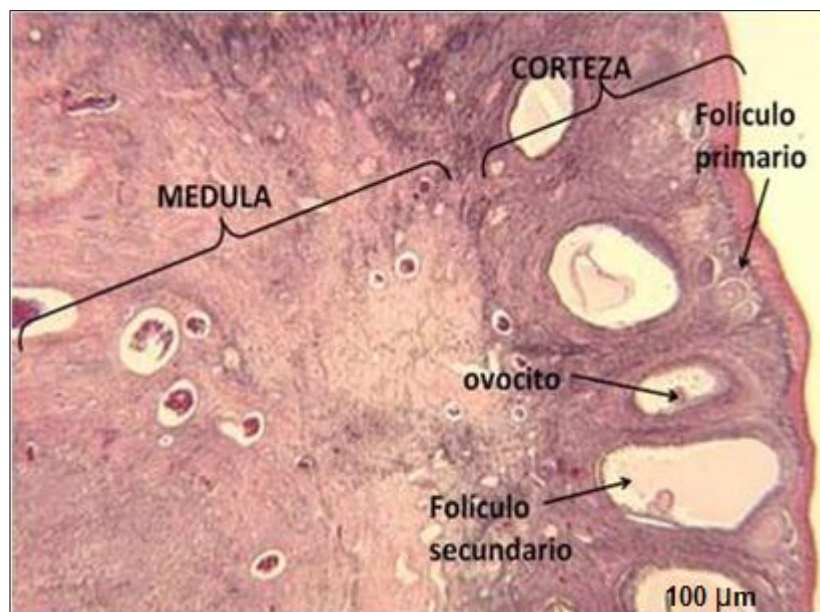


A região central do ovário, a medula, é constituída por fibroblastos frouxamente situados dentro de uma malha rica em colágeno (Figura 2) e também contém grandes vasos sangüíneos, vasos linfáticos e fibras nervosas. Na fase pré-menstrual, o ovário humano apresenta alguns grupos de células intersticiais epitelióides, que secretam estrógenos. Nos mamíferos com ninhadas grandes, os ovários contêm muitos grupos destas células intersticiais, coletivamente denominados glândula intersticial (GARTNER; HIATT, 2007).

Além dos folículos que estão prestes a ovular, os ovários podem conter folículos pós-ovulatórios de vários tipos, os corpos lúteos (responsáveis pela produção de estrogênio e progesterona), os corpos lúteos antigos e degenerados (corpus albicans) e os corpos degenerados (atrésicos) (RAFF; LEVITZKY, 2012). A sua estrutura histológica depende da fase do ciclo ovariano em que se encontra, e tal morfologia depende da liberação pituitária cíclica dos hormônios gonadotrópicos: hormônio

folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH). Tal padrão rítmico chama-se ciclo sexual feminino e tem duração média de 28 dias, podendo variar de 20 a 45 dias mesmo em mulheres completamente normais (GUYTON, 1997).

Figura 2. Fotomicrografia de parte do ovário, destacando a medula e o córtex, onde folículos são desenvolvidos. *Fonte: <https://www.thinglink.com/scene/>.*



### 2.1.3. Fisiologia do ciclo sexual feminino

A formação dos folículos ovarianos inicia-se no ovário fetal, por volta das 12-16 semanas de gestação. Quando o ovócito entra na meiose, é rodeado por 1 camada de células fusiformes provenientes do estroma ovárico, constituindo-se o folículo primordial. Em torno da 20-30 semana, estas células fusiformes transformam-se em células cubóides (já chamadas células da granulosa) e o folículo passa a ser designado de folículo primário. As células da granulosa dividem-se e constituem diversas camadas, criando-se o folículo secundário. Secretam mucopolissacarídeos que constituem um halo protetor do ovócito - a zona pelúcida (VALDES et al., 2010).

O folículo secundário continua a crescer e atinge um diâmetro de 150 µm, enquanto o ovócito atinge o seu diâmetro máximo (80 µm). Nesta altura, ocorrem dois outros fenômenos: - é recrutada mais uma camada de células do interstício, que se diferenciam e constituem a teca interna (células epitelióides semelhantes às da

granulosa, secretam hormônios esteróides) e a teca externa (cápsula de tecido conjuntivo altamente vascularizado). As células da granulosa secretam um líquido folicular que se acumula em vesículas (folículo vesicular). O líquido vesicular tem, na sua composição, mucopolissacarídeos, eletrólitos, glicosaminoglicanos, hormônios esteróides, ocitocina, activina, inibina, FSH, LH, vasopressina e proteínas do plasma. Um destes folículos vai prosseguir o seu desenvolvimento e, neste, o líquido das vesículas coalesce numa única área central, o antro - é o folículo maduro, folículo antral ou folículo de Graaf (MACHADO, 1945; APPLGATE, 2012).

À medida que o folículo se desenvolve, o ovócito primário completa a primeira divisão da meiose, de que resultam o ovócito secundário (maior, contendo todo o citoplasma do ovócito primário) e o primeiro corpo polar, que se fragmenta e acaba por desaparecer. O ovócito secundário inicia, depois, a segunda divisão meiótica, que é interrompida, por ação de um fator inibidor da meiose (provavelmente a inibina), em metáfase II, completando-se apenas se ocorrer fertilização. O ovócito secundário está contido num folículo de Graaf. As células da granulosa deste folículo formam um anel à volta do ovócito e um pedículo que o suporta. O anel designa-se por *corona radiata* e o pedículo é o *cumulus oophorus*. Entre o ovócito e a *corona radiata* mantém-se a zona pelúcida que vai funcionar como barreira à penetração dos espermatozoides, até que seja rompida (BERNE; LEVY, 2000).

Cinco a sete dias após o primeiro dia de uma menstruação, um folículo maduro é selecionado, que se torna o folículo dominante desse ciclo. Os restantes folículos secundários sofrem atresia, um processo que é estimulado pelos androgênios e inibido pelas gonadotrofinas. O folículo dominante cresce exponencialmente nas 48 horas anteriores à ovulação, atingindo os 20 mm de diâmetro e fazendo saliência macroscópica à superfície do ovário. A camada basal das células da granulosa é degradada proteoliticamente e liberta-se um ovócito secundário, rodeado pela zona pelúcida e *corona radiata*. Se não for fecundado, degenera em 12-24 horas. Se houver fecundação, o ovócito completa a segunda divisão meiótica, em que o citoplasma é, novamente, dividido de modo desigual: a maior parte permanece no zigoto (ovo fertilizado) e o restante vai para o segundo corpo polar que degenera posteriormente (AIRES, 2008).

As transformações no ovário continuam após a ovulação. O folículo que rompeu enche-se imediatamente de sangue, formando o chamado *corpus hemorrhagicum*,



que, por vezes, está na origem de pequenas hemorragias para o interior da cavidade abdominal, causadoras de irritação peritoneal e consequente dor hipogástrica ("mittelschmerz"). As células da granulosa e tecais iniciam imediatamente a sua multiplicação e o sangue coagulado é rapidamente substituído por uma nova estrutura endócrina, o corpo amarelo, composto por células da granulosa (80%), células tecais (20%), capilares e fibroblastos (BABINSKI, 2012).

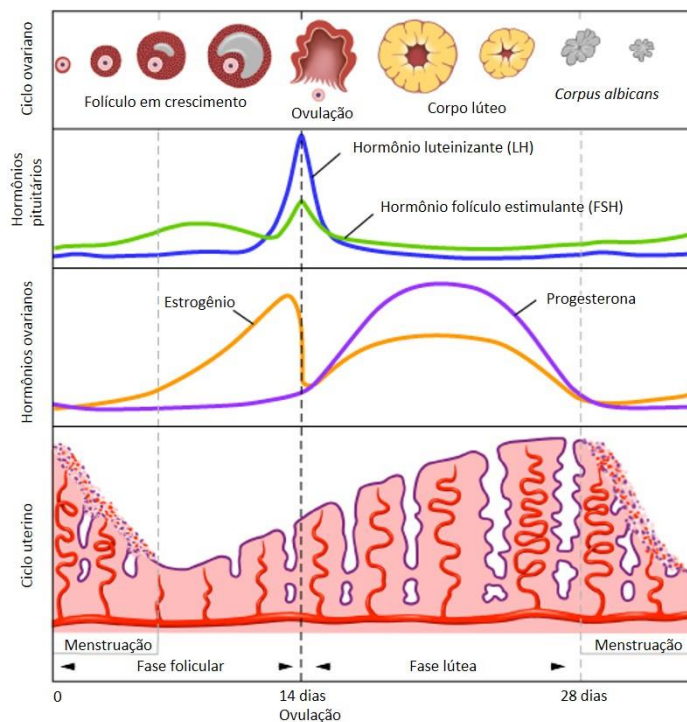
As células da granulosa aumentam marcadamente a sua secreção de esteróides, um processo designado por luteinização, que se traduz, em termos ultra-estruturais, pelo desenvolvimento mitocondrial (matriz densa, cristas tubulares), aparecimento de gotículas lipídicas no citoplasma e proliferação do retículo endoplasmático liso. O corpo amarelo secreta estrogênios e progesterona e persiste se houver fertilização; caso contrário, começa a degenerar cerca de 4 dias antes da menstruação seguinte (luteólise). Sofre necrose, sendo invadido por leucócitos, macrófagos e fibroblastos, resultando, no final, uma cicatriz avascular - o *corpus albicans* (AIRES, 2008).

Antes do início da puberdade, todos os folículos do córtex do ovário estão no estágio de folículo primordial. O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH- Hormônio liberador de gonadotropina), produzido pelos neurônios neurosecretores do núcleo arqueado do hipotálamo, desempenha uma função importante no processo que dá início à puberdade. A liberação de GnRH é pulsátil, ocorrendo aproximadamente a cada 90 minutos, e sua meia-vida no sangue é de somente cerca de 2 a 4 minutos. Esta liberação pulsátil de GnRH é um pré-requisito não somente para o início da menarca, mas também para a manutenção dos ciclos ovulatórios e menstruais normais durante toda a vida reprodutiva da mulher (GUYTON; HALL, 2006).

A liberação pulsátil de GnRH leva a uma liberação pulsátil semelhante de gonadotrofinas (FSH e LH) pelas células basófilas da hipófise anterior, que culmina com o início do desenvolvimento folicular e do ciclo ovulatório. O ciclo ovárico divide-se, fisiologicamente, em 3 fases sequenciais: - a fase folicular, que se inicia com a hemorragia menstrual e se prolonga por 15 dias (variando entre 9 e 23 dias). - a fase ovulatória, com 1 a 3 dias de duração, culminando na ovulação; - a fase luteínica, com uma duração mais constante de, aproximadamente, 13 dias, terminando com o início da hemorragia menstrual (BERNE; LEVY, 2000).

Durante a fase folicular, verifica-se o crescimento de alguns folículos primários, o desenvolvimento de vesículas e a transformação em folículos secundários, um dos quais será selecionado para atingir a maturidade (folículo dominante). À medida que os folículos crescem, aumenta a secreção de estradiol pelas células da granulosa, atingindo a sua concentração máxima pelo dia 12 do ciclo, 2 dias antes da ovulação (figura 3). No final da fase luteínica do ciclo anterior, as concentrações plasmáticas de FSH e LH encontram-se nos seus níveis mais baixos (HAWKINS; MATZUK, 2008).

Figura 3. Ilustração da variação hormonal ao longo do ciclo ovariano. *Fonte: adaptado de <http://universodoshormonios.com>.*



Um a dois dias antes da menstruação, a concentração de LH começa a subir, seguindo-se, mais tardiamente, a subida da concentração de LH. Os estrogênios (estradiol, produzido predominantemente pelo folículo dominante e estrona, produzida periféricamente, a partir de estradiol e androstenediona) aumentam gradualmente, estimulados pelas concentrações crescentes de FSH na metade inicial da fase folicular. Na segunda metade da fase folicular, a concentração de FSH cai moderadamente, enquanto a concentração de LH continua a subir lentamente. Tal

processo culmina na ovulação, em média, 48 horas após o pico de secreção do LH pela hipófise anterior (AIRES, 2008; RAFF; LEVITZKY, 2012).

O LH em altas concentrações, atua no folículo maduro, bloqueando a expressão dos genes associados à foliculogênese, isto é, dos genes que controlam a proliferação da granulosa - IGF-1, receptor do FSH, receptor  $\beta$  dos estrogênios e ciclina D2. Como consequência do aumento do AMPc intracelular causado pela ação do LH, termina, também, a expressão dos genes codificantes das enzimas esteroidogênicas (APPLEGATE, 2012; GUYTON; HALL, 2006).

A ovulação acontece, portanto, como resultado dos efeitos sequenciais do FSH e LH nos folículos ovários. Pelo feedback positivo do estradiol sobre a secreção de LH, o folículo determina o momento da sua própria ovulação. Isto porque a ovulação é desencadeada por um pico de LH que, por sua vez, resulta do aumento da secreção de estradiol, que ocorre com o crescimento folicular e maturação do folículo dominante. Este não pode, pois, entrar no processo de ovulação enquanto não atingir o tamanho e maturidade necessários (AIRES, 2008; BERNE; LEVY, 2000).

Depois da ovulação, o folículo vazio é transformado pelo LH numa nova estrutura - o corpo amarelo (corpo lúteo), ocorrendo, simultaneamente, uma transformação funcional - enquanto os folículos produzem estradiol, o corpo amarelo produz estradiol e progesterona (17-hidroxiprogesterona). Tais fenômenos marcam a fase lútea, quando as altas concentrações de progesterona exercem, em conjunto com o estradiol, feedback negativo sobre a secreção de LH e FSH. O corpo amarelo produz, ainda, inibina A, que exerce a mesma função. A supressão da secreção de FSH retarda o desenvolvimento de novos folículos, impossibilitando novas ovulações nos dias seguintes do ciclo (BABINSKI, 2012; RAFF; LEVITZKY, 2012).

A perda do suporte gonadotrófico e a secreção, pelo útero, de um hormônio chamado luteolisina (provavelmente PGF2 $\alpha$ ) levam à involução e atresia do corpo amarelo, caindo as concentrações de estrogênios e progesterona para níveis muito baixos. Se houver fertilização e gravidez, a gonadotrofina coriônica (HCG) e a prolactina, pelo seu efeito luteotrófico, mantêm funcionando o corpo amarelo. Caso não haja fertilização, a involução do corpo lúteo se dá ao final de quase 12 dias (em torno do 26º dia de ciclo), que acontece pela queda súbita de estrogênio, progesterona e inibina pelo próprio corpo lúteo. Desta forma, a inibição da hipófise anterior por

feedback é cessada e o FSH e LH tornam a ser secretados, dando início à formação de novos folículos e começando um novo ciclo, marcado pela menstruação (GUYTON; HALL, 2006; BERNE; LEVY, 2000).

#### *2.1.4. Fisiologia ovariana em ratas: Ciclo menstrual e ciclo estral*

Embora com características cíclicas parecidas, o padrão rítmico do ciclo sexual de ratas, o chamado ciclo estral, tem duração média bem mais curta (de quatro ou seis dias) e é caracterizado por quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro, as quais podem ser determinadas pelos tipos celulares observados no esfregaço vaginal (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

O proestro se caracteriza pela predominância de células epiteliais nucleadas; dura de 12 a 14 horas e caracteriza-se pela maturação de um ou mais folículos, com a presença de células epiteliais no esfregaço. Essa fase precede a fase de estro (25 a 27 horas), que se caracteriza por células anucleadas e disformes. É nesta fase que a fêmea é receptiva ao macho e que ocorre o coito, identificado pela presença de células epiteliais no esfregaço vaginal.

Se não há concepção, após o estro há um período de recuperação denominado proestro, caracterizado pela proporção equivalente de leucócitos, células disformes e células epiteliais nucleadas e cuja duração é de 24 a 48 horas. Seguidamente, o ciclo entra na fase do diestro (caracterizado pela predominância de leucócitos), que dura cerca de 24 horas e é marcado pela reiniciação da secreção de hormônios ovarianos para o próximo ciclo, que novamente inicia-se com o proestro (LONG; EVANS, 1922; MANDL, 1951; ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA; 2002).

Durante o ciclo, a prolactina, o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH) permanecem baixos, aumentando na fase do proestro. Os níveis de Estradiol começam a aumentar durante o proestro e retornam à linha de base no estro. A secreção de Progesterona aumenta também durante o metaestro e diestro com uma diminuição mais tardia. Então, o valor da progesterona eleva-se para alcançar seu segundo pico no fim do proestro (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

Dentro do contexto de experimentação animal, o rato é bastante empregado no meio científico e a extrapolação de dados relativos a alterações reprodutivas neste animal para a espécie humana vem sendo realizada. A compreensão da equivalência hormonal no ciclo reprodutivo da mulher e o ciclo estral de ratas pode ser auxiliada com as figuras 4 e 5.

Figura 4. Demonstração esquemática da variação hormonal do ciclo menstrual em mulheres (*Fonte: Adaptado de BUFFET; BOUCHARD, 2001*)

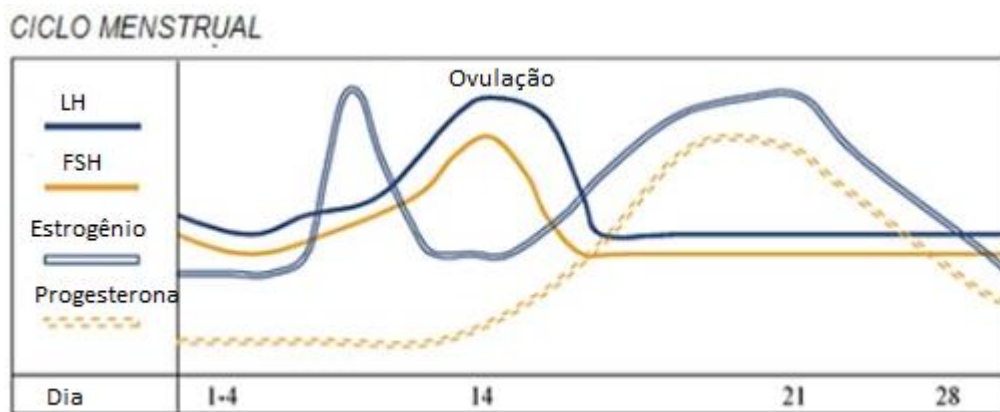
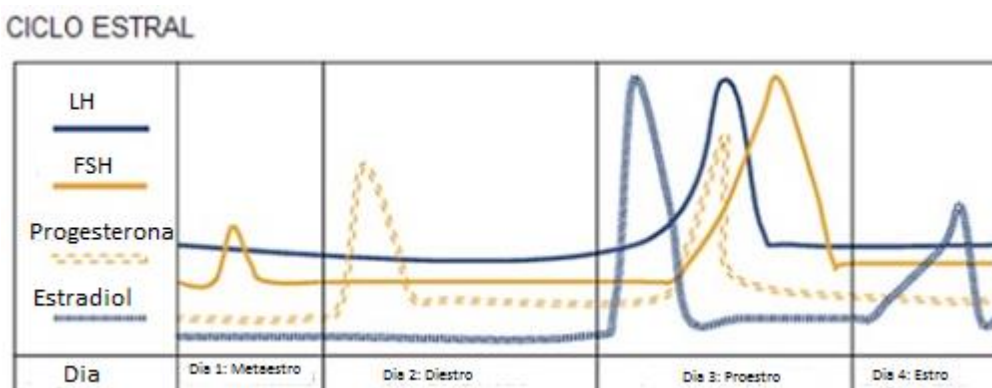


Figura 5. Demonstração esquemática da variação hormonal do ciclo estral em ratas (*Fonte: Adaptado de BUFFET; BOUCHARD, 2001*)



## O exercício físico e seu papel na fisiologia endócrina do sistema reprodutor feminino

### 2.1.4. O exercício físico e sua influência no ciclo hormonal reprodutivo

Um ciclo reprodutivo regular e saudável (eumenorreia) é resultado de um processo complexo que envolve a interação de sistemas coordenados de neurotransmissores, fatores de liberação hipotalâmicos, hormônios da hipófise anterior, hormônios esteróides sexuais gonadais e vários fatores de crescimento. Os hormônios ovarianos, como estrogênio e progesterona, são os principais hormônios femininos participantes do ciclo reprodutivo e menstrual e suas sínteses são estimuladas pelos hormônios hipofisários FSH (Hormônio folículo-estimulante) e LH (hormônio luteinizante), os quais são, por sua vez, regulados pelo hormônio liberador de gonadotrofinas hipotálamo (GnRH) (MOSAVAT; MOHAMED; MIRSANJARI, 2013).

Sabe-se que fatores intrínsecos, como a serotonina e as endorfinas, e extrínsecos, como atividades correlacionadas à liberação de cortisol, além de outros fatores ambientais, como o exercício físico, podem influenciar na liberação cíclica do GnRH nas espécies animais (PARDINI, 2001).

É indubitável que o exercício físico é benéfico para ajudar a preservação da saúde dos ossos e prevenção de osteoporose e crescimento durante a puberdade. Além de seus benefícios na saúde, é um método preferido, além das intervenções farmacêuticas, para sincronizar o sistema circadiano (ESCAMES et al., 2011). No entanto, autores alertam que o excesso de exercício também pode levar a primária amenorréia e baixa densidade mineral óssea (BMD) durante puberdade e levar a amenorréia secundária e perda óssea após a puberdade (MOSAVAT; MOHAMED; MIRSANJARI, 2013).

Apesar da comprovação de seus benefícios quando realizado de forma moderada na saúde da mulher (CAMHI et al., 2015; EL-KHOURY et al., 2015; HAN; MIDDLETON; CROWTHER, 2012; JAGO et al., 2015), outros autores tem mostrado que o exercício físico extenuante regular pode resultar em várias perturbações menstruais, incluindo atraso da menarca, ciclos anovulatórios, amenorreia secundária e fase lútea inadequada ou curta (HOCH et al., 2012; MIRI et al., 2014) em mulheres atletas. Essa hipótese é reforçada pelo fato dessas mulheres apresentarem baixas concentrações circulantes de gonadotrofinas, com pulsatilidade anormal e respostas hormonais exageradas em testes de liberação de hormônio luteinizante (LH), o que nos leva a crer que a amenorreia é mediada ao nível do hipotálamo (NIEMAN, 1997).

Parâmetros ligados ao exercício físico também interferem nas alterações hormonais sofridas. Pesquisas relatam que o aumento da incidência de alterações

endócrino-reprodutivas induzidas pelo exercício em mulheres atletas podem ser influenciadas pelo aumento das cargas de treinamento, em particular durante as fases de intensa competição (HOWLETT et al., 1984; MALINA et al., 2013). Ademais, autores sugerem também que além dos efeitos hormonais, o exercício físico intenso pode provocar perturbações em concentrações de leucócitos (MOOREN et al., 2002; KRÜGER; MOOREN, 2014; PARK; LEE, 2015), com efeitos intensidade-dependentes e variáveis também com a associação da liberação de hormônios associados ao stress nessas atividades, como o cortisol (KALANTARIDOU et al., 2010; KRÜGER et al., 2011).

Os mecanismos envolvidos na liberação de melatonina e cortisol, e suas relações com o exercício físico intenso como fator ambiental influente na liberação cíclica reprodutiva feminina é um assunto que deve ser explorado. Nos últimos anos, tem havido um interesse crescente no exercício físico como um sinal não fotótico de regulação do ritmo circadiano humano, fator que está diretamente correlacionado com a reprodução feminina.

Desde então, o treinamento de alta intensidade, a baixa disponibilidade energética, baixos níveis de leptina, peso ou gordura corporal baixos e hormônios de estresse produzidos por stress psicológico são alguns dos fatores que tem sido apontados como causadores de alterações de vias endócrinas e do ciclo menstrual (LOUIS et al., 2011; LAGOWSKA; JESZKA, 2011b). Além destes, o distúrbio da pulsatilidade do GnRH devido à disfunção hipotalâmica após o exercício exaustivo pode resultar na menarca tardia e interrupção do ciclo menstrual (WARREN; PERLROTH, 2001).

A influência negativa do exercício físico na reprodução feminina está intimamente ligada a alterações hormonais decorrentes da prática em excesso. Estudos em animais submetidas a corridas de longa distância observaram supressão da secreção pulsátil do nível sérico de LH em ratas (BLAKE; STEIN; VOMACHKA, 1984; MANNING; BRONSON, 1991), acompanhado do aumento sérico da concentração de cortisol. Outros autores também observaram diminuição da concentração de LH acompanhada de concentração normal de FSH em éguas (KELLEY et al., 2011), fato que sugere que o cortisol pode influenciar a liberação de hormônios hipotalâmicos nesses casos.

É provável que as alterações de hormônios do eixo hipofisário gonadal relativas ao exercício físico sejam consequência de vários fatores ligados à intensidade e frequência de realização do mesmo, fato que é sugerido por BULLEN et al. (1984) que relataram que um programa moderado de exercícios de resistência por 8 semanas não foi capaz de reduzir o nível de LH. A metodologia foi semelhante a outro estudo que relatou que a concentração de LH não mudou após exercícios de bicicleta ergométrica em corredores de meia-distância (MIYAUCHI; NANJO; OTSUKA, 1992). Considerando que, alguns estudos relataram que a disponibilidade de energia restrita após o exercício intenso causou a redução da concentração de LH via interrupção da liberação de GnRH em mulheres, é muito provável que fatores indiretos ainda não elucidados, consequentes ao exercício físico intenso, sejam responsáveis pelas alterações hormonais e respostas inflamatórias causadoras da infertilidade feminina (BACK et al., 2007).

A alteração da secreção pulsátil do GnRH é então estudada como a causa endócrina primária que acarreta decréscimo da produção dos esteróides ovarianos e tal situação tem como consequência principal a amenorreia (BULLEN et al., 1984; MANNING; BRONSON, 1991; WARREN; PERLROTH, 2001). A probabilidade de ocorrer a amenorréia depende de fatores associados como: perda rápida de peso, presença de um baixo peso corporal, baixo percentual de gordura, presença de estresse emocional ou ainda uma dieta restritiva (WARREN; PERLROTH, 2001; ONAKOMAIYA et al., 2014). Evidências indicam que o estresse fisiológico, metabólico e nutricional pode ser a base do seu surgimento, podendo o exercício físico extenuante ser incluído nesses fatores (AXELSON, 1987; UUSITALO et al., 1998; BUCK LOUIS et al., 2011; ONAKOMAIYA et al., 2014).

A indução de amenorréia pelo exercício ocorre em atletas com variável incidência (5 a 25%), dependendo do nível da competição e do tipo do esporte (DUMANOIR et al., 2007; LYNCH; HOCH, 2010; LI et al., 2012). Tal fato é comprovado tanto em estudos, que demonstraram que a frequência de pulso, a amplitude e a área sobre a curva de LH são alteradas em atletas corredoras (BLAKE; STEIN; VOMACHKA, 1984; LYNCH; HOCH, 2010; MIRI et al., 2014; PARK; LEE, 2015) quanto em estimativas de prevalência de amenorréia em 30 a 50% das bailarinas profissionais, 50% das corredoras competitivas, 25% das corredoras não competitivas e 12% em nadadoras (PARDINI, 2001).



A causa exata do desenvolvimento de amenorréia em atletas ainda é sujeita a controvérsias, e a relação entre amenorréia, consumo alimentar, intensidade de treino e demais fatores hormonais e imunológicos indiretos permanecem sem esclarecimentos. Alguns estudos relacionam o grande volume de treinamento com disfunções menstruais (MOSAVAT; MOHAMED; MIRSANJARI, 2013; MIRI et al., 2014), enquanto outros autores não fazem essa correlação (AXELSON, 1987). A prática de exercícios extenuantes, particularmente corridas de longa distância, tem sido associada com vários distúrbios do ciclo menstrual, influenciando a função do eixo hipotalâmico-pituitário-gonadal em homens e mulheres, porém, não é plausível ainda a afirmação de que o exercício por si só causa problemas reprodutivos (PARDINI, 2001; COOPER et al., 2007). De uma forma geral, o único fator já bem elucidado desta desordem é, de fato, a disfunção hipotalâmica, especificamente a pulsatilidade de GnRH, que reflete em baixos níveis de LH e FSH, que ainda não tem seu mecanismo de causalidade definida.

Vários autores associaram o baixo peso e gordura corporal das atletas como a causa secundária do desenvolvimento de amenorreia (ROSSI; TIRAPEGUI, 1999; PARDINI, 2001; LOUCKS, 2003; PUDER et al., 2006). Em 1980, Warren foi o primeiro autor a sugerir que desordens menstruais em dançarinas eram provocadas por desequilíbrio energético. Há indícios que a fertilidade dos mamíferos depende de uma nutrição adequada e das reservas de energia, havendo, portanto uma íntima relação entre as reservas metabólicas e a capacidade reprodutiva. Como exemplo deste fenômeno, observa-se que pessoas em estados de restrição dietética extrema como portadores de anorexia nervosa e atletas submetidos a baixo consumo energético (dançarinas e corredoras de longa distância) possuem alterações em seu sistema reprodutor (LAGOWSKA; JESZKA, 2011a; LOUCKS, 2003), porém ainda não há clareza se este fator, por só, é capaz de causar infertilidade, tampouco quais os fatores associados à baixa reserva energética.

### *2.2.2. O exercício físico e sua ação reguladora nos ritmos circadianos*

A maioria dos organismos, desde bactérias mais primitivas, até os humanos, possuem ritmos fisiológicos e comportamentais que são controlados e sincronizados

por ciclos ambientais de 24 horas, sendo esses chamados de ritmos circadianos. Em humanos e muitos animais, essa ritmicidade é realizada através de um sistema formado de estruturas que sincronizam os “relógios celulares” com os ciclos diários ambientais, especialmente com o fotoperiodismo (ESCAMES et al., 2012)

Quando isolado de estímulos ambientais, tanto a região central de controle circadiano (núcleo supra quiasmático do hipotálamo), quanto osciladores periféricos precisam de outras referências para manter o seu ciclo em 24 horas. Para isso, mecanismos não fotóticos de regulação, como as alterações de sono e vigília, horários de refeições, atividades de vida diária, regulação da temperatura corporal e o exercício físico podem ter utilidade na sincronização circadiana (DÍAZ LÓPEZ; COLMENERO URQUIJO, 2007).

Autores relatam que, em condições que há necessidade de aumento do ciclo de vigília, ou em trabalhos que exigem turnos rotativos, a prática do exercício físico regular atrasa o marcapasso circadiano, fator que pode facilitar a adaptação do organismo a esses horários (DÍAZ LÓPEZ; COLMENERO URQUIJO, 2007; ELIAKIM; NEMET, 2013; RODRIGUES DA CONCEIÇÃO et al., 2014). Além disto, alguns estudos mostram que o exercício físico pode acelerar a retomada do ritmo após uma mudança brusca ou desregularização de ciclo vigília-sono, fato este que reforça a ideia de que o exercício físico pode ser um importante meio de tratamento de alterações de ritmos circadianos decorrentes de diversos problemas (ESCAMES et al., 2012; MORGAN; CORRIGAN; BAUNE, 2015).

Embora saiba-se que o exercício físico aja como um sincronizador em humanos, ainda está sendo elucidado se alguns fatores como a intensidade, a duração, o horário mais apropriado, se acompanhado de luz ou não, têm o mesmo efeito para todas as idades de treinamento. Alguns pesquisadores que tentaram responder a algumas dessas perguntas utilizaram inicialmente extrapolação de observações em roedores para determinar a intensidade e a duração do exercício físico (MIYAUCHI; NANJO; OTSUKA, 1992; BARGER et al., 2004; SILIANO et al., 2006).

Autores (VAN REETH et al., 1994) que desejaram determinar se uma única sessão de exercício físico noturno é capaz de afetar a expressão dos ritmos de tireotrofina e de melatonina um dia após a exposição aplicaram um protocolo regular

de exercícios sob condições constantes em indivíduos saudáveis do gênero masculino com idades entre 20 e 30 anos. Os indivíduos foram estudados duas vezes: em uma primeira etapa, de situação controle, sem a aplicação do exercício, para verificar o estado do sistema de temporização circadiano antes do estímulo e em uma segunda etapa, em que foi aplicada uma sessão de três horas de exercício físico interrompido em um cicloergômetro. A aplicação do exercício físico na fase noturna demonstrou um nítido atraso de fase de uma a duas horas um dia depois, tanto da secreção de melatonina quanto de tireotrofina. Os maiores atrasos de fase puderam ser observados quando o estímulo foi apresentado três a cinco horas antes do nadir da temperatura (momento de maior probabilidade de encontrar-se valores mínimos) dos indivíduos treinados.

Em busca de respostas que pudessem explicar a ação de mecanismos não fotóticos na regulação do ritmo circadiano, alguns pesquisadores sugerem, através de experimentos com roedores, a participação de vias neurais secundárias que estariam informando os núcleos supraquiasmáticos sobre informações reguladoras do ritmo. O folheto intergeniculado talâmico e os núcleos da rafe, as principais vias propostas, transmitiriam informações de estímulos não-fóticos para os núcleos supraquiasmáticos, dessa forma promovendo a sincronização (VRANG; MROSOVSKY; MIKKELSEN, 2003). Há, na literatura, indícios dessa comprovação nos trabalhos de Mikkelsen et al. (1998), que encontraram um aumento da expressão de genes c-fos no folheto intergeniculado em resposta a uma informação não-fótica. Já nos estudos de Takahashi et al. (1984), que lesaram duas estruturas neurais (folheto intergeniculado e núcleos da rafe) em ratos cegos e tentaram sincronizar pelo exercício, os animais não apresentaram sincronização do ritmo atividade/repouso com a exposição a ciclos de exercício físico.

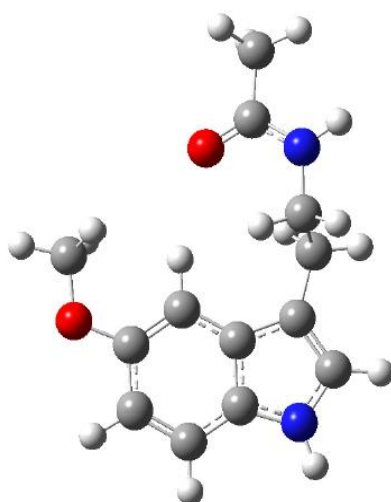
Enfim, embora já não se tenha mais dúvida sobre o efeito sincronizador do exercício físico na espécie humana, os mecanismos responsáveis por essa sincronização ainda são desconhecidos.

### *2.2.3 A melatonina, seu papel sistêmico e sua função na fisiologia ovariana*

A melatonina (N - acetil - 5 – metoxitriptamina) (fig.6) é uma indolamina produzida pela glândula pineal, que está localizada no teto do terceiro ventrículo entre os dois hemisférios cerebrais. Pesa aproximadamente 0,13 gramas e possui aproximadamente 1,2 cm de diâmetro, originando-se do diencéfalo. A pineal é um órgão endócrino ativo, conectado à retina pelas projeções retino-hipotalâmicas via núcleo supraquiasmático do hipotálamo, no qual funciona como um controle autônomo para o gânglio cervical superior (MACCHI; BRUCE, 2004; CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005).

Além da glândula pineal, outros locais como a retina, o corpo ciliar da íris, as glândulas harderianas e lacrimais, linfócitos, intestino grosso e ovário também são fontes produtoras deste hormônio (MAGANHIN et al., 2008). Essas outras fontes tem contribuição para a minoria da concentração plasmática da melatonina (25%), porém, são importantes para ação local na qual foram produzidas (PRATA LIMA; BARACAT; SIMOES, 2004).

Fig. 6 – Esquema tridimensional da melatonina. *Fonte: MALDONADO et al., 2012*



A secreção da melatonina é gerada por pulsos de norepinefrina (NEP) , que é liberada de neurônios adjacentes. Esta atividade de liberação de NEP e do funcionamento da pineal são ativados na escuridão e inibidos pela luz. As condições de claro-escuro são transmitidas através dos olhos para o núcleo supraquiasmático (SCN) , cujos sinais são inibidas em luz e ativado pela ausência desta inibição no escuro (MAGALHÃES et al., 2011).

Entre outras funções, a participação da glândula pineal na regulação da reprodução fotoperiódica e sazonal-dependente foi firmemente estabelecida, mas ainda é mal compreendida. Os mecanismos pelos quais a melatonina age sobre os sistemas neuroendócrinos para afetar a reprodução não são completamente conhecidos. Uma possibilidade plausível é que a melatonina age diretamente afetando as funções do hipotálamo envolvidas na regulação inibitória do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (CHUFFA et al., 2011).

A liberação de hormônios hipofisários gonadotróficos, hormônio folículo-estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH), muitas vezes ocorre em uma base rítmica com o período de lançamento que vão desde um ultradiano (ou seja, cerca de 1-4 h) para um circadiano (isto é, cerca de 24 h), e um padrão sazonal (ou seja, cerca de 1 ano). Em espécies fotoperiódicas, o padrão de secreção de melatonina pela glândula pineal é responsável pelos efeitos da duração do dia no ciclo de reprodução sazonal (MALDONADO et al., 2012). Nestas espécies, a melatonina tem um efeito pró-gonadotrófico, pelo aumento das concentrações de FSH e de pulsos de LH, provavelmente através da inibição dos efeitos inibidores de esteróides sexuais sobre a ovulação (ROCHA et al., 2011).

Em um certo número de espécies de roedores e outros mamíferos, a liberação pré-ovulatória de gonadotrofinas é rigorosamente controlada por um relógio circadiano neural. Estas são chamadas de espécies não-fotoperiódicas, a maioria delas com períodos de curta duração da gravidez, que não obedecem a um ritmo reprodutivo sazonal, mas apresentam um ritmo circadiano diário de liberação de melatonina (CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005).

Assim, em roedores, a melatonina tem propriedades antigonadotróficas, como a inibição do desenvolvimento gonadal, espermatogênese e produção de andrógenos em machos e ausência de folículos, corpo lúteo e proliferação do tecido intersticial em ratas (SOARES JÚNIOR; HOLANDA; BARACAT, 2008).

Apesar de haver, muitos estudos a respeito da função da melatonina na regulação dos ritmos circadianos, a função da melatonina na reprodução humana ainda não é completamente elucidada (MAGALHÃES et al., 2011). Um grande número de informações sugere que a melatonina e os hormônios reprodutivos são inter-relacionados. Este conceito é baseado na observação do aumento dos níveis de

melatonina em pacientes com hipogonadismo e deficiência de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (MACCHI; BRUCE, 2004) em pacientes de amenorréia hipotalâmica, e na anorexia nervosa (MAGANHIN et al., 2008). Além disso, a ciência tem observado que o aumento da melatonina pode influenciar a produção de esteróides sexuais em diferentes estágios de maturação folicular do ovário (SILVA; FIGUEIREDO; VAN DEN HURK, 2009).

A melatonina, bem como seu metabólitos, também é conhecida por ser antioxidante de amplo espectro e varredora de radicais livres (MIKKELSEN; VRANG; MROSOVSKY, 1998; REITER et al., 2013) e sua função é saciar espécies reativas de oxigênio (ROS), bem como espécies reativas de nitrogênio (PRATA LIMA; BARACAT; SIMÕES, 2004). É provável que níveis elevados de melatonina em folículos pré-ovulatórios, como pode ser visto em mulheres normais, sirvam para proteger as células da granulosa e o oócito de radicais livres que são induzidos durante a ovulação e foliculogênese.

A foliculogênese, evento iniciado na vida pré-natal na maioria das espécies, pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando-se com a formação do folículo primordial e culminando com a fase de folículo pré-ovulatório (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005; SILVA; FIGUEIREDO; VAN DEN HURK, 2009). Os mecanismos que controlam a foliculogênese ainda não estão plenamente esclarecidos, entretanto, sabe-se que hormônios e diversos fatores de crescimento estão envolvidos (ESCAMES et al., 2012).

Um dos fatores hormonais que se acredita regular o desenvolvimento folicular é a melatonina. Os estudos que demonstraram a presença de seus receptores (MT1 e MT2) no folículo sustentam a hipótese de sua atuação na fisiologia ovariana (NILES et al., 1999; SOARES et al., 2003; LEE; KIM; KIM, 2014). Entretanto, ainda são escassos os estudos que relacionam a ação da melatonina sobre a foliculogênese e ainda há poucas informações sobre a sua atuação na fase inicial, ou pré-antral. Autores observaram que, em camundongas, a utilização de 100  $\mu$ M de melatonina aumentou a produção de prostaglandina (P4) e androstenediona (A4) em folículos secundários (100-130  $\mu$ m de diâmetro), por outro lado, a adição de doses elevadas deste hormônio (2 mM) foi tóxica aos folículos, diminuindo a viabilidade folicular (ADRIAENS et al., 2006).

Apesar dos grandes avanços em biotecnologias reprodutivas, a baixa qualidade oocitária permanece como um grande problema para infertilidade feminina. Dentre os fatores concorrentes para o desenvolvimento oocitário, podemos citar a produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) dentro do folículo ovariano, principalmente durante o processo ovulatório, e o estresse oxidativo desencadeado por eles em algumas situações, como por exemplo durante as atividades físicas intensas (TAMURA et al., 2009).

O equilíbrio entre a produção de EROs e a habilidade dos antioxidantes em reduzi-los é um importante fator para a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário. Alguns estudos *in vitro* demonstraram efeitos estimulatórios da melatonina sobre a produção de P4 em células da granulosa de ratas (NILES et al., 1999) e mulheres (BRZEZINSKI et al., 1992), substâncias essenciais para a ovulação e luteinização (SOARES et al., 2003). Esses autores relatam que, nestes casos, a melatonina apresenta-se, como um fator em potencial que pode proteger o oócito e suas células circundantes contra os danos ocasionados pelo estresse oxidativo.

Outros autores, porém, relatam que, em estudos nas áreas anterior do hipotálamo e preótica medial de ratos, foi observado uma supressão da liberação do GnRH mediado pelo mecanismo de inibição da melatonina no eixo hipotalâmico gonadal, o que caracteriza uma ação antigonadal da melatonina. Tais autores ainda citam que há forte evidência que o aumento da melatonina pode agir diretamente na transcrição do GnRH, tendo essa intermediação um caráter cíclico (ROY et al., 2001).

Nos seres humanos, os únicos dados sobre variações cíclicas de melatonina vem de mulheres submetidas a estimulação ovárica. Os níveis de melatonina atingem um nadir na fase pré-ovulatória e um pico na fase lútea, sugerindo que a melatonina tem efeitos variáveis dependentes da fase menstrual (FERNANDO; ROMBAUTS, 2014).

É também sabido que em mulheres que trabalham à noite são mais propensas do que trabalhadoras diurnas a ter perturbações circadianas e ciclos menstruais mais longos, mais menorragia e dismenorreia (DAVIS et al., 2014). Além disto, autores relataram que os níveis de melatonina variaram significativamente entre a noite e o dia em trabalhadoras noturnas, enquanto os níveis de LH e FSH não, sugerindo que

a irregularidade menstrual associada ao trabalho noturno pode ser explicada por flutuações de melatonina (MIYAUCHI; NANJO; OTSUKA, 1992).

Estes resultados confirmam os efeitos centrais da melatonina no eixo hipotálamo-hipófise, sendo capaz de modificar a liberação das gonadotrofinas e GnRH. Na verdade, em doses muito elevadas, quando combinada com a progesterona, a melatonina tem a capacidade de suprimir a ovulação em seres humanos, possivelmente interferindo com a liberação de LH (TAMURA et al., 2009). Isto pode representar um resquício evolutivo da inibição da ovulação, durante os meses mais escuros, destinadas a impedir o nascimento da prole quando os recursos são menos abundantes (FERNANDO; ROMBAUTS, 2014).

Curiosamente, receptores de melatonina foram encontrados em células da granulosa, indicando que este pode ser um local adicional de atividade de melatonina (BRZEZINSKI et al., 1992; NILES et al., 1999). E estudos mostram que quando administrada sistemicamente em gatos, a melatonina parece acumular-se preferencialmente nos ovários se comparados com outros órgãos (SLOMINSKI et al., 2012) e concentrações mais altas de melatonina são encontrados no fluido folicular do que no soro pré-ovulatório (BRZEZINSKI et al., 1987; RÖNNBERG et al., 1990)

Um estudo humano por NAKAMURA et al. (2003) descobriu que folículos pré-ovulatórios maiores tiveram maiores concentrações de melatonina fluido folicular de folículos imaturos menores. Este é o único estudo que abordou diferenças de fluido folicular dentro do mesmo paciente, e indica que o fluido folicular de folículos maduros têm capacidade antioxidante mais elevada do que os folículos menires, o que implica em uma função de maturação dos oócitos da melatonina. No entanto, é ainda incerto se este é a causa ou a consequência desse fenômeno.

Ao aumentar ainda mais credibilidade do papel da melatonina na reprodução, concentrações de melatonina parecem aumentar durante a gravidez (ADRIAENS et al., 2006), e os investigadores começaram a avaliar o seu papel potencial como uma terapêutica em pré-eclâmpsia e morbidade neurológica neonatal (REITTER et al., 2008). Investigações recentes têm mostrado que, em modelos ovinos, a infusão intra-uterina de compostos de melatonina causam um aumento no fluxo sanguíneo da artéria umbilical e aumento proporcional do peso placentário. Da mesma forma, a infusão intra-uterina de um antagonista do receptor de melatonina diminuiu o fluxo



sanguíneo aórtico e o peso fetal, sugerindo que a ativação de receptores de melatonina pode ser o mecanismo correlacionado ao aumento aparente no fluxo de sangue fetal.

As implicações positivas dos níveis de melatonina mais elevados sobre o ciclo menstrual humano, fertilidade e gravidez são, portanto, bem documentadas, com diferentes níveis de evidência (SOARES JÚNIOR; HOLANDA; BARACAT, 2008). No entanto, é evidente que a melatonina tem uma finalidade do sistema reprodutor humano, com muitos dos seus efeitos observados, provavelmente relacionada com a sua capacidade de diminuir os efeitos do estresse oxidativo no sistema reprodutivo.

#### *2.2.4. Relação do exercício físico e a síntese de melatonina*

Evidências sugerem que, além da mudança das suas dosagens que ocorrem de acordo com as fases do ciclo ovulatório, os níveis de melatonina podem ser alterados agudamente pelo exercício (BUXTON et al., 1997). E, embora a maioria dos estudos mostre que os níveis plasmáticos de melatonina aumentem transitoriamente após o exercício (ATKINSON et al., 2003; KNIGHT et al., 2005), uma diminuição ou nenhuma alteração na secreção de melatonina após o exercício também tem sido relatados (MONTELEONE et al., 1990, 1992).

Autores descrevem que o aumento agudo dos níveis séricos de prolactina no exercício físico é o principal fator responsável pelas alterações ovarianas, mas evidenciam que tal secreção é modulada pela serotonina ou triptofano, substâncias precursoras da melatonina (STRUDER et al., 1996, 1997). Outros relatam que o aumento do lactato plasmático tem sido apontado como um dos mecanismos responsáveis pela ativação do eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal, e que outros mediadores humorais liberados durante o exercício são capazes de ativar esse eixo, porém suas reações não estão completamente esclarecidas (ESCAMES et al., 2012).

Também há indícios de que o aumento agudo de melatonina na circulação após uma sessão de exercícios é atenuada pelo treinamento regular. Em um estudo que fez dosagens do pico de melatonina após a realização de exercício físico intenso em mulheres, por exemplo, houve diminuição em 52%, quando estas fizeram exercícios de forma regular (SKRINAR et al., 1989).

Apesar de o mecanismo de alterações hipotalâmicas mediadas pela liberação de melatonina durante o exercício físico não ser totalmente conhecido, podendo ter consequências maléficas para o sistema reprodutivo, estas podem ser amenizadas por outro fator de caráter benéfico: O stress oxidativo causado pelo exercício vigoroso pode ser diminuído pela ação anti-oxidante da melatonina, que pode proteger células do tecido reprodutivo contra danos moleculares em potencial (MALDONADO et al., 2012; THRIFT et al., 2014).

A variabilidade hormonal induzida pela resposta aguda ao exercício pode ser dependente da fase circadiana em que o exercício foi realizado (KANALEY et al., 2001; MONTELEONE et al., 1990). Além disto, condições de claro ou escuro, bem como duração, intensidade do exercício e local de amostragem da melatonina também podem alterar os resultados (EDWARDS; REILLY; WATERHOUSE, 2009), como comprova alguns estudos em humanos. Nestes, houve indícios de que, durante o dia, os níveis de melatonina aumentam quando o organismo é submetido ao estresse do exercício, como por exemplo, no caso de mulheres que são corredoras de longa distância (DÍAZ LÓPEZ; COLMENERO URQUIJO, 2007; HOHTARI; PAKARINEN; KAUPPILA, 1987).

Deste modo, variáveis de controle desses fatores correlacionados à realização dos exercícios são necessárias para o bom entendimento da influência do exercício na função reprodutiva, que permanece controversa na literatura.

### 3. REFERÊNCIAS

- ADRIAENS, I.; JACQUET, P.; CORTVRINDT, R.; JANSSEN, K.; SMITZ. Melatonin has dose-dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis. **Toxicology**, v. 228, n. 2-3, p. 333–43, 2006.
- AGUILÓ, A.; TAULER, P.; FUENTESPINA, E.; TUR, J.A.; CORDOVA, A.; PONS, A. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. **Physiology & behavior**, v. 84, n. 1, p. 1–7, 2005.
- AIRES, M. DE M. **Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- APPLEGATE, E. **Anatomia e Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- ARENA, B.; MAFFULLI, N.; MAFFULLI, F.; MORLEO, M.A. Reproductive hormones and menstrual changes with exercise in female athletes. **Sports Medicine**, v. 19, n. 4, p. 278–287, 1995.
- ARIKAWA, A. Y.; THOMAS, W.; PATEL, S.R.; KURZER, M.S. No effect of exercise on urinary 6-sulfatoxymelatonin and catecholamines in young women participating in a 16-week randomized controlled trial. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 22, n. 9, p. 1634–1636, 2013.
- ATKINSON, G.; DRUST, B.; REILLY, T.; WATERHOUSE, J. The relevance of melatonin to sports medicine and science. **Sports Medicine**, v. 33, n. 11, p. 809–831, 2003.
- AXELSON, J. F. Forced swimming alters vaginal estrous cycles, body composition, and steroid levels without disrupting lordosis behavior or fertility in rats. **Physiology & behavior**, v. 41, n. 5, p. 471–9, 1987.
- BABINSKI, M. A. Anatomia dos ovários : considerações clínico-patológicas. **Acta Scientae Medica**, v. 5, n. 2, p. 43–52, 2012.
- BACK, F. A.; FORTES, F.S.; SANTOS, E.H.R.; TAMBELLI, R.; MENNA-BARRETO, L.S.; LOUZADA, F.M. Sincronização não-fótica : o efeito do exercício físico aeróbio. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13, n. 2, p. 138–142, 2007.
- BARGER, L. K.; WRIGHT JR, K.P.; HUGHES, R.J. CZEISLER, C.A.D. Daily exercise facilitates phase delays of circadian melatonin rhythm in very dim light. **American**

**journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 286, n. 6, p. R1077–R1084, 2004.

BERNE, R. B.; LEVY, M. N. **Tratado de Fisiologia Humana**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BLAKE, M. J.; STEIN, E. A; VOMACHKA, A J. Effects of exercise training on brain opioid peptides and serum LH in female rats. **Peptides**, v. 5, n. 5, p. 953–8, 1984.

BRZEZINSKI, A.; SEIBEL, M.M.; LYNCH, H.J.; DENG, M.H.; WURTMAN, R.J. Melatonin in human preovulatory follicular fluid. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 64, n. 4, p. 865–867, 1987.

BRZEZINSKI, A.; FIBICH, T.; COHEN, M.; SCHENKER, J.G.; LAUFER, N. Effects of melatonin on progesterone production by human granulosa lutein cells in culture. **Fertility and sterility**, v. 58, n. 3, p. 526–529, 1992.

LOUIS, G. M.; LUM, K.J.; SUNDARAM, R.; CHEN, Z.; KIM, S.; LYNCH, C.D.; SCHISTERMAN, E.F. PYPPE, C. Stress reduces conception probabilities across the fertile window: Evidence in support of relaxation. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 7, p. 2184–2189, 2011.

BUFFET, N. C.; BOUCHARD, P. The neuroendocrine regulation of the human ovarian cycle. **Chronobiology international**, v. 18, n. 6, p. 893–919, 2001.

BULLEN, B. A.; SKRINAR, G.S.; BEITINS, I.Z.; CARR, D.B.; REPERT, S.M.; DOTSON, C.O.; FENCL, M.D.; GERVINO, E.V.; McARTHUR, J.W. Endurance training effects on plasma hormonal responsiveness and sex hormone excretions. **Journal of Applied Physiology**, v. 56, n. 6, p. 1453–1463, 1984.

BUXTON, O.M.; L'HERMITE-BALÉRIAUX, M.; HIRSCHFELD, U.; CAUTER, E. Acute and delayed effects of exercise on human melatonin secretion. **Journal of biological rhythms**, v. 12, n. 6, p. 568–74, 1997.

CAMHI, S. M.; CROUTER, S.E.; HAYMAN, L.L.; MUST, A.; LICHTENSTEIN, A.H. Lifestyle Behaviors in Metabolically Healthy and Unhealthy Overweight and Obese Women: A Preliminary Study. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. 1–12, jan. 2015.

CARR, D. B.; REPERT, S.M.; BULLEN, B. A.; SKRINAR, G.S.; BEITINS, I.Z.; ARNOLD, M.; ROSEMBLATT, M.; MARTIN, J.B.; McARTHUR, J.W. Plasma melatonin increases during exercise in women. **J.Clin.Endocrinol.Metab**, v. 53, n. 1,

p. 224–225, 1981.

CHATARD, J. C.; ATLAOUI, D.; LAC, G.; DUCLOS, M.; HOOPER, S.; MACKINNON, L. Cortisol, DHEA, performance and training in elite swimmers. **International Journal of Sports Medicine**, v. 23, n. 7, p. 510–515, 2002.

CHUFFA, L. G.; SEIVA, F.R.; FÁVARO, W.J.; TEIXEIRA, G.R.; AMORIM, J.P.; MENDES, L.O.; FIORUCI, B.A.; PINHEIRO, P.F.; FERNANDES, A.A.; FRANCI, J.A.; DELELLA, F.K.; MARTINEZ, M.; MARTINEZ, F.E. Melatonin reduces LH, 17 beta-estradiol and induces differential regulation of sex steroid receptors in reproductive tissues during rat ovulation. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, n. 1, p. 108, 2011.

CLAUSTRAT, B.; BRUN, J.; CHAZOT, G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. **Sleep Medicine Reviews**, v. 9, n. 1, p. 11–24, 2005.

COOPER, D. M.; RADOM-AZIK, S.; SCHWINDT, C.; ZALDIVAR JR, F. Dangerous exercise: lessons learned from dysregulated inflammatory responses to physical activity. **Journal of applied physiology**, v. 103, n. 2, p. 700–709, 2007.

DAVIS, G. R.; ETHEREDGE, C.E.; MARCUS, L.; BELLAR, D. Prolonged sleep deprivation and continuous exercise: effects on melatonin, tympanic temperature, and cognitive function. **BioMed research international**, v. 2014, p. 1–6, jan. 2014.

DE CRÉE, C. Sex steroid metabolism and menstrual irregularities in the exercising female : a review. **Sports Medicine**, v. 25, n. 6, p. 369–406, 1998.

DÍAZ LÓPEZ, B.; COLMENERO URQUIJO, M. D. Influence of physical training on the Syrian hamster's melatonin rhythm. **Neuroscience Letters**, v. 428, n. 2-3, p. 68–71, 2007.

DUMANOIR, G. R.; HAYKOWSKY, M.J.; SYROTUIK, D.G.; TAYLOR, D.A.; BELL, G.J. The effect of high-intensity rowing and combined strength and endurance training on left ventricular systolic function and morphology. **International journal of sports medicine**, v. 28, p. 488–494, 2007.

EDWARDS, B. J.; REILLY, T.; WATERHOUSE, J. Zeitgeber-effects of exercise on human circadian rhythms: what are alternative approaches to investigating the existence of a phase-response curve to exercise? **Biological Rhythm Research**, v. 40, n. 1, p. 53–69, 2009.

- ELIAKIM, A.; NEMET, D. The Endocrine Response to Exercise and Training in Young Athletes. **Pediatric Exercise Science**, v. 25, p. 605–615, 2013.
- EL-KHOURY, F.; CASSOU, B.; LATOUCHE, A.; AEGERTER, P.; CHARLES, M.A.; DARGENT-MOLINA, P. Effectiveness of two year balance training programme on prevention of fall induced injuries in at risk women aged 75-85 living in community: Ossébo randomised controlled trial. **British Medical Journal**, v. 351, p. 1–11, 2015.
- ENNOUR-IDRISSI, K.; MAUNSELL, E.; DIORIO, C. Effect of physical activity on sex hormones in women: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Breast Cancer Research**, v. 17, n. 1, p. 139, 2015.
- ESCAMES, G.; OZTURK, G.; BAÑO-OTÁLORA, B.; POZO, M.J.; MADRID, J.A.; REITER, R.J.; SERRANO, E.; CONCEPCIÓN, M.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Exercise and melatonin in humans: reciprocal benefits. **Journal of Pineal Research**, v. 52, n. 1, p. 1–11, 2012.
- EVANS, A. C.; CURRIE, W.; RAWLINGS, N. Effects of naloxone on circulating gonadotrophin concentrations in prepubertal heifers. **Journal of reproduction and fertility**, v. 96, p. 847–855, 1992.
- FERNÁNDEZ-GARCIA, B.; LUCIA, A.; HOYOS, J.; CHICHARRO, J.L.; RODRIGUEZ-ALONSO, M.; BANDRÉS, F.; TERRADOS, N. The response of sexual and stress hormones of male pro-cyclists during continuous intense competition. **International Journal of Sports Medicine**, v. 23, n. 8, p. 555–560, 2002.
- FERNANDO, S.; ROMBAUTS, L. Melatonin: shedding light on infertility? - a review of the recent literature. **Journal of Ovarian Research**, v. 7, n. 1, p. 98, 2014.
- ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**, Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002.
- FISCHER, H. G.; HOLLMANN, W.; DE MEIRLEIR, K. Exercise changes in plasma tryptophan fractions and relationship with prolactin. **International journal of sports medicine**, v. 12, n. 5, p. 487–9, 1991.
- FREEMAN, M. E.; KANYICKA, L. A.; LERANT, A. Prolactin : Structure, Function, and Regulation of Secretion. **Physiological reviews**, v. 80, n. 4, p. 1523–1631, 2000.
- GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

GEORGE, C.; LEONARD, J.; HUTCHINSON, M. The female athlete triad: a current concepts review. **South African Journal of Sports Medicine**, v. 23, n. 2, p. 50–56, 2011.

GLEESON, M.; MCDONALD, W.A.; CRIPPS, A.W.; PYNE, D.B.; CLANCY, E.L.; FRICKER, P.A. The effect on immunity of long-term intensive training in elite swimmers. **Clinical and experimental immunology**, v. 102, n. 1, p. 210–216, 1995.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12.e.d., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

HACKNEY, A. C.; DAVIS, H. C.; LANE, A. R. Exercise augments the nocturnal prolactin rise in exercise-trained men. **Therapeutic advances in endocrinology and metabolism**, v. 6, n. 5, p. 217–22, out. 2015.

HAN, S.; MIDDLETON, P.; CROWTHER, C. A. Exercise for pregnant women for preventing gestational diabetes mellitus. **The Cochrane database of systematic reviews**, v. 7, p. CD009021, jan. 2012.

HAWKINS, S. M.; MATZUK, M. M. The menstrual cycle: basic biology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1135, p. 10–18, 2008.

HERRMANN, D.; BUCK, C.; SIOEN, I.; KOURIDE, Y.; MARILD, S.; MOLNÁR, D.; MOURATIDOU, T.; PITSILADIS, Y.; RUSSO, O.; VEIDEBAUM, T.; AHRENS, W.; IDEFICS CONSORTIUM. Impact of physical activity, sedentary behaviour and muscle strength on bone stiffness in 2–10-year-old children-cross-sectional results from the IDEFICS study. **International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity**, v. 12, n. 1, p. 112, 17 set. 2015.

HOCH, A. Z.; PAPANEEK, P.; SZABO, A.; WIDLANSKY, M.E.; SCHIMKE, J.E.; GUTTERMAN, D.D. Association Between the Female Athlete Triad and Endothelial Dysfunction in Dancers. **Clin J Sport Med**, v. 29, n. 6, p. 997–1003, 2012.

HOFFMAN, B. L.; SCHORGE, J.O.; HALORSON, L.M.; BRADSHAW, K.D.; CUNNINGHAM, F.G. **Ginecologia de Williams**. 2. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.

HOHTARI, H.; PAKARINEN, A; KAUPPILA, A. Serum concentrations of thyrotropin, thyroxine, triiodothyronine and thyroxine binding globulin in female endurance runners and joggers. **Acta endocrinologica**, v. 114, n. 1, p. 41–6, 1987.

HOWLETT, T. A.; TOMLIN, S.; NGAHFOONG, L.; REES, L.H.; BULLEN, B.A.;

SKRINAR, G.S.; MCARTHUR, J.W. Release of beta endorphin and met-enkephalin during exercise in normal women: response to training. **British medical journal**, v. 288, p. 1950–1952, 1984.

JAGO, R.; EDWARDS, M.J.; SEBIRE, S.J.; TOMKINSON, K.; BIRD, E.L.; BANFIELD, K.; MAY, T.; KESTEN, J.M.; COOPER, A.R.; POWELL, J.E.; BLAIR, P.S. Effect and cost of an after-school dance programme on the physical activity of 11–12 year old girls: The Bristol Girls Dance Project, a school-based cluster randomised controlled trial. **International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity**, v. 12, n. 1, p. 128, 6 out. 2015.

JAHREIS, G.; KAUF, E.; FRÖHNER, G.; SCHMIDT, H.E. Influence of intensive exercise on IGFI and steroid hormones. **Growth Regulation**, v. 1, p. 95–99, 1991.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KALANTARIDOU, S. N.; ZOUMAKIS, E.; MAKRIGIANNAKIS, A.; LAVASIDIS, L.G.; VREKOUSSIS, T.; CHROUSOS, G.P. Corticotropin-releasing hormone, stress and human reproduction: An update. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 85, n. 1, p. 33–39, 2010.

KANALEY, J. A.; WELTMAN, J.Y.; PIEPER, K.S.; WELTMAN, A.; HARTMAN, M.L. Cortisol and Growth Hormone Responses to Exercise at Different Times of Day. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 6, p. 2881–2889, 2001.

KELLEY, D. E.; GIBBONS, J.R.; SMITH, R.; VERNON, K.L.; PRATT-PHILLIP, S.E.; MORTENSEN, C.J. Exercise affects both ovarian follicular dynamics and hormone concentrations in mares. **Theriogenology**, v. 76, n. 4, p. 615–622, 2011.

KNIGHT, J. A.; THOMPSON, S.; RABOUD, J.M.; HOFFMAN, B.R. Light and exercise and melatonin production in women. **American Journal of Epidemiology**, v. 162, n. 11, p. 1114–1122, 2005.

KRÜGER, K.; AGNISCHOCK, S.; LECHTERMANN, A.; TIWARI, S.; MISHRA, M.; PILAT, C.; WAGNER, A.; TWEDDELL, C.; GRAMLICH, I.; MOOREN, F.C. Intensive resistance exercise induces lymphocyte apoptosis via cortisol and glucocorticoid receptor-dependent pathways. **Journal of applied physiology**, v. 110, n. 5, p. 1226–32, 2011.



- KRÜGER, K.; MOOREN, F. C. Exercise-induced leukocyte apoptosis. **Exercise Immunology Review**, v. 20, p. 117–134, 2014.
- LAGOWSKA, K.; JESZKA, J. Are young female athletes at risk of amenorrhoea? analysis of body composition, nutritional and endocrine factors. **British journal of sports medicine**, v. 45, n. 4, p. 223–232, 2011.
- LARRABEE, R. C. Leucocytosis after violent exercise. **Journal of Medical Research**, v. 7, n. 1, p. 76–82, 1902.
- LEE, H.; KIM, S.; KIM, D. Effects of exercise with or without light exposure on sleep quality and hormone responses. **The Journal of Exercise Nutrition and Biochemistry**, v. 6, n. 1, p. 293–299, 11 set. 2014.
- LI, Y.; ZHU, Y.; ZHANG, J.; ZHANG, X.; ZENG, Y. Biochemical changes and endocrine responses in pre-competition training in elite swimmers. **Biology of Sport**, v. 29, n. 1, p. 71–75, 2012.
- LONG, J. A.; EVANS, H. M. The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. **Memories of University of California**, v. 6, p. 1–148, 1922.
- LOUCKS, A. B. Energy availability, not body fatness, regulates reproductive function in women. **Exercise and sport sciences reviews**, v. 31, n. 3, p. 144–148, 2003.
- LYNCH, S. L.; HOCH, A. Z. The Female Runner: Gender Specifics. **Clinics in Sports Medicine**, v. 29, n. 3, p. 477–498, 2010.
- MACCHI, M. M.; BRUCE, J. N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 25, n. 3-4, p. 177–95, 2004.
- MACHADO, L. “ **Os ovários : Estrutura Anatômica e Fisiologia ; Implicações Clínicas das Hipo e Hiperfunções ; Conduas Terapêuticas** ”. [s.l: s.n.].
- MACKINNON, L. T.; HOOPER, S.L.; JONES, S.; GORDON, R.D.; BACHMANN, A.W. Hormonal, immunological, and hematological responses to intensified training in elite swimmers. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 29, n. 12, p. 1637–1645, 1997.
- MAGANHIN, C. C.; CARBONEL, A.A.F.; HATTY, J.H.; FUCHS, L.F.P.; OLIVEIRA-JUNIOR, I.S.; SIMÕES, M.J.; SIMÕES, R.S.; BARACAT, E.C., SOARES-JR, J.M. Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: breve revisão. **Revista da**

**Associação Médica Brasileira**, v. 54, n. 3, p. 267–271, 2008.

MALDONADO, M. D.; MANFREDI, M.; RIBAS-SERNA, J.; GARCIA-MORENO, H.; CALVO, J.R. Melatonin administered immediately before an intense exercise reverses oxidative stress, improves immunological defenses and lipid metabolism in football players. **Physiology & Behavior**, v. 105, n. 5, p. 1099–1103, 2012.

MALINA, R. M.; BAXTER-JONES, A.D.; ARMSTRONG, N.; BEUNEN, G.P.; CAINE, D.; DALY, R.M.; LEWIS, R.D.; ROGOL, A.D.; RUSSEL, L. Role of intensive training in the growth and maturation of artistic gymnasts. **Sports Medicine**, v. 43, p. 783–802, 2013.

MANDL, A. M. The phases of the oestrous cycle in the adult white rat. **Journal of Experimental Biology**, v. 28, p. 576–584, 1951.

MANNING, J. M.; BRONSON, F. H. Suppression of puberty in rats by exercise: effects on hormone levels and reversal with GnRH infusion. **The American journal of physiology**, v. 260, n. 4 Pt 2, p. R717–23, abr. 1991.

MARCONDES, F.K.; BIANCHI, F.J.; TANNO, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia**, v. 62, n. 4A, p. 609–614, 2002.

MARRIN, K.; DRUST, B.; GREGSON, W.; MORRIS, C.J.; CHESTER, N.; ATKINSON, G. Diurnal variation in the salivary melatonin responses to exercise: relation to exercise-mediated tachycardia. **European journal of applied physiology**, v. 111, n. 11, p. 2707–14, 2011.

MCPHERSON, M.; JANSSEN, I.; GRUNDY, A.; TRANMER, J.; RICHARDSON, H.; ARONSON, K.J. Physical activity, sedentary behavior, and melatonin among rotating shift nurses. **Journal of occupational and environmental medicine**, v. 53, n. 7, p. 716–21, 2011.

MIKKELSEN, J. D.; VRANG, N.; MROSOVSKY, N. Expression of Fos in the circadian system following nonphotic stimulation. **Brain Research Bulletin**, v. 47, n. 4, p. 367–376, 1998.

MIRI, M.; KARIMI JASHNI, H.; ALIPOUR, F. Effect of exercise intensity on weight changes and sexual hormones (androstenedione and free testosterone) in female rats with estradiol valerate-induced PCOS. **Journal of ovarian research**, v. 7, n. 37,

p. 2–7, jan. 2014.

MIYAUCHI, F.; NANJO, K.; OTSUKA, K. Effects of night shift on plasma concentrations of melatonin, LH, FSH and prolactin, and menstrual irregularity.

**Sangyō Igaku. Japanese Journal of Industrial Health**, v. 34, n. 6, p. 545–550, 1992.

MONTELEONE, P.; MAJ, M.; FUSCO, M.; ORAZZO, C.; KEMALI, D. Physical exercise at night blunts the nocturnal increase of plasma melatonin levels in healthy humans. **Life Sciences**, v. 47, n. 22, p. 1989–1995, 1990.

MONTELEONE, P.; FUSCHINO, A.; NOLFE, G.; MAJ, M. Temporal relationship between melatonin and cortisol responses to nighttime physical stress in humans. **Psychoneuroendocrinology**, v. 17, n. 1, p. 81–6, 1992.

MOORE, K. L.; DALLEY, A. F.; AGUR, A. M. R. **Anatomia orientada para a clínica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

MOOREN, F. C.; BLÖMING, D.; LECHTERMANN, A.; LERCH, M.M.; VÖLKER, K. Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. **Journal of applied physiology**, v. 93, n. 1, p. 147–53, 2002.

MORGAN, J. A.; CORRIGAN, F.; BAUNE, B. T. Effects of physical exercise on central nervous system functions: a review of brain region specific adaptations. **Journal of molecular psychiatry**, v. 3, n. 1, p. 3, jan. 2015.

MOSAVAT, M.; MOHAMED, M.; MIRSANJARI, M. O. Effect of Exercise on Reproductive Hormones in Female Athletes. **International Journal of Sport and Exercise Science**, v. 5, n. 1, p. 7–12, 2013.

MYNARSKI, W.; CHOLEWA, J.; ROZPARA, M.; BOREK, Z.; STROJEK, K.; NAWROCKA, A. Recommendations for health-enhancing physical activities in type 2 diabetes patients. **Journal of Physical Therapy Science**, v. 27, n. 8, p. 2419–2422, ago. 2015.

NAKAMURA, Y.; TAMURA, H.; TAKAYAMA, H.; KATO, H. Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. **Fertility and Sterility**, v. 80, n. 4, p. 1012–1016, 2003.

NAZEM, T. G.; ACKERMAN, K. E. The Female Athlete Triad. **Sports Health: A Multidisciplinary Approach**, v. 4, n. 4, p. 302–311, 2012.

- NIEMAN, D. C. Immune response to heavy exertion. **Journal of applied physiology**, v. 82, n. 5, p. 1385–1394, 1997.
- NILES, L.; WANG, J.; SHEN, L.; LOBB, D.K.; YOUNGLAI, E.V. Melatonin receptor mRNA expression in human granulosa cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 156, n. 1-2, p. 107–110, 1999.
- OBERT, P.; STECKEN, F.; COURTEIX, D.; LECOQ, A.M.; GUENON, P. Effect of long-term intensive endurance training on left ventricular structure and diastolic function in prepubertal children. **International journal of sports medicine**, v. 19, n. 2, p. 149–54, 1998.
- OLIVEIRA, F. P. Inserção da mulher no ambiente desportivo. **Arquivos em Movimento**, v. 2, n. 1, p. 1–10, 2006.
- OLIVEIRA, G.; CHEREM, E. H. L.; TUBINO, M. J. G. A inserção histórica da mulher no esporte. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 16, n. 2, p. 117–125, 2009.
- ONAKOMAIYA, M. M.; PORTER, D.M.; OBERLANDER, J.G.; HENDERSON, L.P. Sex and exercise interact to alter the expression of anabolic androgenic steroid-induced anxiety-like behaviors in the mouse. **Hormones and Behavior**, v. 66, n. 2, p. 283–297, jul. 2014.
- OSTROWSKI, K.; OHDE, T.; ASP, S.; SCHJERLING, P.; PEDERSEN, B.K. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. **The Journal of physiology**, v. 515 ( Pt 1, p. 287–291, 1999.
- OTIS, C.; DRINKWATER, B.; JOHNSON, M.; LOUCKS, A.; WILMORE, J. ACSM Position Stand: The Female Athlete Triad. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 29, n. 5, p. 1–9, 1997.
- PANZAN, M. Q.; JUNIOR, J.M.; DA MOTTA, E.L.; HAAPALAINEN, E,F,;; JESUS SIMÕES, M.; BAPTISTA, H.A. HAIDAR, M.A.; BARACAT, E.C. Metoclopramide-induced hyperprolactinaemia caused marked decline in pinopodes and pregnancy rates in mice. **Human reproduction**, v. 21, n. 10, p. 2514–20, 2006.
- PARDINI, D. P. Alterações Hormoanis da mulher Atleta. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 45, n. 1, p. 343–351, 2001.
- PARK, K.S.; LEE, M.G. Effects of unaccustomed downhill running on muscle

damage, oxidative stress, and leukocyte apoptosis. **Journal of exercise nutrition & biochemistry**, v. 19, n. 2, p. 55–63, jun. 2015.

PRATA LIMA, M. F.; BARACAT, E. C.; SIMOES, M. J. Effects of melatonin on the ovarian response to pinealectomy or continuous light in female rats: similarity with polycystic ovary syndrome. **Braz.J.Med.Biol.Res.**, v. 37, n. 7, p. 987–995, 2004.

PUDER, J. J.; MONACO, S.E.; SEN GRUPA, S.; WANG, J.; FERIN, M.; WARREN, M.P. Estrogen and exercise may be related to body fat distribution and leptin in young women. **Fertility and Sterility**, v. 86, n. 3, p. 694–699, 2006.

RAFF, H.; LEVITZKY, M. G. **Fisiologia Médica**. Porto Alegre: McGraw-Hill., 2012.

REIFFENSTUHL, G.; PLATZER, W.; PAUL-GEORGE, K. **Operações Vaginais: Anatomia Cirúrgica e Técnica**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1999.

REILLY, T.; ROBINSON, G.; MINORS, D. S. Some circulatory responses to exercise at different times of day. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 16, n. 5, p. 477–482, 1984.

REITER, R.J.; ROSALES-CORRAL, S.A.; MANCHESTER, L.C.; TAN, D.X. Peripheral Reproductive Organ Health and Melatonin: Ready for Prime Time. **International journal of Molecular Science**, v. 14, n. 4, p. 7231-7272, 2013.

REITER, R. J.; TAN, D.X.; MANCHESTER, L.C.; PAREDES, S.D.; MAYO, J.C.; SAINZ, R.M. Melatonin and reproduction revisited. **Biology of reproduction**, v. 81, n. 3, p. 445–456, 2009.

ROCHA, R.M.P.; MATOS, M.H.T.; LIMA, L.F.; SARAIVA, M.V.A.; ALVES, A.M.C.V.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Melatonina e reprodução animal: Implicações na Fisiologia Ovariana. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 2, p. 147–157, 2011.

RODRIGUES DA CONCEIÇÃO, R.;SIMÃO, R.; SILVEIRA, A.L.B.; SILVA, G.C.; NOBR, M.; SALERMO, V.P.; NOVAES, J. Acute Endocrine Responses to Different Strength Exercise Order in Men **Journal of Human Kinetics**, v. 44, n. 44, p. 111–120, 2014.

RONKAINEN, H.; VAKKURI, O.; KAUPPILA, A. Effects of physical exercise on the serum concentration of melatonin in female runners. **Acta Obstet Gynecol Scand.**, v. 65, p. 827–829, 1986.

RÖNNBERG, L.; KAUPPILA, A.; LEPPÄLUOTO, J.; MARTIKAINEN, H.; VAKKURI, O. Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 71, n. 2, p. 493–496, 1990.

ROSSI, L.; TIRAPAGUI, J. Aspectos atuais sobre exercício físico, fadiga e nutrição. **Rev Paul Educ Fis**, v. 13, n. 1, p. 67–82, 1999.

ROY, D.; ANGELINI, N.L.; FUJIEDA, H.; BROWN, G.M.; BELSHAM, D.D. Cyclical regulation of GnRH gene expression in GT1-7 GnRH-secreting neurons by melatonin. **Endocrinology**, v. 142, n. 11, p. 4711–20, 2001.

RUSHALL, B. S.; BUSCH, J. D. Hematological responses to training in elite swimmers. **Canadian Journal Of Applied Sport Sciences Journal Canadien Des Sciences Appliquees Au Sport**, v. 5, n. 3, p. 164–169, 1980.

SANTOS, R. V. T.; CAPERUTO, É. C.; COSTA ROSA, L. F. B. P. Efeitos do aumento na sobrecarga de treinamento sobre parâmetros bioquímicos e hormonais em ratos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 12, n. 3, p. 145–149, 2006.

SERRANO, E.; VENEGAS, C.; ESCAMES, G.; SANCHEZ-MUÑOZ, C.; ZABALA, M.; PUERTAS, A.; DE HARO, T.; GUTIERREZ, A.; CASTILLO, M.; ACUNA-CASTROVIEJO, D. Antioxidant defence and inflammatory response in professional road cyclists during a 4-day competition. **Journal of sports sciences**, v. 28, n. 10, p. 1047–1056, 2010.

SHIMOJO, G. L.; PALMA, R.K.; BRITO, J.O.; SANCHES, I.C.; IRIGOYEN, M.C.; DE ANGELIS, K. Dynamic resistance training decreases sympathetic tone in hypertensive ovariectomized rats. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 48, p. 523–527, 2015.

SILIANO, M. R.; LIMA, E.; VALENTE, S.G.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G.; CAVALHEIRO, E.A.; ARIDA, R.M.; AMADO, D. Effect of Aerobic Physical Exercise in Pinealectomized Animals Submitted to the Pilocarpine Model of Epilepsy. **Clinical Neurophysiology**, p. 63–68, 2006.

SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R.; VAN DEN HURK, R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis.

**Theriogenology**, v. 71, n. 8, p. 1193–1208, 2009.

SIM, M.; DAWSON, B.; LANDERS, G.; SWINKELS, D.W.; TJALSMA, H.; YEAP, B.B.; TRINDER, D.; PEELING, P. Oral contraception does not alter typical post-exercise interleukin-6 and hepcidin levels in females. **Journal of Science and Medicine in Sport**, v. 18, p. 8–12, 2015.

SKRINAR, G. S.; BULLEN, B.A.; REPERT, S.M.; PEACHEY, S.E.; TURNBULL, B.A.; MACARTHUR, J.W. Melatonin response to exercise training in women. **J.Pineal Res.**, v. 7, n. 2, p. 185–194, 1989.

SLOMINSKI, R. M.; REITER, R.J.; SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N.; OSTROM, R.S. SLOMINSKI, A.T. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 351, n. 2, p. 152–166, 2012.

SOARES, J.M.; MASANA, M.I.; ERŞAHIN, C.; DUBOCOVICH, M.L. Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 306, n. 2, p. 694–702, 2003.

SOARES JÚNIOR, J. M.; HOLANDA, F. S. DE; BARACAT, E. C. Melatonina e puberdade: quais as evidências? **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, n. 10, p. 483–485, 2008.

STRUDER, H.K.; STRUDER, H.K.; HOLLMANN, W.; PLATEN, P.; DUPERLY, J.; FISCHER, H.G.; WEBER, K. Alterations in plasma free tryptophan and large neutral amino acids do not affect perceived exertion and prolactin during 90 min of treadmill exercise. **International Journal os Sports Medicine**, v. 17, n. 2, p. 73–79, 1996.

STRUDER, H. K.; HOLLMANN, W.; PLATEN, P.; WOSTMANN, R.; FERRAUTI, A.; WEBER, K. Effect of exercise intensity on free tryptophan to branched-chain amino acids ratio and plasma prolactin during endurance exercise. **Canadian journal of applied physiology**, v. 22, n. 3, p. 280–291, 1997.

SUZUI, M.,KAWAI,T.; KIMURA, H.; TAKEDA, K.; YAGITA, H.; OKUMURA, K.; SHEK, P.N.; SHEPHARD, R.J. Natural killer cell lytic activity and CD56(dim) and CD56(bright) cell distributions during and after intensive training. **Journal of applied physiology**, v. 96, n. 6, p. 2167–2173, 2004.

TAKAHASHI, K.; MURAKAMI, N.; HAYAFUJI, C.; SASAKI, Y.K. Further evidence

that circadian rhythm of blinded rat pups is entrained by the nursing dam. **The American journal of physiology**, v. 246, n. 3 Pt 2, p. R359–63, 1984.

TAMURA, H.; NAKAMURA, Y.; KORKMA, A.; MANCHESTER, L.C.; TAN, D.X. SUGINO, N.; REITER, R.J. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertility and sterility**, v. 92, n. 1, p. 328–43, 2009.

TENORIO, F. D.; SIMOES, M.J.; TEIXEIRA, V.W.; TEIXEIRA, A.A. Effects of melatonin and prolactin in reproduction : review of literature. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 61, n. 3, p. 269–274, 2015.

THRIFT, A.P.; XIAO L.; PATEL, S.; TWOROGER, S. S.; MCTIERNAN, A.; DUGGAN, C. Effects of physical activity on melatonin levels in previously sedentary men and women. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, v. 23, n. 8, p. 1696–9, ago. 2014.

URHAUSEN, A; GABRIEL, H.; KINDERMANN, W. Blood hormones as markers of training stress and overtraining. *Sports medicine*, v. 20, n. 4, p. 251–276, 1995.

UUSITALO, A.L.;HUTTUNEN, P.; HANIN, Y.;UUSITALO, A.J.;RUSKO, H.K. Hormonal responses to endurance training and overtraining in female athletes. **Clinical journal of sport medicine : official journal of the Canadian Academy of Sport Medicine**, v. 8, n. 3, p. 178–186, 1998.

VALDES, A.V.; NUNES, H.M.P.; RODRIGUES, C.; GUTIERREZ, A.J.V. **Embriologia Humana**. Havana: Ciencias Medicas, 2010.

VAN REETH, O.; STURIS, J.; BYRNE, M.M.; BLACKMAN, J.D.; L'HERMITE-BALÉRIAUX, M.; LEPROULT, R.; OLINER, C.; REFETOFF, S.; TUREK, F.W.; VAN CAUTER, E. Nocturnal exercise phase delays circadian rhythms of melatonin and thyrotropin secretion in normal men. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 266, n. 6, pt1, p. E964–974, 1994.

VOGT, T.; HERPERS, R.; ASKEW, C.D.; SCHERFGEN, D.; STRÜDER, H.K.; SCHNEIDER, S. Effects of Exercise in Immersive Virtual Environments on Cortical Neural Oscillations and Mental State. **Neural plasticity**, v. 2015, p. 523–540, jan. 2015.

VOORDOUW, B.C.; EUSER, R.; VERDONK, R.E.; ALBERDA, B.T.; DE JONG, F.H.; DROGENDIJK, A.C.; FAUSER, B.C.; COHEN, M. Melatonin and melatonin-progestin



combinations alter pituitary-ovarian function in women and can inhibit ovulation. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 74, n. 1, p. 108–17, 1992.

VRANG, N.; MROSOVSKY, N.; MIKKELSEN, J. D. Afferent projections to the hamster intergeniculate leaflet demonstrated by retrograde and anterograde tracing. **Brain research bulletin**, v. 59, n. 4, p. 267–88, 2003.

WARREN, M. P.; PERLROTH, N. E. The effects of intense exercise on the female reproductive system. **Journal of Endocrinology**, v. 170, n. 1, p. 3–11, 2001.

## CAPÍTULO II

### **Efeito do treinamento aeróbico intenso sobre os níveis de melatonina, cortisol e hormônios sexuais em ratas**

Belisa Duarte Ribeiro de Oliveira<sup>ab</sup>, Carolline Guimarães D'Assunção<sup>b</sup>, Aline Ferreira da Silva Mariano, Vitor Caiaffo Brito<sup>b</sup>, Valeria Wanderley Teixeira<sup>b</sup>, Álvaro Aguiar Coelho Teixeira<sup>b\*</sup>

<sup>a</sup> Faculdade Asces, Caruaru, Pernambuco, Brasil

<sup>b</sup> Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil

\*Autor para correspondência: Álvaro Aguiar Coelho Teixeira- UFRPE-DMFA.

Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois Irmãos-Recife-PE-Brazil. CEP 52171-900.

Tel. +55 81 33206389

E-mail: [alvaro@dmfa.ufrpe.br](mailto:alvaro@dmfa.ufrpe.br) (AAC Teixeira)

**Resumo:** O comportamento dos níveis de hormônios sexuais, prolactina, melatonina e cortisol nas funções mediadoras do sistema reprodutor feminino de mulheres praticantes de exercício físico intenso ainda não está completamente elucidado. Assim, avaliou-se a interferência do exercício físico intenso nos níveis desses hormônios em ratas submetidas a um protocolo de exercício intenso crônico (natação). Utilizou-se 40 ratas distribuídas nos seguintes grupos: GI (animais sem atividade física), GII (Animais sedentários submetidos ao exercício agudo no dia da eutanásia), GIII (Animais treinados mantidos em repouso no dia da eutanásia) e GIV (Animais treinados submetidos ao exercício agudo no dia da eutanásia). Os níveis dos hormônios estrógeno, progesterona, prolactina e cortisol foram dosados pelo método ELISA, através de kits comerciais (Sigma-Aldrich®). Os níveis de melatonina no plasma foram determinados por RIA utilizando o kit 1-25 RIA GmbH D 35037, DDV BIOCHEMIE®. A concentração plasmática de estrógeno, progesterona e prolactina comportaram-se de forma semelhante, com maiores valores ( $p < 0,05$ ) nos grupos GIII e GIV, sem diferença entre eles. Em relação à melatonina, as mais altas concentrações ( $p < 0,05$ ) foram encontradas nos grupos GIII e GIV e a mais baixa ( $p < 0,05$ ) no GII. Este último grupo apresentou as mais altas dosagens de cortisol ( $p < 0,05$ ) quando comparamos aos demais. Assim, conclui-se que o exercício intenso realizado agudamente tem um maior poder de depleção dos hormônios sexuais, prolactina e da melatonina e exacerbação do cortisol, enquanto que um protocolo de exercício intenso crônico parece exercer um efeito contrário, sugerindo uma adaptação fisiológica ao exercício.

**Palavras-chave:** Natação, hormônios sexuais, ratas, melatonina, cortisol.

## 1. Introdução

A atividade física está se tornando cada vez mais popular no mundo e vem sendo indicada para a prevenção de várias doenças sistêmicas presentes em ambos os sexos (HERRMANN et al., 2015; MYNARSKI et al., 2015; SHIMOJO et al., 2015; VOGT et al., 2015). Apesar da comprovação dos benefícios do exercício físico moderado na saúde da mulher (HAN; MIDDLETON; CROWTHER, 2012; CAMHI et al., 2015; EL-KHOURY et al., 2015; JAGO et al., 2015), autores tem mostrado que o exercício físico extenuante regular pode resultar em várias perturbações menstruais, incluindo atraso da menarca, ciclos anovulatórios, amenorreia secundária e fase lútea inadequada ou curta em atletas de alto rendimento (HOCH et al., 2012; MIRI et al., 2014). Essas mulheres apresentam baixas concentrações circulantes de gonadotrofinas, com pulsatilidade anormal e respostas hormonais exageradas em testes de liberação de hormônio luteinizante (LH), fato este que sugere que a amenorreia é mediada ao nível do hipotálamo (NIEMAN, 1997).

Sabe-se que outras substâncias sistêmicas podem influenciar a liberação pulsátil de gonadotrofina e estar envolvidas nestas mudanças induzidas pelo exercício físico. Como exemplo, a naloxona, opiáceo antagonista que causa alterações na amplitude de hormônio luteinizante e nas pulsações hormonais do folículo estimulante (EVANS; CURRIE; RAWLINGS, 1992), o cortisol, que tem efeitos negativos na produção de hormônios sexuais (CHATARD et al., 2002; KRÜGER et al., 2011) e a melatonina, que em doses elevadas, e em combinação com a progesterona, é capaz de suprimir a ovulação, possivelmente interferindo na liberação de LH (VOORDOUW et al., 1992; FERNANDO; ROMBAUTS, 2014).

Pesquisas sugerem também que o aumento da incidência de alterações endócrino-reprodutivas induzidas pelo exercício em mulheres atletas podem ser influenciadas pelo aumento das cargas de treinamento, em particular durante as fases de intensa competição (HOWLETT et al., 1984; MALINA et al., 2013). Existem relatos que além dos efeitos

hormonais, o exercício físico intenso pode provocar perturbações em concentrações de leucócitos (MOOREN et al., 2002; KRÜGER; MOOREN, 2014; PARK; LEE, 2015), com efeitos intensidade-dependentes e variáveis também com a associação da liberação de hormônios associados ao stress nessas atividades, como o cortisol (KALANTARIDOU et al., 2010; KRÜGER et al., 2011).

Apesar das alterações hormonais sofridas pela mulher submetida ao exercício físico intenso e sua possível influência no ciclo ovariano serem documentadas em alguns estudos relativos ao estrogênio, cortisol, hormônio do crescimento (GH) e até testosterona (JAHREIS et al., 1991; ELIAKIM; NEMET, 2013; MIRI et al., 2014; SIM et al., 2015), relatos a respeito dos níveis de melatonina (DAVIS et al., 2014) e seu papel mediador (e possivelmente inibitório) no sistema reprodutivo dessas mulheres ainda não estão completamente elucidados. Assim, o objetivo deste estudo foi esclarecer a interferência do exercício físico intenso nos níveis de melatonina, cortisol, prolactina e hormônios sexuais em ratas.

## **2. Materiais e Métodos**

### *2.1. Animais*

Foram utilizadas 40 ratas albinas da linhagem *Wistar* com 90 dias de idade pesando aproximadamente  $200 \pm 30$  g provenientes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com temperatura ambiente de  $23 \pm 1$  °C e umidade controladas sob regime de iluminação cíclica (12h escuro, 12h claro) com intensidade de luz  $\leq 100$ LUX. Em todos os protocolos experimentais os animais foram conduzidos de acordo com o Comitê

de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA/UFRPE), sob protocolo de número 111/2014.

## 2.2. *Dieta*

Neste estudo foi utilizada uma dieta sólida padrão para roedores (PRESENCE®) e água filtrada *ad libitum* para todos os animais dos grupos experimentais.

## 2.3. *Desenho Experimental*

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 seguintes grupos experimentais: G1 (n=10) - SEDENTÁRIO (S) - Animais sem atividade física; G2 (n=10) - SEDENTÁRIO AGUDO (SA): Animais sedentários submetidos ao exercício agudo no dia da eutanásia; G3 (n=10) - TREINADO REPOUSO (TR): Animais treinados mantidos em repouso no dia da eutanásia; G4 (n=10)- TREINADO AGUDO (TA): Animais treinados submetidos ao exercício agudo no dia da eutanásia.

## 2.4. *Protocolo de treinamento*

O treinamento dos animais foi baseado em um protocolo de natação (VIEIRA et al.,1988) com água aquecida por um sistema central de resistência elétrica e temperatura de  $31 \pm 2$  °C. O período de treinamento foi de seis semanas, cinco dias por semana, 60 minutos por dia. Durante a primeira semana, os animais iniciaram um treinamento progressivo visando sua adaptação ao meio líquido. No primeiro dia da segunda semana de treinamento foi utilizado o protocolo de teste progressivo para determinação do limiar anaeróbio metabólico e sobrecarga inicial de

treinamento, e o segundo teste foi realizado no primeiro dia da quinta semana para a correção da sobrecarga de treinamento (ROGERO et al., 2002).

No último dia de experimento, os animais dos grupos SA e TA foram submetidos ao exercício até a exaustão. O tempo de exaustão foi caracterizado no momento em que o animal não conseguiu mais manter as narinas fora da água durante 10 segundos.

#### *2.4.1. Determinação do limiar anaeróbico metabólico*

O protocolo de teste consistiu de exercício agudo de natação com sobrecarga progressiva, sob a forma de pesos atados à cauda do animal, correspondendo a 4, 5, 6, 7 e 8% do seu peso corporal, durante períodos de três minutos de natação intercalados com um minuto de repouso. Visando minimizar qualquer tipo de estresse decorrente da manipulação dos animais e da mudança de ambiente, foi realizado um período de aquecimento com duração de 20 minutos sem sobrecarga.

Coletas de sangue a partir da veia caudal foram realizadas aos 10 e 20 minutos do período de aquecimento e nos períodos de sobrecarga. O sangue foi coletado por meio de capilares heparinizados e, posteriormente, realizada a dosagem de lactato sanguíneo através de um aparelho eletroquímico (Accusport<sup>®</sup> com fitas Boehring Mannheim<sup>®</sup>) (HECK et al., 1985). O limiar anaeróbico metabólico foi determinado a partir da inflexão da curva de concentração de lactato sanguíneo pela sobrecarga utilizada. O ponto de inflexão da curva foi considerado como a carga do limiar anaeróbico metabólico.

#### *2.5. Eutanásia e Dosagem Hormonal*

As fêmeas foram anestesiadas com cloridrato de quetamina (80 mg/kg) e xilazina (6,0 mg/kg) por via intramuscular. Após a coleta hormonal, foi realizada a eutanásia utilizando-se com uma sobredose de pentobarbital sódico aplicados por via intraperitoneal.

A coleta de sangue foi executada em todos os grupos, pela manhã, imediatamente após a anestesia, por punção cardíaca, e retirados 2,5 mL de sangue armazenado em tubo anticoagulante. O material foi rapidamente centrifugado sob refrigeração (4°C) e o soro congelado a -20 °C até a dosagem hormonal. Os níveis dos hormônios estrógeno (ADI-900-100), progesterona (ADI-900-011), prolactina (25-PROHU-E01) e cortisol (SE120082) foram dosados utilizando-se o método Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), através de kits comerciais (Sigma-Aldrich®). Os níveis de melatonina no plasma foram determinados em pg/mL por radioimunoensaio (RIA) utilizando o kit de dosagem de melatonina (1-25 RIA GmbH D 35037, DDV BIOCHEMIE®). Os protocolos de dosagem foram seguidos de acordo com as recomendações dos fabricantes e todas as fêmeas estavam em fase do estro.

## *2.6. Análise estatística*

Para a comparação das dosagens hormonais foi realizada a análise de variância. Quando significativa, esta foi complementada pelo teste de Comparações Múltiplas de Tukey e Kramer e adotado o nível de significância de 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).

## **3. Resultados**

As avaliações das concentrações plasmáticas dos hormônios constam nos gráficos a seguir. Na figura 1 observamos a concentração plasmática de estrógeno das fêmeas dos grupos experimentais. Não houve diferença na concentração plasmática de estrógeno entre os grupos treinados (TR e TA), porém a sua concentração foi significativamente maior nesses dois grupos



quando comparamos ao grupo controle (S) e ao grupo sedentário submetido ao exercício agudo (SA)( $p < 0,05$ ). As fêmeas do grupo SA também apresentaram concentração significativamente menor do que as fêmeas do grupo S.

As concentrações plasmáticas de progesterona comportaram-se de forma semelhante às do estrógeno, com as maiores concentrações nas fêmeas dos grupos treinados (TR e TA) (Figura 2). Novamente, os animais não treinados submetidos ao treinamento agudo no dia da eutanásia apresentaram menores níveis do hormônio quando comparados aos outros grupos.

A prolactina também apresentou o mesmo comportamento do estrógeno e progesterona (Figura 3), onde evidenciou-se menor concentração nas fêmeas do grupo sedentário submetido ao exercício agudo (SA) quando comparado aos demais grupos. Os dados apenas não se assemelham aos resultados do estrogênio e progesterona em relação entre os dois grupos treinados (TR e TA) e o grupo S.

Com relação às concentrações de melatonina foi verificado que houve uma redução significativa nas fêmeas do grupo sedentário submetido ao exercício agudo (SA) em relação às fêmeas dos demais grupos. Entretanto, nas fêmeas treinadas (TR e TA) observaram-se níveis elevados deste hormônio, embora as fêmeas do grupo TA tenham apresentado valores similares ao grupo S (Figura 4).

Para o cortisol a análise estatística revelou um aumento significativo desse hormônio nas fêmeas do grupo SA em comparação as fêmeas dos demais grupos experimentais. Entretanto, foi evidenciado que as fêmeas treinadas TR e TA mostraram concentrações menores, porém as do grupo TA se assemelharam as concentrações desse hormônio quando comparado com as fêmeas do grupo S, enquanto que as fêmeas do grupo TR apresentaram as menores concentrações.

#### 4. Discussão

As concentrações de melatonina apresentaram-se de forma semelhante aos hormônios sexuais, sendo mais altas nas fêmeas submetidas ao exercício físico intenso crônico. Isso contradiz alguns estudos que relatam que esse hormônio teria um papel mediador na diminuição da função ovariana hormônio-dependente em mulheres praticantes de exercício físico intenso cronicamente (JAHREIS et al., 1991; ELIAKIM; NEMET, 2013; MIRI et al., 2014; DAVIS et al., 2014; SIM et al., 2015), porém corrobora com outros achados (CARR et al., 1981; RONKAINEN; VAKKURI; KAUPPILA, 1986; KNIGHT et al., 2005; LEE; KIM; KIM, 2014), que encontraram um aumento crescente dos níveis de melatonina ao longo de um programa de exercícios intensos. No presente estudo, é provável que a submissão dos animais a um programa de exercício intenso tenha resultado numa alteração na fisiologia do sistema endócrino. Autores (BUXTON et al., 1997; REITER et al., 2009; ESCAMES et al., 2012) acreditam que o estresse induzido pelo exercício pode induzir a essa elevação na concentração plasmática da melatonina, especialmente em atletas durante e após o desempenho ou treinamento de endurance, provavelmente porque que esta estratégia adaptativa permite ao organismo regular com eficiência o estresse oxidativo intracelular e prevenir uma exacerbação de indução de citocinas pró-inflamatórias causadas por danos moleculares em decorrência de exercício vigoroso.

Resultados semelhantes foram observados nos estudos de Serrano et al. (2010), em que ciclistas de alto rendimento tiveram os níveis de melatonina diurnas aumentadas após treinamento vigoroso crônico. É provável que uma resposta adaptativa às sobrecargas físicas, tenham regulado de forma eficiente o seu estresse oxidativo, aumentando gradativamente seus níveis de melatonina, levando-nos a crer que enquanto o treinamento não causa qualquer alteração crônica na secreção de melatonina, o exercício físico aumenta a melatonina no sangue temporariamente (RONKAINEN; VAKKURI; KAUPPILA, 1986).

Contrariamente, embora o presente estudo tenha apresentado maiores níveis de melatonina plasmática nos grupos treinados cronicamente, outros estudos mostraram um aumento deste hormônio logo após o exercício realizado de forma aguda seguido de uma diminuição ou nenhuma alteração da sua secreção com o treinamento regular e vigoroso (ARIKAWA et al., 2013; DAVIS et al., 2014; THRIFT et al., 2014). Esta variabilidade na resposta induzida pelo exercício sobre a secreção de melatonina pode ser dependente de vários fatores. Além de fase circadiana em que o exercício foi efetuado, diferenças entre os estudos nas condições de luz (presença ou ausência), do tipo, duração e intensidade do exercício, bem como locais de coleta de melatonina (plasma ou saliva), além dos seus métodos de medição (RIA ou ELISA) podem ter influenciado nos resultados, e, conseqüentemente, dificultado a comparação dos dados (REILLY; ROBINSON; MINORS, 1984; SKRINAR et al., 1989; BUXTON et al., 1997; MARRIN et al., 2011; MCPHERSON et al., 2011). Infelizmente, combinações de variáveis semelhantes às nossas são escassas para tirarmos conclusões sobre qualquer um desses potenciais modificadores, porém, estudos que especificamente utilizaram mulheres ou fêmeas relataram que o exercício físico aumentou a concentração de melatonina, tanto na saliva quanto no plasma (KNIGHT et al., 2005; MARRIN et al., 2011; LI et al., 2012).

O potencial da melatonina em mediar o efeito protetor da atividade física intensa crônica sobre a função ovariana parece ficar mais claro quando associamos a sua maior dosagem às maiores concentrações de hormônios sexuais nos grupos treinados cronicamente. Na mesma correlação, também encontramos menores concentrações de melatonina associadas às menores concentrações de estrógeno e progesterona nos grupos não treinados submetidos ao exercício intenso agudo.

O exercício físico vem sendo estudado há muitos anos como um dos fatores influentes na alteração das concentrações de hormônios sexuais em mulheres. Estudos observacionais encontraram uma associação inversa entre atividade física e os níveis circulantes de estrogênio

(JAHREIS et al., 1991; ARENA et al., 1995; FERNÁNDEZ-GARCIA et al., 2002; MIRI et al., 2014), podendo este efeito ser mediado pela diminuição da massa de gordura (PUDER et al., 2006; COOPER et al., 2007), a principal fonte de estrogénios em mulheres.

Autores citam também a associação dos distúrbios hormonais com a baixa ingestão de energia, expressada pela interrupção do ciclo menstrual antes da menopausa (DE CRÉE, 1998), especialmente quando associado ao exercício físico intenso. No presente estudo, o baixo nível de gordura corporal e a baixa ingestão de energia não foram observados, fatores que retiram da responsabilidade essas variáveis como fatores causadores das alterações hormonais. Esse fato corrobora com os achados de uma revisão sistemática recente (ENNOUR-IDRISSI; MAUNSELL; DIORIO, 2015), que ao isolar o efeito específico do exercício físico, ainda que intenso, nas dosagens dos hormônios sexuais, conclui que este é relativamente modesto, e provavelmente não clinicamente significativo, se não associado com outros fatores, metabólicos ou hormonais.

Apesar de participarem de um protocolo de exercícios físicos intensos, é possível que, a longo prazo, o mecanismo adaptativo do metabolismo e a capacidade anti-oxidativa ovariana da melatonina (MACCHI; BRUCE, 2004; AGUILÓ et al., 2005) das fêmeas treinadas cronicamente tenham diminuído os efeitos da alta intensidade do exercício numa possível queda hormonal do estrógeno e progesterona (como esperado), fato que aconteceu com as ratas submetidas a um exercício físico intenso de forma aguda. Nesse caso, o níveis aumentados de cortisol no grupo não treinado submetido ao exercício intenso agudo justificam a queda do estrógeno e da progesterona neste grupo. Assim, como em homens corredores de maratona, que apresentam menores concentrações de testosterona durante e após o estresse agudo do exercício ou à fadiga provocada pelo exercício extenuante (URHAUSEN; GABRIEL; KINDERMANN, 1995; SANTOS et al., 2006), supomos que o aumento do cortisol, em um grupo não treinado previamente, pode ser suficientemente capaz de diminuir os níveis dos hormônios sexuais por

inibir a secreção de LH e GnRH e, conseqüentemente, inibir a secreção de estrogênio dos ovários e a biossíntese de progesterona (WARREN; PERLROTH, 2001).

Os resultados das concentrações de prolactina demonstram claramente que houve uma diminuição das concentrações de desse hormônio após o exercício físico agudo em fêmeas não treinadas. O mecanismo fisiológico que induz tal resposta no exercício agudo e não no crônico ainda é incerto, mas em relação ao treinamento várias possibilidades viáveis existem. Primeiro, há um aumento da resposta glicocorticóide, que é reforçada com o exercício, e que pode estimular a liberação de prolactina (fato confirmado pelo aumento do cortisol no mesmo grupo) (FREEMAN; KANYICKA; LERANT, 2000). Um aumento de duas a quatro vezes nas concentrações basais de glicocorticóides (cortisol) é altamente provável com o exercício físico intenso (HACKNEY; DAVIS; LANE, 2015), como foi realizada neste estudo.

Em associação com a progesterona e com concentrações inversamente associadas, nossos achados apoiam os resultados de Panzan et al. (2006) , que encontraram uma diminuição na produção de progesterona em ratas com hiperprolactinemia. Os mesmos autores verificaram também que houve uma diminuição no número de implantes embrionários em ratas com hiperprolactinemia. Possivelmente, em ambos os casos, reforça-se a ideia de que a prolactina pode determinar a proliferação celular por ativação de genes ou pelo bloqueio do sinal celular de diferenciação celular (TENORIO et al., 2015).

Além disso, o hormônio liberador de tirotropina (TRH) e o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) podem estimular a liberação de prolactina (FISCHER; HOLLMANN; DE MEIRLEIR, 1991; MIYAUCHI; NANJO; OTSUKA, 1992). Estes agentes podem estar aumentados com o exercício físico intenso, e algumas evidências sugerem que o TRH pode ser ligeiramente elevado durante a noite, após o exercício durante o dia. Este fato, porém, não pôde ser observado em nosso estudo, pois não houve medição hormonal noturna destes e de outros hormônios que poderiam ser influenciados pelo ritmo circadiano. Assim, conclui-se que o exercício intenso

realizado agudamente tem um maior poder de depleção dos hormônios sexuais, prolactina e da melatonina e exacerbação do cortisol, enquanto que um protocolo de exercício intenso crônico parece exercer um efeito contrário, sugerindo uma adaptação fisiológica ao exercício.

## 5. Referências

- AGUILÓ, A.;TAULERA, P.;FUENTESPINAB, E; TURA, J.A.; CORDOVAC, A.; PONS, A. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. **Physiology & behavior**, v. 84, n. 1, p. 1–7, 2005.
- ARENA, B. MAFFULLI, N.; MAFFULLI, F.; MORLEO, M. A. Reproductive hormones and menstrual changes with exercise in female athletes. **Sports Med.**, v. 19, n. 4, p. 278–287, 1995.
- ARIKAWA, A.Y.; THOMAS, W.; PATEL, S.R.; KURZER, M.S. No effect of exercise on urinary 6-sulfatoxymelatonin and catecholamines in young women participating in a 16-week randomized controlled trial. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 22, n. 9, p. 1634–1636, 2013.
- BUXTON, O. M.; L'HERMITE-BALÉRIAUX, M.; HIRSCHFELD, U.; CAUTER, E. Acute and delayed effects of exercise on human melatonin secretion. **Journal of biological rhythms**, v. 12, n. 6, p. 568–74, 1997.
- CAMHI, S. M.; CROUTER, S. E.; HAYMAN, L. L.; MUST, A.; LICHTENSTEIN, A. H. Lifestyle Behaviors in Metabolically Healthy and Unhealthy Overweight and Obese Women: A Preliminary Study. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0138548, jan. 2015.
- CARR, D. B. Plasma melatonin increases during exercise in women. **J.Clin.Endocrinol.Metab**, v. 53, n. 1, p. 224–225, 1981.
- CHATARD, J. C.; ATLAOUI, D.; LAC, G.; DUCLOS, M.; HOOPER, S.; MACKINNON, L. Cortisol, DHEA, performance and training in elite swimmers. **International Journal of Sports Medicine**, v. 23, n. 7, p. 510–515, 2002.
- COOPER, D. M.; COOPER, D.M.; RADOM-AIZIK, S.; SCHWINDT, C.; ZALDIVAR, F.J.R. Dangerous exercise: lessons learned from dysregulated inflammatory responses to physical activity. **Journal of applied physiology**, v. 103, n. 2, p. 700–709, 2007.
- DAVIS, G. R.; ETHEREDGE, C. E.; MARCUS, L.; BELLAR, D. Prolonged sleep deprivation and continuous exercise: effects on melatonin, tympanic temperature, and cognitive function. **BioMed research international**, v. 2014, p. 781863, 2014.

DE CRÉE, C. Sex steroid metabolism and menstrual irregularities in the exercising female : a review. **SPORTS MEDICINE**, v. 25, n. 6, p. 369–406, 1998.

EL-KHOURY, F.; CASSOU, B.; LATOUCHE, A.; AEGERTER, P.; CHARLES, M.; DARGENT-MOLINA, P. Effectiveness of two year balance training programme on prevention of fall induced injuries in at risk women aged 75-85 living in community: Ossébo randomised controlled trial. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 351, p. h3830, jan. 2015.

ELIAKIM, A.; NEMET, D. The Endocrine Response to Exercise and Training in Young Athletes. **Pediatric Exercise Science**, v. 25, p. 605–615, 2013.

ENNOUR-IDRISSI, K.; MAUNSELL, E.; DIORIO, C. Effect of physical activity on sex hormones in women: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Breast Cancer Research**, v. 17, n. 1, p. 139, 2015.

ESCAMES, G.; OZTURK, G.; BAÑO-OTÁLORA, B.; POZO, M.J.; MADRID, J.A.; REITER, R. J. SERRANO, E. CONCEPCIÓN, M.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Exercise and melatonin in humans: reciprocal benefits. **Journal of Pineal Research**, v. 52, n. 1, p. 1–11, 2012.

EVANS, A.C.; CURRIE, W. .; RAWLINGS, N. Effects of naloxone on circulating gonadotrophin concentrations in prepubertal heifers. **J reprod. Fert**, v. 96, p. 847–855, 1992.

FERNÁNDEZ-GARCIA, B.; LUCÍA, A.; HOYOS, J.; CHICHARRO, J.L.; RODRIGUEZ ALONSO, M.; BANDRÉS, F.; TERRADOS, N. The response of sexual and stress hormones of male pro-cyclists during continuous intense competition. **International Journal of Sports Medicine**, v. 23, n. 8, p. 555–560, 2002.

FERNANDO, S.; ROMBAUTS, L. Melatonin: shedding light on infertility? - a review of the recent literature. **Journal of Ovarian Research**, v. 7, n. 1, p. 98, 2014.

FISCHER, H. G.; HOLLMANN, W.; DE MEIRLEIR, K. Exercise changes in plasma tryptophan fractions and relationship with prolactin. **International journal of sports medicine**, v. 12, n. 5, p. 487–9, 1991.

FREEMAN, M.E.; KANYICKSKA, L.A; LERANT, A. Prolactin : Structure, Function, and Regulation of Secretion. **Physiological reviews**, v. 80, n. 4, p. 1523–1631, 2000.

HACKNEY, A.C.; DAVIS, H.C.; LANE, A.R. Exercise augments the nocturnal prolactin rise in exercise-trained men. **Therapeutic advances in endocrinology and metabolism**, v. 6, n. 5, p. 217–22, out. 2015.

HAN, S.; MIDDLETON, P.; CROWTHER, C. A. Exercise for pregnant women for preventing gestational diabetes mellitus. **The Cochrane database of systematic reviews**, v. 7, p. CD009021, jan. 2012.

HERRMANN, D.; BUCK, C.; SIOEN, I.; KOURIDE, Y.; MARILD, S.; MOLNÁR, D.; MOURATIDOU, T.; PITSILADIS, Y.; RUSSO, P.; VEIDEBAUM, T.; AHRENS, W. Impact of physical activity, sedentary behaviour and muscle strength on bone stiffness in 2–10-year-old children-cross-sectional results from the IDEFICS study. **International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity**, v. 12, n. 1, p. 112, 17 set. 2015.

HOCH, A. Z.; HERRMANN, D.; BUCK, C.; SIOEN, I.; KOURIDE, Y.; MARILD, S.; MOLNÁR, D.; MOURATIDOU, T.; PITSILADIS, Y.; RUSSO, P.; VEIDEBAUM, T.; AHRENS, W. Association Between the Female Athlete Triad and Endothelial Dysfunction in Dancers. **Clin J Sport Med**, v. 29, n. 6, p. 997–1003, 2012.

HOWLETT, T. A.; Tomlin, S.; Ngahfoong, L.; Rees, L. H.; Bullen, B. A.; Skrinar, G. S.; McArthur, J. W. Release of beta endorphin and met-enkephalin during exercise in normal women: response to training. **British medical journal**, v.288, p.1950-52, 1984.

JAGO, R.; EDWARDS, M. J.; SEBIRE, S. J.; TOMKINSON, K.; BIRD, E. L.; BANFIELD, K.; MAY, T.; KESTEN, J. M.; COOPER, A. R.; POWELL, J. E.; BLAIR, P. S. Effect and cost of an after-school dance programme on the physical activity of 11–12 year old girls: The Bristol Girls Dance Project, a school-based cluster randomised controlled trial. **International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity**, v. 12, n. 1, p. 128, 6 out. 2015.

JAHREIS, G.; KAUF, E.; FROHNER, G.; SCHIMIDT, H. E. Influence of intensive exercise on IGF1 and steroid hormones. **Growth Regulation**, v. 1, p. 95–99, 1991.

KALANTARIDOU, S. N.; ZOUMAKIS, E.; MAKRIGIANNAKIS, A.; LAVASIDIS, L. G.; VREKOUSSIS, T.; CHROUSOS, G. P. Corticotropin-releasing hormone, stress and human reproduction: An update. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 85, n. 1, p. 33–39, 2010.

KNIGHT, J. A.; THOMPSON, S.; RABOUD, J. M.; HOFFMAN, B. R. Light and exercise and melatonin production in women. **American Journal of Epidemiology**, v. 162, n. 11, p. 1114–1122, 2005.

KRÜGER, K.; AGNISCHOCK, S.; LECHTERMANN, A.; TIWARI, S.; MISHRA, M.; PILAT, C.; WAGNER, A.; TWEDDELL, C.; GRAMLICH, I.; MOOREN, F. C. Intensive resistance exercise induces lymphocyte apoptosis via cortisol and glucocorticoid receptor-dependent pathways. **Journal of applied physiology**, v. 110, n. 5, p. 1226–32, 2011.

KRÜGER, K.; MOOREN, F. C. Exercise-induced leukocyte apoptosis. **Exerc Immunol Rev**, v. 20, p. 117–134, 2014.

LEE, H.; KIM, S.; KIM, D. Effects of exercise with or without light exposure on sleep quality and hormone responses. **The Journal of Exercise Nutrition and Biochemistry**, v. 6, n. 1, p. 293–299, 11 set. 2014.



LI, Y.; ZHU, Y.; ZHANG, J.; ZHANG, X.; ZENG, Y. Biochemical Changes and Endocrine Responses in pre-competition Training in Elite Swimmers. **Biology of Sport**, v. 29, n. 1, p. 71–75, 2012.

MACCHI, M. M.; BRUCE, J. N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 25, n. 3-4, p. 177–95, 2004.

MALINA, R. M.; BAXTER-JONES, A. D. G.; ARMSTRONG, N.; BEUNEN, G. P.; CAINE, D.; DALY, R. M.; LEWIS, R. D.; ROGOL, A. D.; RUSSELL, K. Role of intensive training in the growth and maturation of artistic gymnasts. **Sports Medicine**, v. 43, p. 783–802, 2013.

MARRIN, K.; DRUST, B.; GREGSON, W.; MORRIS, C.J.; CHESTER, N.; ATKINSON, G. Diurnal variation in the salivary melatonin responses to exercise: relation to exercise-mediated tachycardia. **European journal of applied physiology**, v. 111, n. 11, p. 2707–14, 2011.

MCPHERSON, M.; JANSSEN, I.; GRUNDY, A.; TRANMER, J.; RICHARDSON, H.; ARONSON, K. J. Physical activity, sedentary behavior, and melatonin among rotating shift nurses. **Journal of occupational and environmental medicine**, v. 53, n. 7, p. 716–21, 2011.

MIRI, M.; JASHNI, H. K.; ALIPOUR, F.; KARIMI JASHNI, H.; ALIPOUR, F. Effect of exercise intensity on weight changes and sexual hormones (androstenedione and free testosterone) in female rats with estradiol valerate-induced PCOS. **Journal of ovarian research**, v. 7, n. 37, p. 2–7, jan. 2014.

MIYAUCHI, F.; NANJO, K.; OTSUKA, K. Effects of night shift on plasma concentrations of melatonin, LH, FSH and prolactin, and menstrual irregularity. **Japanese Journal of Industrial Health**, v. 34, n. 6, p. 545–550, 1992.

MOOREN, F. C.; BLÖMING, D.; LECHTERMANN, A.; LERCH, M. M.; VÖLKER, K. Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. **Journal of applied physiology**, v. 93, n. 1, p. 147–53, 2002.

MYNARSKI, W.; CHOLEWA, J.; ROZPARA, M.; BOREK, Z.; STROJEK, K.; NAWROCKA, A. Recommendations for health-enhancing physical activities in type 2 diabetes patients. **Journal of Physical Therapy Science**, v. 27, n. 8, p. 2419–24, 2015.

NIEMAN, D. C. Immune response to heavy exertion. **Journal of applied physiology**, v. 82, n. 5, p. 1385–1394, 1997.

PANZAN, M. Q.; SOARES JÚNIOR, J. M.; DA MOTTA, E. L. A.; HAAPALAINEN, E. F.; SIMÕES, M. J.; BAPTISTA, H. A.; HAIDAR, M. A.; BARACAT, EDMUND, C. Metoclopramide-induced hyperprolactinaemia caused marked decline in pinopodes and

pregnancy rates in mice. **Human reproduction**, v. 21, n. 10, p. 2514–20, 2006.

PARK, K.S.; LEE, M.G. Effects of unaccustomed downhill running on muscle damage, oxidative stress, and leukocyte apoptosis. **Journal of exercise nutrition & biochemistry**, v. 19, n. 2, p. 55–63, jun. 2015.

PUDER, J. J.; MONACO, S. E.; SEN GUPTA, S.; WANG, J.; FERIN, M.; WARREN, M. P. Estrogen and exercise may be related to body fat distribution and leptin in young women. **Fertility and Sterility**, v. 86, n. 3, p. 694–699, 2006.

REILLY, T.; ROBINSON, G.; MINORS, D. S. Some circulatory responses to exercise at different times of day. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 16, n. 5, p. 477–482, 1984.

REITER, R. J. TAN, D.; MANCHESTER, L. C.; PAREDES, S. D.; MAYO, J. C.; SAINZ, R. M. Melatonin and reproduction revisited. **Biology of reproduction**, v. 81, n. 3, p. 445–456, 2009.

RONKAINEN, H.; VAKKURI, O.; KAUPPILA, A. Effects of physical exercise on the serum concentration of melatonin in female runners. **Acta Obstet Gynecol Scand.**, v. 65, p. 827–829, 1986.

SANTOS, R.V.T.; CAPERUTO, E.C.; COSTA ROSA, L.F.B.P. Efeitos do aumento na sobrecarga de treinamento sobre parâmetros bioquímicos e hormonais em ratos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 12, n. 3, p. 145–149, 2006.

SERRANO, E.; VENEGAS, C.; ESCAMES, G.; SÁNCHEZ-MUÑOZ, C.; ZABALA, M.; PUERTAS, A.; DE HARO, T.; GUTIERREZ, A.; CASTILLO, M.; ACUNA-CASTROVIEJO, D. Antioxidant defence and inflammatory response in professional road cyclists during a 4-day competition. **Journal of sports sciences**, v. 28, n. 10, p. 1047–1056, 2010.

SHIMOJO, G. L.; PALMA, R. K.; BRITO, J. O.; SANCHES, I. C.; IRIGOYEN, M. C.; DE ANGELIS, K. Dynamic resistance training decreases sympathetic tone in hypertensive ovariectomized rats. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 48, p. 523–527, 2015.

SIM, M.; DAWSON, B.; LANDERS, G.; SWINKELS, D. W.; TJALSMA, H.; YEAP, B. B.; TRINDER, D.; PEELING, P. Oral contraception does not alter typical post-exercise interleukin-6 and hepcidin levels in females. **Journal of Science and Medicine in Sport**, v. 18, p. 8–12, 2015.

SKRINAR, G. S.; BULLEN, B. A.; REPERT, S. M.; PEACHEY, S. E.; TURNBULL, B. A.; MCARTHUR, J. W. Melatonin response to exercise training in women. **J.Pineal Res.**, v. 7, n. 2, p. 185–194, 1989.

TENORIO, F. C. A. M.; SIMÕES, M. J.; TEIXEIRA, V. W.; TEIXEIRA, A. A. Effects of melatonin and prolactin in reproduction : review of literature. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 61, n. 3, p. 269–274, 2015.

THRIFT, A. P. XIAO, L.; PATEL, S.R.; TWOROGER, S.S.; MCTIERNAN, A.; DUGGAN, C. Effects of physical activity on melatonin levels in previously sedentary men and women. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 23, n. 8, p. 1696–9, ago. 2014.

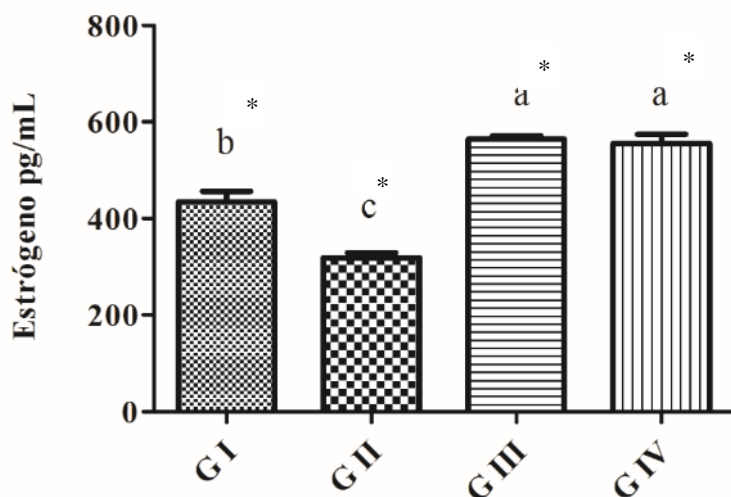
URHAUSEN, A; GABRIEL, H.; KINDERMANN, W. Blood hormones as markers of training stress and overtraining. **Sports medicine**, v. 20, n. 4, p. 251–276, 1995.

VOGT, T.; HERPERS, R. ASKEW, C. D.; SCHERFGEN, D.; STRÜDER, H. K.; SCHNEIDER, S. Effects of Exercise in Immersive Virtual Environments on Cortical Neural Oscillations and Mental State. **Neural plasticity**, v. 2015, p. 523-540, jan. 2015.

VOORDOUW, B. C.; VOORDOUW, B. C. EUSER, R.; VERDONK, R. E.; ALBERDA, B. T.; DE JONG, F. H.; DROGENDIJK, A. C.; FAUSER, B. C.; COHEN, M. Melatonin and melatonin-progestin combinations alter pituitary-ovarian function in women and can inhibit ovulation. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 74, n. 1, p. 108–17, 1992.

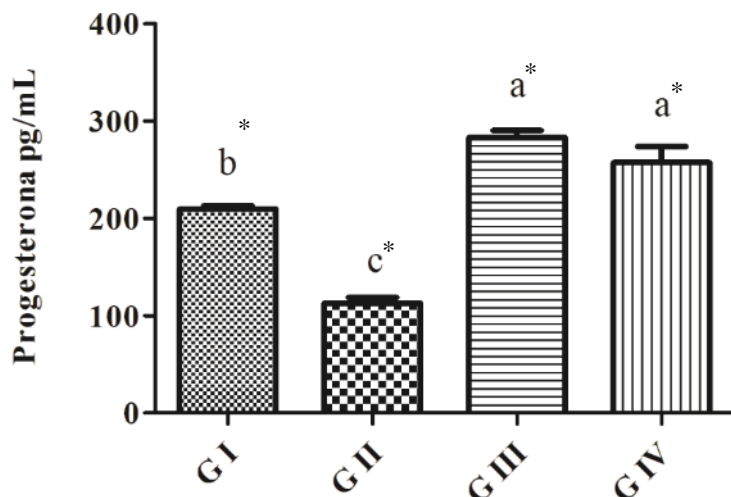
WARREN, M. P.; PERLROTH, N. E. The effects of intense exercise on the female reproductive system. **Journal of Endocrinology**, v. 170, n. 1, p. 3–11, 2001.

Figura 1 – Médias das concentrações plasmáticas dos níveis de estrógeno dos quatro grupos experimentais. GI – Sedentário, G II - sedentário submetido a exercício agudo no dia da eutanásia, GIII - treinado e repouso no dia da eutanásia e GIV - treinado submetido a exercício agudo no dia da eutanásia.



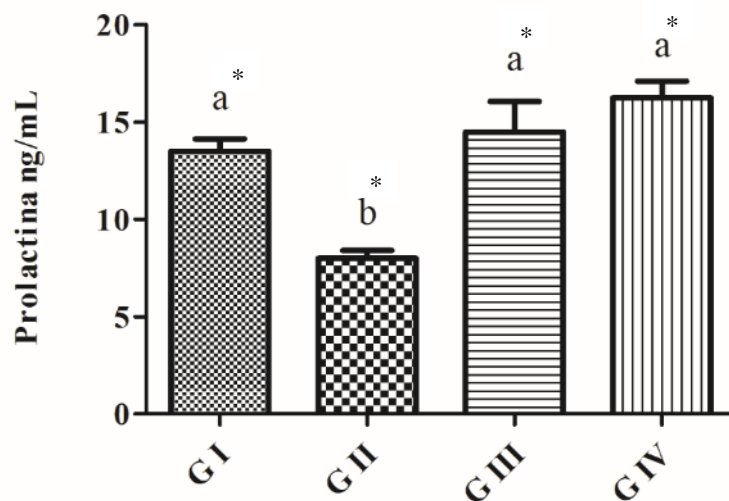
\*Letras diferentes representam diferença estatística significativa entre as concentrações hormonais

Figura 2 – Médias das concentrações plasmáticas dos níveis de progesterona dos quatro grupos experimentais. GI – Sedentário, GII - sedentário submetido a exercício agudo no dia da eutanásia, GIII - treinado e repouso no dia da eutanásia e GIV - treinado submetido a exercício agudo no dia da eutanásia.



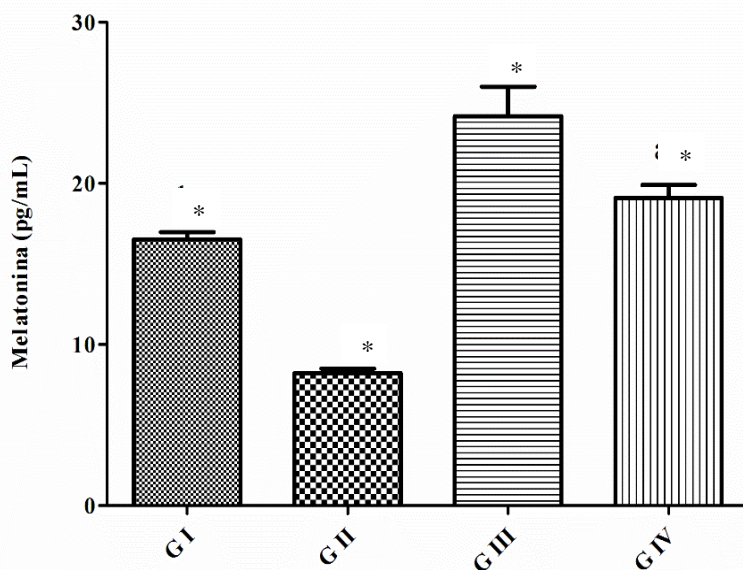
\*Letras diferentes representam diferença estatística significativa entre as concentrações hormonais

Figura 3 – Médias das concentrações plasmáticas dos níveis de prolactina dos quatro grupos experimentais. GI – Sedentário, GII - sedentário submetido a exercício agudo no dia da eutanásia, GIII - treinado e repouso no dia da eutanásia e GIV - treinado submetido a exercício agudo no dia da eutanásia.



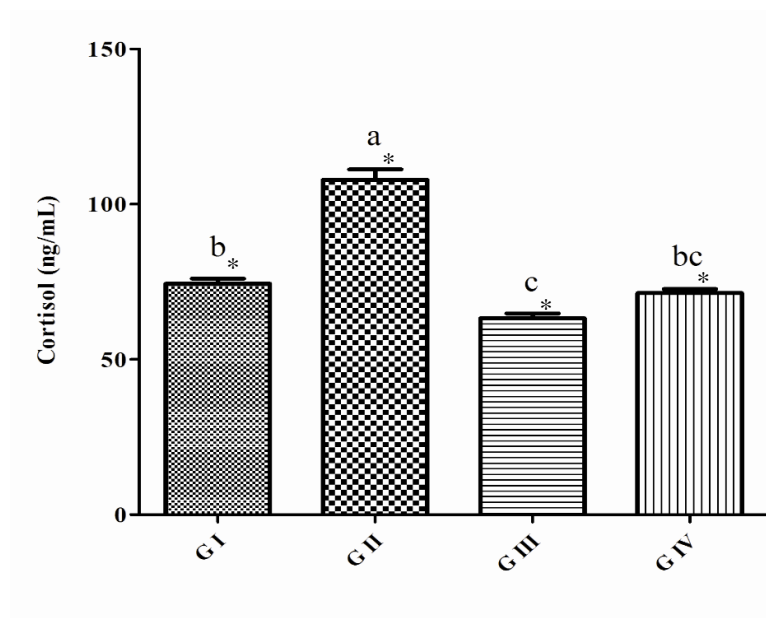
\*Letras diferentes representam diferença estatística significativa entre as concentrações hormonais

Figura 4 – Médias das concentrações plasmáticas dos níveis de melatonina dos quatro grupos experimentais. GI – Sedentário, GII - sedentário submetido a exercício agudo no dia da eutanásia, GIII - treinado e repouso no dia da eutanásia e GIV - treinado submetido a exercício agudo no dia da eutanásia.



\*Letras diferentes representam diferença estatística significativa entre as concentrações hormonais

Figura 5 – Médias das concentrações plasmáticas dos níveis de cortisol dos quatro grupos experimentais. GI – Sedentário, GII - sedentário submetido a exercício agudo no dia da eutanásia, GIII - treinado e repouso no dia da eutanásia e GIV - treinado submetido a exercício agudo no dia da eutanásia.



\*Letras diferentes representam diferença estatística significativa entre as concentrações hormonais

### CAPÍTULO III

#### **Avaliação imunohistoquímica dos ovários de ratas submetidas a exercício físico intenso crônico**

Belisa Duarte Ribeiro de Oliveira<sup>ab</sup>, Vitor Caiaffo Brito<sup>b</sup>, Cintia Giselle Martins<sup>b</sup> Ferreira<sup>b</sup>,  
Ismaela Maria Ferreira de Melo<sup>b</sup>, Valeria Wanderley Teixeira<sup>b</sup>, Álvaro Aguiar Coelho  
Teixeira<sup>b\*</sup>

<sup>a</sup> Faculdade Asces, Caruaru, Pernambuco, Brasil

<sup>b</sup> Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, Recife, Brasil

\*Autor para correspondência: Álvaro Aguiar Coelho Teixeira- UFRPE-DMFA.

Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois Irmãos-Recife-PE-Brazil. CEP 52171-900.

Tel. +55 81 33206389

E-mail: [alvaro@dmfa.ufrpe.br](mailto:alvaro@dmfa.ufrpe.br) (AAC Teixeira)

**Resumo:** As últimas décadas tem sido marcadas pela tentativa de inserção das mulheres na prática esportiva, especialmente aquelas que exigem esforço físico intenso. A relação entre esforço físico intenso e suas consequências na histofisiologia ovariana, ainda não está completamente elucidada. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações imunohistoquímicas dos ovários de ratas submetidas ao exercício físico intenso crônico. 40 ratas foram distribuídas em 4 grupos: GI (animais sedentários), GII (Animais sedentários submetidos ao exercício agudo no dia da eutanásia), GIII (Animais treinados mantidos em repouso no dia da eutanásia), GIV (Animais treinados submetidos ao exercício agudo no dia da eutanásia). A análise imunohistoquímica foi realizada por parâmetros histológicos ovarianos de VEGF, TNF- $\alpha$  e IL-6, índice apoptótico (IA) e de proliferação celular. Observou-se um aumento da expressão da IL-6, TNF- $\alpha$  e VEGF nos grupos GIII e GIV. O GII apresentou maiores valores ( $p < 0,05$ ) de IA e nenhuma diferença entre os demais grupos foi observada neste parâmetro. As alterações inflamatórias nos grupos treinados intensa e cronicamente não foram capazes de causar morte celular ovariana e o exercício intenso de forma aguda e não treinada previamente parece ter um forte impacto na histofisiologia reprodutiva feminina.

Palavras-chave: Ovário, exercício, apoptose, inflamação, interleucina-6, fator de necrose tumoral alfa, fator A de crescimento do endotélio vascular



## 1. Introdução

A prática de atividades físicas e de esportes em geral sempre foi contemplada pelos humanos de ambos os sexos. No entanto, em dado período da história, há um afastamento das mulheres da prática esportiva e da prática de atividades físicas em geral, sob inúmeros discursos, dentre eles destacando-se, como na Grécia Antiga, o fato de torná-las masculinizadas, ou ainda, com a alegação de que elas não teriam condições físicas ou fisiológicas para tal (OLIVEIRA; CHEREM; TUBINO, 2009). Com este cenário exposto, as últimas décadas tem sido marcadas pela tentativa de inserção das mulheres na prática esportiva, especialmente aquelas que exigem esforço físico intenso.

A relação entre esforço físico intenso e imunidade começou a ser abordada no início do século passado por Larrabee (LARRABEE, 1902), que relatou um grande aumento do número de neutrófilos no sangue entre os quatro atletas que correram a Maratona de Boston em 1901. Larrabee observou que as alterações nas contagens de glóbulos brancos eram diferenciadas quando comparadas a patologias e que em esforços que vão além dos limites fisiológicos, condições semelhantes poderiam resultar no desenvolvimento de processos inflamatórios (NIEMAN, 1997). A partir de então, vários estudos foram desenvolvidos com a intenção de descobrir o mecanismo fisiológico que envolve atividades físicas intensas em processos inflamatórios e imunológicos de diversos órgãos e sistemas, como pulmão (COOPER et al., 2007; KRÜGER; MOOREN, 2014), coração (OBERT et al., 1998; DUMANOIR et al., 2007) sistema hematopoiético (MACKINNON et al., 1997; RUSHALL; BUSCH, 1980) e endócrino (LI et al., 2012).

Somente em 1939 que Hans Selye correlacionou exercícios físicos extenuantes com disfunções do ciclo ovariano, relatando a supressão da reprodução em ratas submetidas a

exercício físico intenso não gradativo. Depois da observação de tais achados, outros estudos associaram a prática de exercícios intensos a vários distúrbios do ciclo ovulatório em mulheres, incluindo retardo puberal, alterações na fase lútea, anovulação e amenorreia (BLAKE; STEIN, 1984; MANNING; BRONSON, 1989).

O assunto foi continuamente discutido no meio científico até que em 1992, o Colégio Americano de Medicina do Esporte apresentou como tema central de sua conferência a patologia então chamada de Tríade da Atleta, que foi definida como uma síndrome que descreve um espectro de distúrbios relacionados com a reserva de energia, a função ovariana e a densidade mineral óssea em mulheres atletas (LAGOWSKA; JESZKA, 2011; GEORGE; LEONARD; HUTCHINSON, 2011). A tríade foi reconhecida como um problema de saúde que pode diminuir o desempenho físico e até mesmo causar morbidade e / ou mortalidade nessas mulheres e seus sintomas clínicos mais comuns incluem distúrbios alimentares, amenorreia hipotalâmica funcional e redução da densidade mineral óssea (OTIS et al., 1997; NAZEM; ACKERMAN, 2012).

O treinamento de alta intensidade, a baixa disponibilidade energética, baixos níveis de leptina, peso ou gordura corporal baixos e hormônios de estresse produzidos por estresse psicológico são alguns dos fatores que tem sido estudados como causadores de alterações de vias endócrinas que levam a distúrbios do ciclo menstrual (LAGOWSKA; JESZKA, 2011; BUCK LOUIS et al., 2011) .

A resposta inflamatória também tem sido apontada como responsável por danos morfofisiológicos em diversos órgãos afetados pela consequência da intensidade do exercício (JAHREIS et al., 1991; GLEESON et al., 1995). Entretanto, atualmente poucas pesquisas foram publicadas sobre a expressão de marcadores inflamatórios no sistema reprodutivo em resposta a protocolos de exercícios extenuantes (COSTA et al., 2014; HASHIMOTO et al., 2014; MOSAVAT; OOI; MOHAMED, 2014; SIM et al., 2015), e são necessárias novas investigações

com objetivo de determinar como o exercício modula células imunológicas específicas no ovário e útero e quais as implicações dessas respostas de forma aguda e crônica.

Apesar de haver estudos que apontam as interferências hormonais sofridas e induzidas por ovários de mulheres que realizam exercício físico intenso crônico, estudos imunohistoquímicos que envolvam esse tipo de atividade nesses órgãos ainda são escassos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar as alterações imunohistoquímica dos ovários de ratas submetidas ao exercício físico intenso crônico.

## **2. Materiais e Métodos**

Foram utilizadas 40 ratas albinas da linhagem *Wistar* com 90 dias de idade, pesando  $200 \pm 30$  g provenientes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com temperatura ambiente de  $23 \pm 1^\circ$  C e umidade controladas sob regime de iluminação cíclica (12h escuro, 12h claro) com intensidade de luz  $\leq 100$ LUX, em nossa instituição. Todos os protocolos experimentais foram conduzidos de acordo com o Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA/UFRPE) e teve sua realização autorizada sob protocolo de número 111/2014.

### *2.1. Dieta*

Neste estudo foi utilizada uma dieta sólida padrão para roedores (PRESENCE®) e água filtrada *ad libitum* para todos os animais dos grupos experimentais.

## *2.2. Desenho Experimental*

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 seguintes grupos experimentais: GI - SEDENTÁRIO (S) - Animais sem atividade física, GII - SEDENTÁRIO AGUDO (SA): Animais sedentários submetidos ao exercício agudo no dia da eutanásia; GIII - TREINADO REPOUSO (TR): Animais treinados mantidos em repouso no dia da eutanásia; GIV - TREINADO AGUDO (TA): Animais treinados submetidos ao exercício agudo no dia da eutanásia.

## *2.3. Protocolo de treinamento*

O treinamento dos animais foi realizado em um sistema de natação (VIEIRA et al., 1988) com água aquecida por um sistema central de resistência elétrica e temperatura de  $31 \pm 2$  °C. O período de treinamento foi de seis semanas, cinco dias por semana, 60 minutos por dia. Durante a primeira semana, os animais iniciaram um treinamento progressivo visando sua adaptação ao meio líquido. No primeiro dia da segunda semana de treinamento foi utilizado o protocolo de teste progressivo para determinação do limiar anaeróbico metabólico e sobrecarga inicial de treinamento, e o segundo teste foi realizado no primeiro dia da quinta semana para a correção da sobrecarga de treinamento (ROGERO et al., 2002).

No último dia de experimento, os animais foram submetidos ao exercício até a exaustão. O tempo de exaustão foi caracterizado no momento em que o animal não conseguiu mais manter as narinas fora da água durante 10 segundos.

## *2.4. Determinação de carga de limiar anaeróbico*

O protocolo de teste consistiu de exercício agudo de natação com sobrecarga progressiva, sob a forma de pesos atados à cauda do animal, correspondendo a 4, 5, 6, 7 e 8%

do seu peso corporal, durante períodos de três minutos de natação intercalados com um minuto de repouso. Visando minimizar qualquer tipo de estresse decorrente da manipulação dos animais e da mudança de ambiente, foi realizado um período de aquecimento com duração de 20 minutos sem sobrecarga.

Coletas de sangue a partir da veia caudal foram realizadas aos 10 e 20 minutos do período de aquecimento e nos períodos de sobrecarga. O sangue foi coletado por meio de capilares heparinizados e, posteriormente, realizada a dosagem de lactato sanguíneo através de um aparelho eletroquímico (Accusport® com fitas Boehring Mannheim®) (HECK et al., 1985). O limiar anaeróbio metabólico foi determinado a partir da inflexão da curva de concentração de lactato sanguíneo pela sobrecarga utilizada. O ponto de inflexão da curva foi considerado como a carga do limiar anaeróbio metabólico.

### *2.5. Eutanásia e coleta do material*

As fêmeas foram anestesiadas com cloridrato de quetamina (80 mg/kg) e xilazina (6,0 mg/kg) por via intramuscular. A seguir, foi realizada a abertura da cavidade abdominal para remoção dos ovários. Após a coleta dos materiais, foi realizada a eutanásia utilizando-se com uma sobredose de pentobarbital sódico aplicados por via intraperitoneal. Os ovários foram imersos para fixação em formaldeído, permanecendo no mesmo por 48 horas. Após esses procedimentos, foram desidratados em bateria crescente de álcool etílico, diafanizados em xilol e embebidos e incluídos em parafina e os blocos de parafina foram então cortados em micrótomo tipo Minot (Leica®), ajustado para 7 µm e 5 µm de espessura, para posterior análise. Todas as fêmeas estavam em fase de estro.

### *2.6. Índice apoptótico (IA) e proliferação celular (IPC)*

Para detectar apoptose pela fragmentação do DNA, cinco lâminas silanizadas contendo cortes de ovários de cada grupo, foram submetidas ao teste de TUNEL (Terminal Deoxinucleotidil Transferase Uracil Nick End Labeling) (GAVRIELI; SHERMAN; BENSASSON, 1992), seguindo o protocolo do kit Apoptag Plus (Merck®). Para determinar a proliferação celular, os cortes foram despafarfinizados, hidratados e submetidos a recuperação antigênica com tampão citrato (pH=6) em banho-maria por 20 minutos, a 100 °C, e após descanso de 20 minutos em temperatura ambiente foi aplicado sobre o peróxido de hidrogênio a 3% por 30 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados em tampão Tris e com anticorpo primário Ki-67 (Spring) na diluição 1:100, por 1 hora em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em tampão Tris e incubados com histofine por 30 minutos, submetidos ao cromógeno diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation™) e contracolorados com hematoxilina. O índice apoptótico e de proliferação celular foi determinado pela contagem da percentagem de células positivas a partir de, pelo menos, 500 núcleos subdivididos em 10 campos escolhidos aleatoriamente utilizando-se a objetiva de 40x (LOSA et al., 2000; BURCOMBE et al., 2006; WU et al., 2013).

## 2.7. VEGF

Foi utilizado o anticorpo VEGF-A (Dako, Denmark) na diluição 1:20. A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato (pH=6) em forno de micro-ondas por 20 minutos, a 90 °C, com descanso das lâminas por mais 20 minutos dentro do forno. Em seguida, os cortes foram submetidos ao peróxido de hidrogênio (3%) por 30 minutos, lavados em tampão Tris e incubados com anticorpo primário, em câmara úmida por 2 horas. Os cortes foram lavados em tampão Tris, incubados com histofine por 30 minutos, submetidos ao cromógeno diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation™) e contracolorados com hematoxilina.

## 2.8. *IL6 e TNF $\alpha$*

Após a fixação em formol, os ovários foram processados para inclusão em parafina. Cortes de 5  $\mu$ m foram aderidos a lâminas tratadas com 3-amino-propil-trietoxissilano (APES [Sigma, EUA]). As lâminas foram desparafinizadas com xilol e reidratadas em etanol. Para aumentar a exposição ao epítipo, as secções foram aquecidas durante 30 minutos em um tampão de citrato de sódio (0,01 M, pH 6,0). Para minimizar atividade da peroxidase endógena, as lâminas foram tratadas com 0,3% (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água durante cinco minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS 0,01 M (pH 7,2) e bloqueadas com BSA a 1%, 0,2% de Tween 20 em PBS durante 1 hora à temperatura ambiente. As lâminas foram incubadas durante 12 horas a 4 ° C com os anticorpos IL-6 e TNF $\alpha$ . A concentração ideal usada foi 1:100. A reação antígeno-anticorpo foi visualizada com avidina biotina-peroxidase (Dako Universal LSAB<sup>®</sup> + Kit, Peroxidase), utilizando 3,3- diaminobenzidina como cromógeno. As lâminas foram contrastadas com hematoxilina. Os controles negativos foram tratados como descrito acima, sendo realizada a omissão do primeiro anticorpo. Cinco imagens com a mesma ampliação foram analisadas quantitativamente usando software Gimp 2.6 (GNU Image Manipulation Programa, as plataformas UNIX).

## 2.7. *Análise estatística*

Para análise da apoptose e índice de proliferação celular, foi realizada a análise de variância. Quando significativa, esta foi complementada pelo teste de Comparações Múltiplas de Tukey e Kramer e adotado o nível de significância de 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).

## 3. Resultados

A análise imunohistoquímica revelou que os ovários das fêmeas do grupo sedentário submetidas ao exercício agudo, tiveram a expressão da citocina pró-inflamatória IL-6 diminuída, em relação as fêmeas dos demais grupos experimentais. No entanto, nos grupos GIII

(TR) e GIV (TA) observou-se aumento na expressão desse fator quando comparado as fêmeas do GI (S) (Figuras 1A – 1D).

Resultados semelhantes foram evidenciados para o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). O exercício físico intenso aumentou a expressão desta citocina nas fêmeas treinadas intensamente de forma crônica, em relação as fêmeas do GI (S) e G II (SA) os quais apresentaram menor marcação (Figuras 2A – 2D).

A expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) foi mais intensa nas fêmeas dos dois grupos submetidas ao protocolo de treinamento físico intenso crônico (TR e TA) em relação as fêmeas dos grupos GI (S) e GII (SA), sendo que neste último observou-se a menor marcação para esse fator antigênico (Figura 3).

O índice apoptótico (IA) nas células ovarianas das fêmeas do GI (S) e daquelas submetidas ao exercício físico intenso crônico variou de 15 a 18% e não apresentaram diferenças entre si ( $p \geq 0,05$ ). Entretanto, no grupo sedentário submetido ao exercício agudo (SA) os ovários apresentaram maior proporção de células apoptóticas em relação aos demais grupos ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 4).

Com relação ao índice de proliferação celular evidenciou-se nos ovários das fêmeas do GI (S) e daquelas submetidas ao exercício físico intenso crônico (TR e TA) maiores índices quando comparado aos ovários das fêmeas do grupo sedentário submetido ao exercício agudo (SA), sem no entanto diferirem entre si (Figura 5).

#### **4. Discussão**

Enquanto o exercício induz claramente uma resposta cerebral de "perigo", a estimulação central das vias neuroadrenérgicas não controla sozinha todas as respostas inflamatórias e imunológicas conhecidas associadas ao exercício físico intenso (TOWNSEND et al., 2015). O sistema reprodutivo feminino é um dos sistemas que podem ser alterados e sofrer consequências



imunes e inflamatórias decorrentes do exercício físico intenso, seja ele agudo ou crônico (WARREN; PERLROTH, 2001; MOSAVAT; MOHAMED; MIRSANJARI, 2013).

Os resultados de nosso estudo mostraram que houve um aumento da expressão de marcadores inflamatórios (IL-6, TNF- $\alpha$ ) no ovário das ratas sedentárias submetidas ao exercício crônico. Alguns estudos demonstraram uma elevação inicial e imediata da expressão dessas citocinas após a realização de exercícios intensos de resistência realizados de forma aguda. Porém, nesses estudos, a medição dos marcadores inflamatórios ocorreu entre 24 e 48 horas após a realização do exercício (BRENNER et al., 1999; TOWNSEND et al., 2015). Esse fato poderia explicar a diminuição do TNF $\alpha$  e IL-6 nos ovários das fêmeas sedentárias submetidas ao exercício crônico, já que os grupos submetidos ao exercício agudo foram submetidos à eutanásia imediatamente após a atividade física pois estas foram submetidas à eutanásia logo após a atividade física. Ademais, embora a inflamação seja comumente associada com consequências prejudiciais, processos pró-inflamatórios são essenciais para a reparação tecidual ovariana (KHARRAZ et al., 2013; URSO, 2013).

Por outro lado, analisando sobre esse aspecto acima mencionado, era preditivo que as fêmeas treinadas cronicamente com exercícios intensos tivessem uma resposta na expressão de citocinas pró-inflamatórias mais pronunciada após várias sessões de exercício do que aquelas que apenas realizaram uma sessão de exercício agudo, fato este que ocorreu de maneira contínua, sugerindo que houve um processo inflamatório adaptativo no reparo tecidual em resposta a exercícios intensos (FREIDENREICH; VOLEK, 2012). De fato, segundo Scheett (2002) se a adaptação do treinamento for bem sucedida, as citocinas pró inflamatórias tendem a cair, fato que pode ter interferido nos níveis sempre intensos de treinamento aplicado em nosso protocolo.

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um fator de crescimento angiogênico potente que estimula a permeabilidade, a divisão celular e a migração de células

endoteliais vasculares (FRASER, 2006). Sua expressão é abundante em uma série de processos que se caracterizam por um conjunto comum de características fisiopatológicas que incluem hipermeabilidade vascular, com extravasamento de proteínas do plasma, síntese de fibrina no plasma extravasado, formação de tecido de granulação e remodelação do tecido de granulação em tecido conjuntivo avascular (YAMAMOTO et al., 1997). O VEGF desempenha um papel importante na iniciação destes eventos, porque serve como um mitógeno de células endoteliais, aumentando a permeabilidade dos vasos sanguíneos às proteínas do plasma, provocando desse modo o extravasamento de fibrinogênio e conseqüente deposição de uma matriz provisória de fibrina (WONG; WELLMAN; LOUNSBURY, 2003).

Em ovários normais, o VEGF está envolvido no processo de maturação do folículo e formação do corpo lúteo (KAMAT et al., 1996), porém sua elevada expressão também foi relatada fortemente em células tumorais de ovário (WONG; WELLMAN; LOUNSBURY, 2003; BOURGEOIS et al., 2015), além de aparecer nos folículos e fluido ascítico de pacientes com síndrome de hiperestimulação ovariana e ovário policístico (KAMAT et al., 1996), indicando que o VEGF pode desempenhar um papel importante na progressão de tumores e danos celulares de patologias ligadas ao ovário.

Em nosso estudo, os animais que realizaram exercício físico intenso de forma crônica apresentaram maiores índices de expressão de VEGF e proliferação celular do que o grupo não treinado submetido a um exercício físico intenso agudo. Esse fato indica que o exercício físico intenso pode induzir a danos no tecido ovariano que, cronicamente, passa pelo processo de tentativa de reparação tecidual, podendo ser danoso ao ciclo ovariano, se o estímulo for persistente. Essa tentativa de reparação nesses animais, provavelmente diminuiu os índices de morte celular (apoptose) nos ovários dos mesmos grupos, diferentemente dos maiores índices de apoptose encontrados nos animais não treinados previamente submetidos a um exercício intenso de forma aguda.

A apoptose é um mecanismo crítico da homeostase celular pelo qual as células são danificadas, ou eliminadas por morte programada. Durante o crescimento e desenvolvimento folicular, em torno de 99% dos folículos passam por um processo degenerativo conhecido como atresia, que é associada com a apoptose de células da granulosa (ARCHANA; YOGESH; KUMARASWAMY, 2013). A apoptose desempenha um papel ativo e importante nas funções fisiológicas do ovário e é um dos fatores fundamentais que determinam a vida reprodutiva feminina e na vida adulta, também tem sido relacionada a alguns eventos patológicos reprodutivos, como anovulação crônica, baixa reserva ovariana e disfunção ovariana precoce em diversas patologias (VASKIVUO; TAPANAINEN, 2002).

Em nosso estudo, a porcentagem de células ovarianas em apoptose nas fêmeas não treinadas submetidas a um exercício intenso agudo foi consideravelmente maior que os grupos treinados e contrapõe uma diminuição do índice de proliferação celular (20%) quando comparado aos demais grupos (40%).

Baseados na hipótese de que a apoptose ovariana, nesse caso, foi uma consequência danosa do exercício, e não parte da fisiologia ovariana de ratas homogêneas, supomos que é possível que o não treinamento prévio associado a um exercício de forma intensa tenha impedido o tempo necessário para um mecanismo adaptativo de regeneração tecidual ovariana (confirmado com o aumento da expressão de VEGF e índice de proliferação celular nos grupos treinados). Esse fato também nos permite especular que o exercício físico intenso pode ser ainda mais danoso à fisiologia ovariana quando não associado a treinamentos prévios que adaptem as tentativas de reparação tecidual autogênica do ovário, e assim, diminuir alterações mais graves ou mesmo patologias ligadas à infertilidade por morte celular.

A via pela qual o exercício físico intenso agudo danifica as células ovarianas com danos irreversíveis, porém, ainda é incerta. Diversos autores tem estudado qual o principal mediador da morte celular em atletas de alto rendimento, principalmente após um exercício exaustivo

(NIESS et al., 1996; MOOREN et al., 2002; KRÜGER; MOOREN, 2014;). Apesar de estudarem diferentes células (leucócitos e tímócitos), assim como em nosso estudo, a percentagem de células apoptóticas após a continuidade do exercício permaneceu constante, indicando que os mecanismos de regeneração tecidual podem impedir o aumento da apoptose celular induzida pelo exercício.

A semelhança entre os resultados pode ser atribuída a vias de mediação de apoptose comuns a quaisquer tipo de exercício físico intenso sem treinamento prévio, porém deve ser analisada com cautela, reforça a necessidade de mais estudos e confirma a escassez de pesquisas que analisem danos celulares induzidos pelo exercício em órgãos do sistema reprodutor feminino (COSTA et al., 2014), mais especificamente, no ovário.

Dentre as vias que podem induzir a apoptose ovariana, as mudanças induzidas pelo exercício em associação com glicocorticóides podem ser responsáveis pela morte celular. Estudos sugerem que a exposição *in vitro* de corticosterona nas concentrações fisiológicas observadas após exercícios moderados já são capazes de induzir apoptose em diversas células (CHATARD et al., 2002; DIJK et al., 2012; HOFFMAN-GOETZ; ZAJCHOWSKI, 1999; MONTELEONE et al., 1992). Ademais, estudos recentes em nosso laboratório também sugerem essa correlação entre o aumento de cortisol e apoptose celular ovariana, pois aumentos na concentração desse hormônio foram encontrados no grupo de animais que mais tiveram percentagem de danos celulares após o exercício físico.

É de suma importância para investigação das consequências do exercício físico intenso no sistema reprodutor feminino, que mais estudos sejam realizados contemplando variáveis que englobem respostas locais e sistêmicas ao exercício. Para tal, é possível que trabalhos que envolvam a associação de análises histomorfométricas com outros marcadores biológicos possam elucidar a associação entre o exercício físico intenso e a disfunção ovariana.

Os resultados do presente estudo demonstram que a expressão de marcadores inflamatórios IL6 e TNF- $\alpha$  foi significadamente aumentada em células ovarianas de ratas treinadas com exercício físico intenso crônico, porém tais reações não foram capazes de causar morte celular provavelmente, por mecanismos adaptativos de regeneração celular. Embora muitos fatores possam ativar mecanismos de morte celular, o exercício intenso realizado de forma aguda e não treinado previamente parece ter um forte impacto na histofisiologia reprodutiva feminina, com maiores danos celulares e menores prognósticos de recuperação histológica.

## Referências

- ARCHANA, M.; YOGESH, T. L.; KUMARASWAMY, K. L. Various methods available for detection of apoptotic cells--a review. **Indian journal of cancer**, v. 50, n. 3, p. 274–83, 2013.
- BOURGEOIS, D. L.; KABAROWSKI, K. A.; PORUBSKY, V. L.; KREEGER, P. K. High-grade serous ovarian cancer cell lines exhibit heterogeneous responses to growth factor stimulation. **Cancer Cell International**, v. 15, n. 112, p. 1–11, 2015.
- BRENNER, I. K. M.; NATALE, V. M.; VASILIOU, P.; MOLDOVEANU, A. I.; SHEK, P. N.; SHEPHARD, R. J. Impact of three different types of exercise on components of the inflammatory response. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 80, n. 5, p. 452–460, 1999.
- BURCOMBE, R.; WILSON, G. D.; DOWSETT, M.; KHAN, I.; RICHMAN, P. I.; DALEY, F.; DETRE, S.; MAKRIS, A. Evaluation of Ki-67 proliferation and apoptotic index before, during and after neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer. **Breast cancer research**, v. 8, n. 3, p. R31, 2006.
- CHATARD, J. C.; ATLAOUI, D.; LAC, G.; DUCLOS, M.; HOOPER, S.; MACKINNON, L. Cortisol, DHEA, performance and training in elite swimmers. **International Journal of Sports Medicine**, v. 23, n. 7, p. 510–515, 2002.
- COOPER, D. M.; RADOM-AIZIK, S.; SCHWINDT, C.; ZALDIVAR, F. Dangerous exercise: lessons learned from dysregulated inflammatory responses to physical activity. **Journal of applied physiology**, v. 103, n. 2, p. 700–709, 2007.
- COSTA, A. E. A.; SILVA, J. L.V.; SIMÕES, M. J.; NOUAILHETAS, V. L A. Morphofunctional alterations of the nonpregnant murine uterus in response to intense and exhaustive exercise are not related to oxidative stress. **Journal of applied physiology**, v. 116, p. 604–10, 2014.
- DIJK, D. J.; DUFFY, J. F.; SILVA, E. J.; SHANAHAN, T. L.; BOIVIN, D. B.; CZEISLER, C. A. Amplitude reduction and phase shifts of melatonin, cortisol and other circadian rhythms after a gradual advance of sleep and light exposure in humans. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e30037, 2012.
- DUMANOIR, G. R.; HAYKOWSKY, M. J.; SYROTUIK, D. G.; TAYLOR, D. A.; BELL, G. J. The effect of high-intensity rowing and combined strength and endurance training on left ventricular systolic function and morphology. **International journal of sports medicine**, v. 28, p. 488–494, 2007.

FRASER, H. M. Regulation of the ovarian follicular vasculature. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, 2006.

FREIDENREICH, D. J.; VOLEK, J. S. Immune responses to resistance exercise. **Exercise Immunology Review**, v. 18, p. 8–41, 2012.

GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **Journal of Cell Biology**, v. 119, n. 3, p. 493–501, 1992.

GEORGE, C.; LEONARD, J.; HUTCHINSON, M. The female athlete triad: a current concepts review. **South African Journal of Sports Medicine**, v. 23, n. 2, p. 50–56, 2011.

GLEESON, M.; MCDONALD, W. A.; CRIPPS, A. W.; PYNE, D. B.; CLANCY, R. L.; FRICKER, A. The effect on immunity of long-term intensive training in elite swimmers. **Clinical and experimental immunology**, v. 102, n. 1, p. 210–216, 1995.

HASHIMOTO, H.; ISHIJIMA, T.; HAYASHIDA, H.; SUZUKI, K.; HIGUCHI, M. Menstrual cycle phase and carbohydrate ingestion alter immune response following endurance exercise and high intensity time trial performance test under hot conditions. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 11, n. 39, p. 2–11, 2014.

HOFFMAN-GOETZ, L.; ZAJCHOWSKI, S. In vitro apoptosis of lymphocytes after exposure to levels of corticosterone observed following submaximal exercise. **The Journal of sports medicine and physical fitness**, v. 39, n. 4, p. 269–274, 1999.

JAHREIS, G.; KAUF, E.; FROHNER, G.; SCHIMIDT, H. E. Influence of intensive exercise on IGFI and steroid hormones. **Growth Regulation**, v. 1, p. 95–99, 1991.

KAMAT, B. R.; BROWN, L. F.; MANSEAU, E. J.; SENGER, D. R.; DVORAK, H.F. Expression of vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. **American Journal of Pathology**, v. 146, p. 157–165, 1996.

KHARRAZ, Y.; GUERRA, J.; MANN, C. J.; SERRANO, A. L.; MUÑOZ-CÁNOVES, P. Macrophage plasticity and the role of inflammation in skeletal muscle repair. **Mediators of inflammation**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

KRÜGER, K.; MOOREN, F. C. Exercise-induced leukocyte apoptosis. **Exerc Immunol Rev**, v. 20, p. 117–134, 2014.

LAGOWSKA, K.; JESZKA, J. Are young female athletes at risk of amenorrhoea? analysis of body composition, nutritional and endocrine factors. **British journal of sports medicine**, v. 45, n. 4, p. 359, 2011a.

LAGOWSKA, K.; JESZKA, J. Are young female athletes at risk of amenorrhoea? analysis of body composition, nutritional and endocrine factors. **British journal of sports medicine**, v.

45, n. 4, p. 223–232, 2011b.

LARRABEE, R. C. Leucocytosis after violent exercise. **J Med Res**, v. 7, n. 1, p. 76–82, 1902.

LI, Y.; ZHU, Y.; ZHANG, J.; ZHANG, X.; ZENG, Y. Biochemical Changes and Endocrine Responses in Pre-Competition Training in Elite Swimmers. **Biology of Sport**, v. 29, n. 1, p. 71–75, 2012.

LOSA, M.; BARZAGHI, R. L.; MORTINI, P.; FRANZIN, A.; MANGILI, F.; TERRENI, M. R.; GIOVANELLI, M. Determination of the proliferation and apoptotic index in adrenocorticotropin-secreting pituitary tumors : comparison between micro- and macroadenomas. **Am J Pathol**, v. 156, n.1, p. 245-251, 2000.

MACKINNON, L. T.; HOOPER, S. L.; JONES, S.; GORDON, R. D.; BACHMANN, A. W. Hormonal, immunological, and hematological responses to intensified training in elite swimmers. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 29, n. 12, p. 1637–1645, 1997.

MONTELEONE, P.; FUSCHINO, A.; NOLFE, G.; MAJ, M. Temporal relationship between melatonin and cortisol responses to nighttime physical stress in humans.

**Psychoneuroendocrinology**, v. 17, n. 1, p. 81–6, 1992.

MOOREN, F. C.; BLÖMING, D.; LECHTERMANN, A.; LERCH, M. M.; VÖLKER, K. Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. **Journal of applied physiology**, v. 93, n. 1, p. 147–53, 2002.

MOSAVAT, M.; MOHAMED, M.; MIRSANJARI, M. O. Effect of Exercise on Reproductive Hormones in Female Athletes. **International Journal of Sport and Exercise Science**, v. 5, n. 1, p. 7–12, 2013.

MOSAVAT, M.; OOI, F. K.; MOHAMED, M. Stress hormone and reproductive system in response to honey supplementation combined with different jumping exercise intensities in female rats. **BioMed research international**, v. 2014, p. 123640, 2014.

NAZEM, T. G.; ACKERMAN, K. E. The Female Athlete Triad. **Sports Health: A Multidisciplinary Approach**, v. 4, n. 4, p. 302–311, 2012.

NIEMAN, D. C. Immune response to heavy exertion. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 82, n. 5, p. 1385–1394, 1997.

OBERT, P.; STECKEN, F.; COURTEIX, D.; LECOQ, A. M.; GUENON, P. Effect of long-term intensive endurance training on left ventricular structure and diastolic function in prepubertal children. **International journal of sports medicine**, v. 19, n. 2, p. 149–54, 1998.

OLIVEIRA, G.; CHEREM, E. H. L.; TUBINO, M. J. G. A inserção histórica da mulher no esporte. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 16, n. 2, p. 117–125, 2009.



OTIS, C.; DRINKWATER, B.; JOHNSON, M.; LOUCKS, A.; WILMORE, J. ACSM Position Stand: The Female Athlete Triad. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 29, n. 5, p. 1–9, 1997.

ROGERO, M.; TIRAPEGUI, J.; PEDROSA, R. G.; ALVES DE CASTRO, I. I. S. O.; OLIVEIRA, A. A. M.; SALGADO, M. M.; PINTO, A. R.; UEDA, M. Efeito da suplementação com L-alanil-L-glutamina sobre a resposta de hipersensibilidade do tipo tardio em ratos submetidos ao treinamento intenso. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 225–232, 2002.

RUSHALL, B. S.; BUSCH, J. D. Hematological responses to training in elite swimmers. **Canadian Journal Of Applied Sport Sciences Journal Canadien Des Sciences Appliquees Au Sport**, v. 5, n. 3, p. 164–169, 1980.

SCHEETT, T. P. The Effect of Endurance-Type Exercise Training on Growth Mediators and Inflammatory Cytokines in Pre-Pubertal and Early Pubertal Males. **Pediatric Research**, v. 52, n. 4, p. 491–497, 2002.

SIM, M.; DAWSON, B.; LANDERS, G.; SWINKELS, D.W.; TJALSMA, H.; YEAP, B. B.; TRINDER, D.; PEELING, P. Oral contraception does not alter typical post-exercise interleukin-6 and hepcidin levels in females. **Journal of Science and Medicine in Sport**, v. 18, p. 8–12, 2015.

TOWNSEND, J. R.; HOFFMAN, J. R.; FRAGALA, M. S. JAJTNER, A. R.; GONZALEZ, A. M.; WELLS, A. J.; MANGINE, G. T.; FUKUDA, D. H.; STOUT, J. R.; OSTOJIC, S.; HESTER, R.; CALLEJA-GONZALEZ, J. TNF- $\alpha$  and TNFR1 responses to recovery therapies following acute resistance exercise. **Frontiers in Physiology**, v. 6, p. 1–6, 2015.

URSO, M. L. Anti-inflammatory interventions and skeletal muscle injury: benefit or detriment? **Journal of Applied Physiology**, v. 115, n. 6, p. 920–928, 2013.

VASKIVUO, T. E.; TAPANAINEN, J. S. Apoptosis in the human ovary. **Reproductive Biomedicine**, v. 6, n. 1, p. 24–35, 2002.

VIEIRA, R.; HAEBISCH, E.; HELL, N. S.; CURI, R. Sistema de natação para exercício físico de ratos. **Arq.Biol. Tecnol**, v. 31, p. 387–394, 1988.

WARREN, M. P.; PERLROTH, N. E. The effects of intense exercise on the female reproductive system. **Journal of Endocrinology**, v. 170, n. 1, p. 3–11, 2001.

WONG, C.; WELLMAN, T. L.; LOUNSBURY, K. M. VEGF and HIF-1 $\alpha$  expression are increased in advanced stages of epithelial ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 91, p. 513–517, 2003.

WU, X.; CHENG, B.; CAI, Z. D.; LOU, L. M. Determination of the apoptotic index in osteosarcoma tissue and its relationship with patients prognosis. **Cancer Cell Int.**, v. 13, n. 56, p. 1–4, 2013.

YAMAMOTO, S.; KONISHIL, I.; MANDAL, M.; KURODA, H.; KOMATSU, T.; NANBUL, K.; SAKAHARA, H.; MORI, T. Expression of vascular endothelial growth factor ( VEGF ) in epithelial ovarian neoplasms : correlation with clinicopathology and patient survival , and analysis of serum VEGF levels. **British Journal of Cancer**, v. 76, n. 9, p. 1221–1227, 1997.

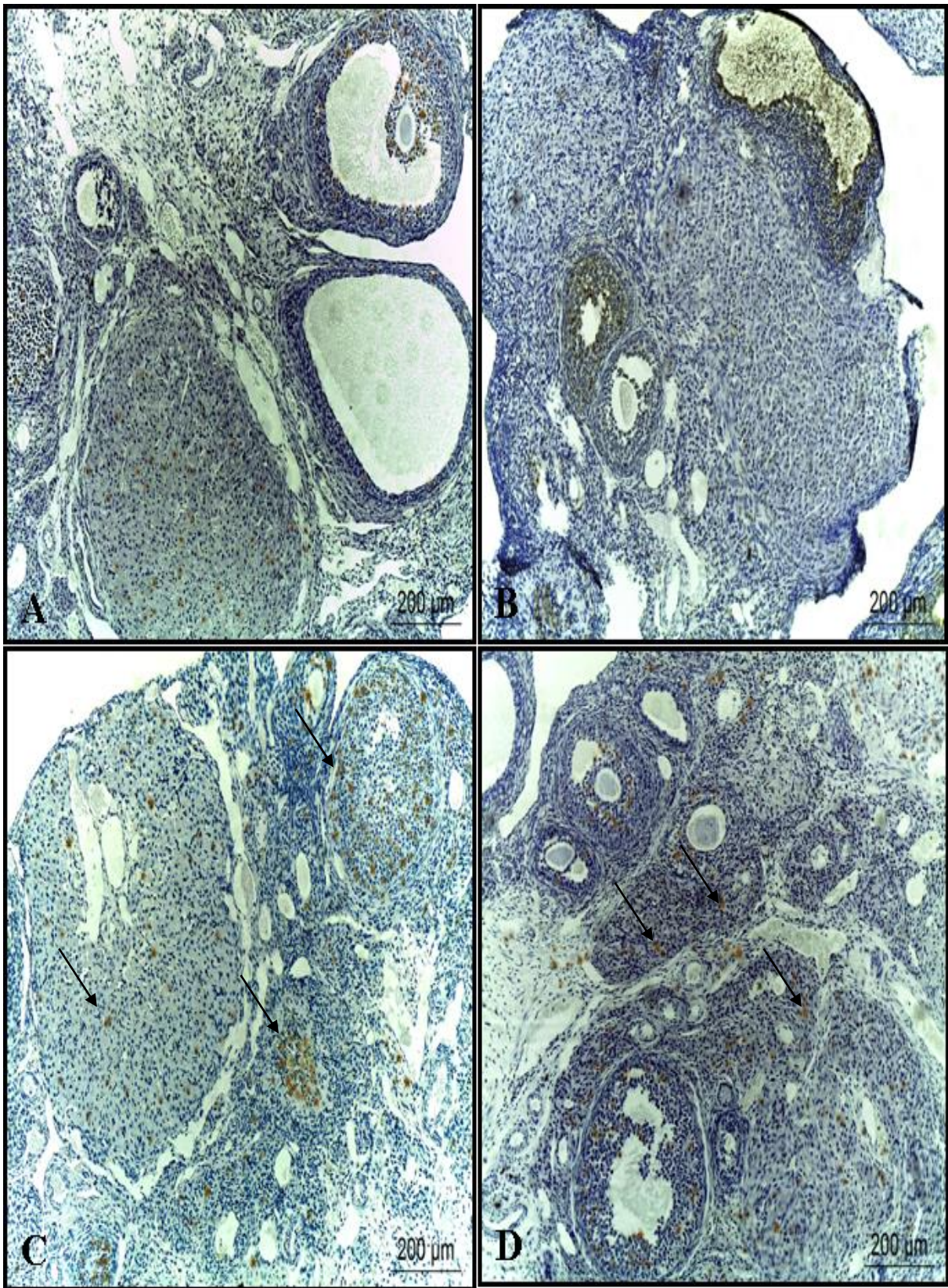


Figura 1. Imunohistoquímica para IL-6 nos ovários das ratas dos grupos experimentais. A - GI (S); B - GII (SA); C - GIII (TR) e D - GIV (TA). Observar maior expressão nos grupos GIII e GIV, nas áreas indicadas nas setas.

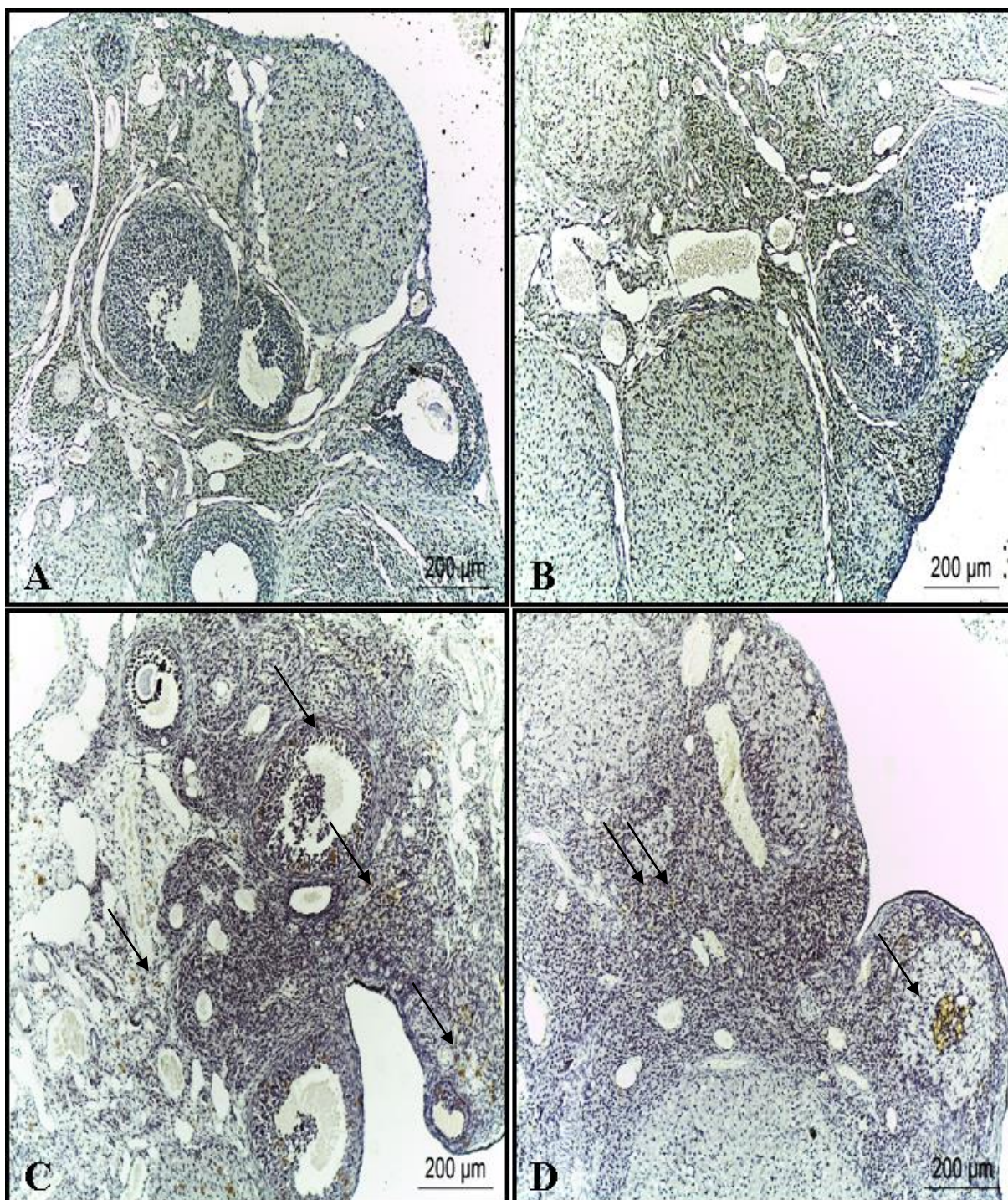


Figura 2. Imunohistoquímica para TNF $\alpha$  nos ovários das ratas dos grupos experimentais. A - GI (S); B - GII (SA); C - GIII (TR) e D - GIV (TA). Observar maior expressão nos ovários de GIII e GIV, destacados nas setas.

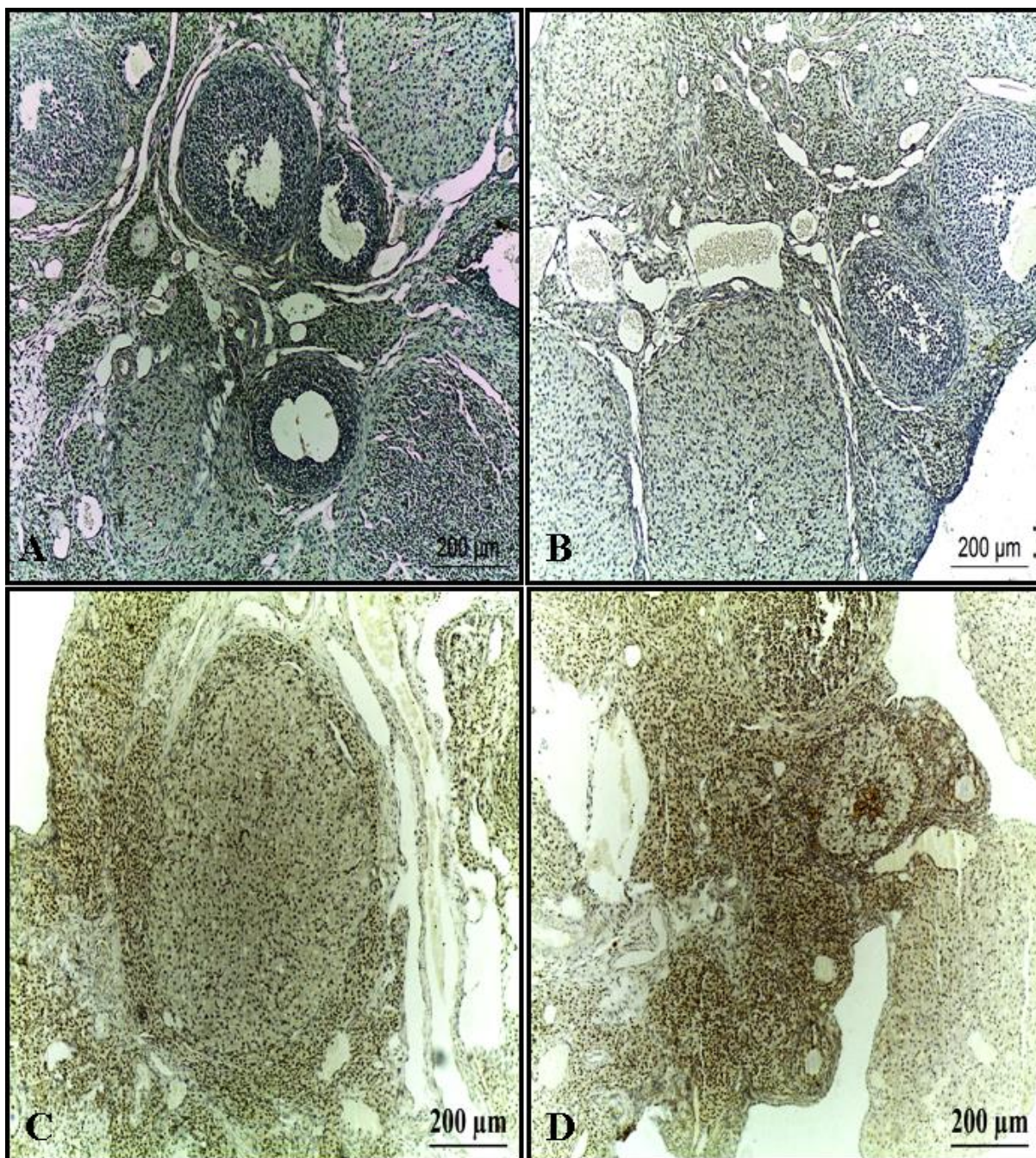


Figura 3. Imunohistoquímica para VEGF nos ovários das ratas dos grupos experimentais. A - GI (S); B - GII (SA); C - GIII (TR) e D - GIV (TA). Observar maior expressão nos grupos TR e TA, em relação aos grupos S e SA.

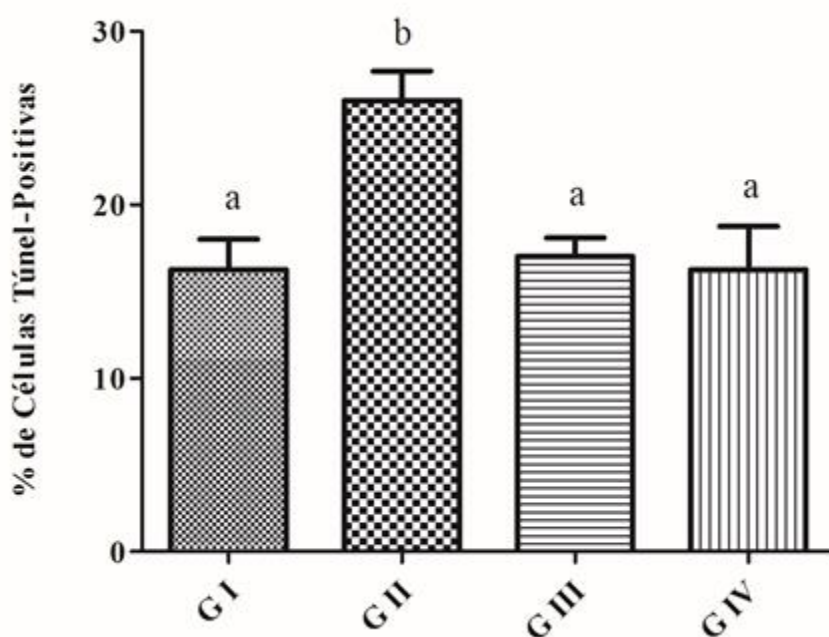


Figura 4. Porcentagem de células apoptóticas nos grupos experimentais. GI (sem atividade física); GII (sedentário submetido ao exercício físico intenso agudo no dia da eutanásia); GIII (treinado com exercício físico intenso, em repouso no dia da eutanásia) e GIV (treinado com exercício físico intenso, submetido ao exercício físico intenso agudo no dia da eutanásia). Notar aumento significativo da apoptose no GII

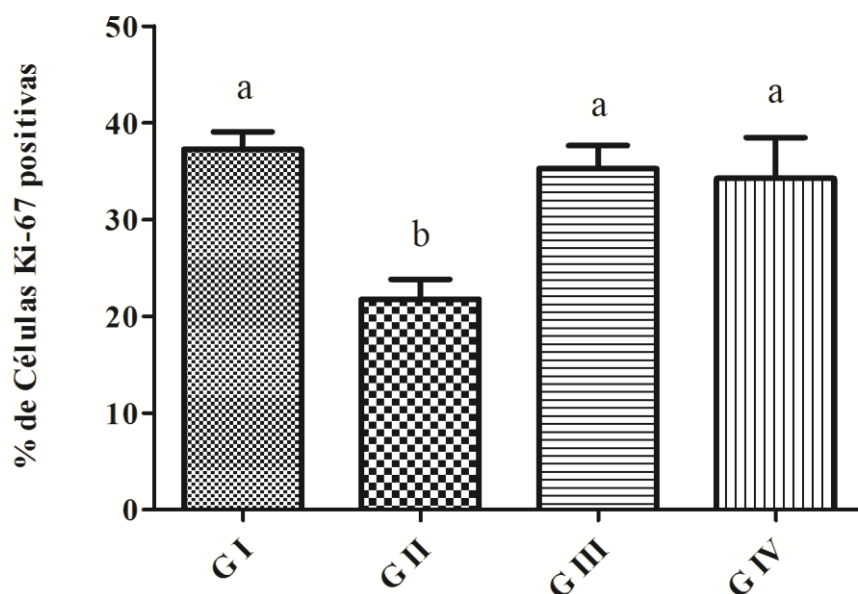


Figura 5. Índice de proliferação celular nos grupos experimentais. GI (sem atividade física); GII (sedentário submetido ao exercício físico intenso agudo no dia da eutanásia); GIII (treinado com exercício físico intenso, em repouso no dia da eutanásia) e GIV (treinado com exercício físico intenso, submetido ao exercício físico intenso agudo no dia da eutanásia). Notar redução significativa da proliferação celular no GII.

## **CAPÍTULO IV**

### **PATENTE DEPOSITADA – TANQUE DE NATAÇÃO PARA RATOS**

(Registro: BR 10 2015 030994 5)

“EQUIPAMENTO DE TREINAMENTO DE NATAÇÃO PARA ROEDORES”

#### **RELATÓRIO DESCRITIVO**

##### Campo da Invenção

[001] A presente invenção compreende um tanque portátil de treinamento de natação para roedores com altura adequada que minimiza o risco de afogamento dos animais, termostato regulável e saída de água, que permitem sua utilidade para fins de pesquisa de educação física, fármacos e processos biológicos em geral que envolvam a atividade de natação

##### Antecedentes da Invenção

[002] Atualmente, a ciência tem evoluído do campo de vista da saúde e muitos estudos (Millioni et al., 2014, *Rev Bras Med Esporte*; Bechara; Kelly, 2013, *Behav Brain Res*; Dolinsk et al., 2012, *J physiol*) vem sendo realizados em animais, para análise e pesquisa de diversos fatores associados ao exercício físico. Entre os animais mais pesquisados, estão os roedores, que são modelos de muitas pesquisas experimentais e constantemente necessitam de equipamentos para treinamento de atividades físicas.

[003] Alguns documentos foram registrados com a finalidade de treinamento para roedores com utilização de outros equipamentos. O documento PI 1105195-7 A2 (Equipamento para treinamento de roedores), encontrado no estado da técnica, diferencia-se da presente invenção por se tratar de um equipamento que possibilita o treinamento de roedores através de corrida em esteira motorizada. Outro documento (CN101283675/A – Positive exercise training device for stimulating weightless tail suspended rats) foi encontrado, porém, como o citado anteriormente, possui características de equipamento de treino de ratos em solo, diferentes das características da presente invenção, que destaca-se como equipamento que utiliza o ambiente aquático para treino de exercício físico para roedores de pequeno porte.

[004] Diversos estudos científicos (Bruder-Nascimento et al., 2014, *Neurochem Res*; Matsui et al., 2015, *Int J Neurosc*; Alomari et al., 2015, *Int J Neurosc*; Falcai et al., 2015, *Biomed Res Int*) apresentaram a natação como opção de treinamento para roedores (especialmente ratos e camundongos) em pesquisas que envolvem educação física, fármacos e processos biológicos em geral. Apesar de bastante utilizados, os tanques de natação pra roedores não possuem padronizações de medidas adequadas e apresentam características técnicas muito heterogêneas. A ausência de locais e recipientes adaptados ao treinamento animal tanto pode interferir em dados do experimento, como deixar de apresentar características importantes para o bem-estar animal, como excesso de luz (prejudicial ao animais de hábitos noturnos) e ambientes com risco de lesões e morte. É necessário que o produto utilizado para treinamento de roedores minimize os riscos de afogamento, hiper ou hipotermia e seja propício para a higiene na troca da água utilizada durante o treino.

[005] Dentro do contexto da importância do estudo experimental na ciência do exercício físico e da minimização de riscos à saúde do animal treinado, bem como da melhora da qualidade e controle do processo experimental, a presente invenção surge como uma alternativa que viabiliza o experimento e, ao mesmo tempo, preocupa-se com o bem-estar animal durante experimentos com natação.

#### Descrição da Invenção

[006] A invenção poderá ser melhor compreendida através da seguinte descrição detalhada, em consonância com as figuras em anexo, com legendas abaixo descritas:

[007] FIGURA 1. ESQUEMA COMPLETO DO EQUIPAMENTO DE TREINAMENTO DE NATAÇÃO PARA ROEDORES

[008] FIGURA 2. ESQUEMA DA VISTA SUPERIOR DO ITEM 5 DA FIGURA 1

[009] A invenção compreende um tanque de material plástico, preferencialmente de polietileno ou cloreto de vinila, com uma altura preferencialmente de 70 cm (1), podendo variar entre 55 e 85cm e diâmetro preferencialmente de 63 cm, podendo variar entre 50 e 70 cm. Em uma de suas bordas, possui o acoplamento de um termostato com ajuste de temperatura preferencialmente digital (2), conectado a uma placa de aquecimento de água preferencialmente do mesmo lado de comprimento preferencialmente de 51cm, podendo vaiar de 45 a 60 ou a sua



estrutura vertical ou extensional no tanque (3). Ao seu redor, possui um dispositivo cilíndrico preferencialmente de policloreto de vinila (4) que emerge até seu ponto mais alto ou até 15 cm além do limite superior da água. No seu interior, contém um assoalho preferencialmente do mesmo material do tanque (cloreto de vinila) (5), removível e perfurado por aberturas ou rasgaduras que podem variar entre e 0,3 e 0,6 cm, mas preferencialmente de 0,5cm. Tal assoalho deve ser encaixado preferencialmente a 9 cm de altura do seu fundo, podendo variar de 06 a 12 cm. Entre o fundo do tanque e seu assoalho há uma torneira (6) preferencialmente a 3cm acima do fundo do tanque, podendo variar de 02 a 05cm, que pode ou não ser acoplada a um cano de saída de água. O nível adequado da água possui um indicativo (7) desenhado na superfície interna do tanque para a referência de natação preferencialmente de 36 cm para de roedores de pequeno porte, podendo variar de 20 a 60 cm, dependendo do animal.

[010] As principais vantagens da presente invenção abrangem os seguintes aspectos: 1) Material externo denso e opaco que evita a passagem de luz e propicia um ambiente com menos claridade e conforto para os animais, já que os roedores são animais de hábitos noturnos. 2) Possuir um termostato acoplado a placa de aquecimento (3) que permite o controle de temperatura e evita, assim, hipotermia ou hipertermia no animal, fatores que quando não bem ajustados, podem alterar parâmetros experimentais e prejudicar a saúde dos roedores. 4) Proteção da placa de aquecimento de água, que evita queimadura no animal e permite que ele nade com segurança. 5) Assoalho removível que permite depósitos de pequenos sedimentos no fundo do tanque, e pode ser limpo após sua retirada. 6) Saída de água acessível ao pesquisador/profissional para troca de água sistemática, com dispositivo que evita contaminação da água de treinamento e facilita a sua retirada pelo pesquisador. 7) Diminuição da possibilidade de lesão ou morte dos roedores durante os experimentos agudos e/ou crônicos de natação, pois o presente dispositivo possui um indicativo para altura da água suficientemente adequado que permite o animal ir até o fundo e voltar à superfície.

## REIVINDICAÇÕES

[011] “Equipamento de treinamento de natação para roedores” caracterizado pelo fato de compreender: um tanque cilíndrico (1) para realização de natação de roedores com placa de aquecimento de água, termostato, proteção contra queimaduras, saída de água, indicativo de nível de água e assoalho removível.

[012] “Equipamento de treinamento de natação para roedores”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da estrutura do tanque cilíndrico do equipamento ser composta por material denso que escurece o ambiente aquático, proporcionando melhor adaptação do animal ao meio.

[013] “Equipamento de treinamento de natação para roedores”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da parte interna do equipamento possuir um termostato ajustável (2) acoplado que permite a monitorização e ajuste da temperatura aquática mais adaptada ao roedor.

[014] “Equipamento de treinamento de natação para roedores”, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de ter uma placa de aquecimento (3) conectada ao termostato.

[015] “Equipamento de treinamento de natação para roedores”, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por possuir, em torno da placa de aquecimento, uma proteção cilíndrica (4) de material resistente para evitar lesões térmicas aos animais.

[016] “Equipamento de treinamento de natação para roedores”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de haver um assoalho removível com aberturas vazadas (5) que permitem o depósito de pequenos sedimentos no fundo do tanque e assim, permitir a remoção deste sedimento.

[017] “Equipamento de treinamento de natação para roedores”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela torneira com abertura para saída de água do tanque(6) embaixo do assoalho.

## RESUMO

“EQUIPAMENTO DE TREINAMENTO DE NATAÇÃO PARA ROEDORES”. A presente invenção trata-se um tanque portátil de treinamento de natação para roedores com indicação para altura adequada do nível de água, que minimiza o risco de afogamento e morte dos animais, termostato ajustável, para controle e ajuste de temperatura adequada do meio aquático com proteção contra choque e lesões por aquecimento. Além destes, possui assoalho removível com aberturas para depósito de pequenos sedimentos e torneira para saída de água, que facilitam a limpeza durante e após o treino de natação. O tanque é útil para fins de pesquisa de educação física, fármacos e processos biológicos em geral que envolvam a atividade de natação.

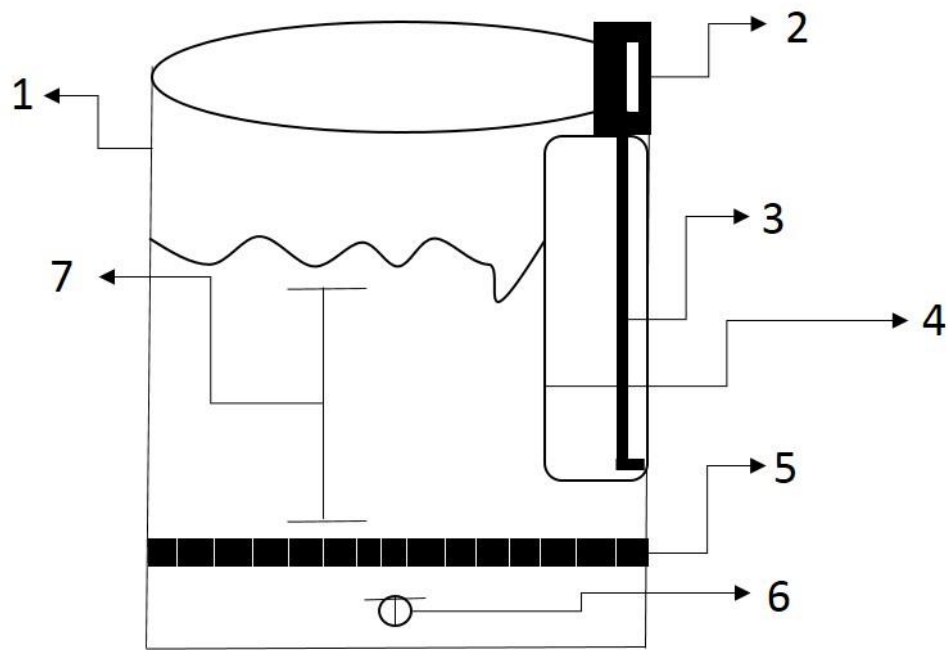


FIGURA 1

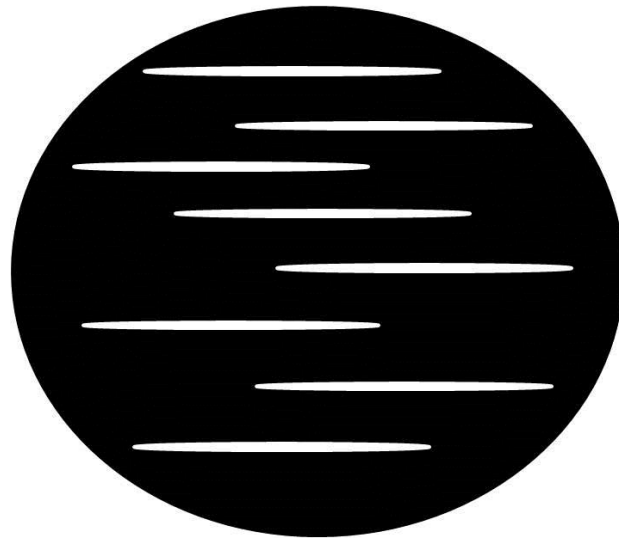


FIGURA 2

## CONCLUSÕES

O exercício físico intenso realizado agudamente e não treinado previamente tem um maior poder de depleção dos hormônios sexuais, prolactina e da melatonina e exacerbação do cortisol.

Um protocolo de exercício físico intenso crônico parece exercer um efeito contrário sobre os hormônios, fato que sugere uma adaptação histológica ovariana ao exercício

A expressão de marcadores inflamatórios foi significadamente aumentada em células ovarianas de ratas treinadas com exercício físico intenso crônico, porém tais reações não foram capazes de causar morte celular, provavelmente, por mecanismos adaptativos de regeneração celular.

O exercício intenso realizado de forma aguda e não treinado previamente parece ter um forte impacto na histofisiologia reprodutiva feminina, com maiores danos celulares e menores prognósticos de recuperação histológica ovariana.