
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO MOVIMENTO

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NO CONTROLE VASCULAR
DE RATOS ENVELHECIDOS**

RAFAEL ANTUNES NICOLETTI

Bauru

2022

RAFAEL ANTUNES NICOLETTI

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NO CONTROLE VASCULAR DE
RATOS ENVELHECIDOS**

Dissertação de mestrado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
do Movimento, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Profº Drº Anderson Saranz Zago

Bauru

2022

Nicoletti, Rafael Antunes.

Efeitos do exercício físico no controle vascular de
ratos envelhecidos/ Rafael Antunes Nicoletti, 2022
38 f. : il.

Orientador: Anderson Saranz Zago

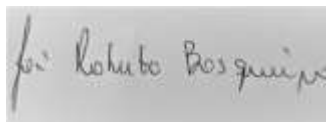
Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual
Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Unesp). Faculdade
de Ciências, Bauru, 2022

1. Envelhecimento. 2. Exercício físico. 3.
Velocidade de onda de pulso. 4. Histologia. I.
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita
Filho". Faculdade de Ciências. II. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE RAFAEL ANTUNES NICOLETTI, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO MOVIMENTO, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS.

Aos 04 dias do mês de outubro do ano de 2022, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de RAFAEL ANTUNES NICOLETTI, intitulada **Efeitos do exercício físico no controle vascular de ratos idosos..** A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. ANDERSON SARANZ ZAGO (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Educacao Fisica / UNESP - Faculdade de Ciências de Bauru - SP, Prof. Dr. JOSE ROBERTO BOSQUEIRO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Educação Física / Faculdade de Ciências de Bauru - UNESP, Prof. Dr. ROGERIO BRANDAO WICHI (Participação Virtual) do(a) Centro de Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade Federal de Sergipe, Prof. Dr. BRUNO RODRIGUES (Participação Virtual) do(a) Departamento de estudos da atividade física adaptada - Faculdade de Educação Física / Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP - SP. Após a exposição pelo mestrando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: **APROVADO**. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. JOSE ROBERTO BOSQUEIRO



RESUMO

As mudanças fisiológicas provocadas pelo envelhecimento são conhecidas através de fatores primários geneticamente determinados ou através de fatores secundários, tais como alimentação, fumo, sedentarismo, etc. Acometendo alterações centrais e sistêmicas, apresentando implicações na saúde vascular em três mecanismos: funcionais (alteração da pressão arterial sistólica e rigidez arterial), humorais (estresse oxidativo e nitrito) e estrutural (alterações no vaso afetando a morfometria, colágeno e elastina). Contudo, a prática regular do exercício físico em especial o exercício aeróbio, é considerado como uma estratégia para prevenir e minimizar os efeitos do processo natural do envelhecimento. O treinamento aeróbio regula a função vascular através do aumento da tensão de cisalhamento, ativando as vias de síntese de NO e de defesa antioxidante, melhorando a função endotelial. O objetivo deste estudo foi avaliar através das variáveis funcionais, humorais e estruturais de vasos sanguíneos utilizando ratos wistar, as diferenças entre os grupos controles jovem e idoso envelhecidos com 16 meses de vida e o efeito preventivo do exercício aeróbio, praticado de forma contínua ao longo da fase jovem/adulta até a velhice, ou praticado somente a partir do final da fase adulta até a velhice. Os grupos envelhecidos foram divididos em três grupos: controle idoso - CI, treinado ao longo da vida - TIL e treinado tardiamente - TIT. O protocolo de treinamento aeróbio foi composto de 8 semanas para o grupo idoso tardio e 61 semanas para o grupo idoso treinado ao longo da vida. Foram avaliados durante o protocolo experimental, peso corporal e capacidade física máxima; ao final do protocolo as análises funcionais de pressão arterial direta - PA e rigidez arterial - VOP, humorais de nitrito plasmático - NO e estresse oxidativo - TBARS, morfometria e colágeno nas artérias aorta torácica, carótida e femoral para verificar razão parede/luz, espessura e colágeno. Após as análises podemos afirmar que o peso corporal dos animais envelhecidos e jovens não obtiveram diferenças estatísticas ($p < 0,05$) quando comparado ao momentos inicial, após 8 semanas e ao final do protocolo de 61 semanas, em contrapartida a capacidade máxima dos animais TIL, obtiveram diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos controles jovem e idoso após 8 semanas de protocolo e diferenças quando comparamos a capacidade física dos treinados após 61 semanas TIL x TIT, demonstrando uma melhor capacidade para o grupo treinado ao longo da vida. Análises funcionais da PA e VOP, demonstraram que o grupo TIL apresentou diferença obtendo redução da VOP quando comparado ao grupo CI ($p = 0,002$), análises humorais de NO e TBARS, demonstram que o grupo treinado TIT, obteve redução do estresse oxidativo quando comparado aos grupos CJ e CI ($p = 0,009$ e $p = 0,046$, respectivamente). Análise da morfometria demonstrou uma redução significativa na relação parede/luz e espessura das artérias aorta torácica e carótida quando comparados os grupos CJ e TIL vs CI ($p < 0,05$), análise de colágeno da artéria aorta torácica, demonstrou que ambos os grupos treinados TIL e TIT, obtiveram uma redução de colágeno arterial quando comparado ao grupo CI ($p = 0,013$ e $p = 0,021$, respectivamente), entretanto apenas o grupo TIT apresentou redução de colágeno na artéria carótida quando comparado ao grupo CI ($p = 0,034$). Conclui-se com este estudo que ratos wistar com 16 meses de vida apresentam alterações estruturais dos vasos sanguíneos, aumento da espessura e razão parede/luz, quando comparados a ratos jovens, no entanto, o treinamento físico ao longo da vida obteve maior capacidade física, diminuiu valores de VOP, diminuiu a espessura das artérias aorta e carótida, diminuiu a razão parede/luz das artérias aorta e carótida e obteve menores níveis de colágeno da artéria aorta, quando comparado ao grupo controle idoso, o treinamento físico tardio obteve diminuição dos valores TBARS quando comparado aos grupos controles, e menores níveis de colágeno nas artérias aorta e carótida, quando comparado ao grupos controle idoso.

PALAVRAS CHAVE: Envelhecimento, exercício físico, exercício aeróbio, velocidade de onda de pulso, histologia.

ABSTRACT

The physiological changes caused by aging are known through primary genetically determined factors or through secondary factors, such as diet, smoking, sedentary lifestyle, etc. Affecting central and systemic changes, with implications for vascular health in three mechanisms: functional (change in systolic blood pressure and arterial stiffness), humoral (oxidative stress and nitrite) and structural (changes in the vessel affecting morphometry, collagen and elastin). However, the regular practice of physical exercise, especially aerobic exercise, is considered as a strategy to prevent and minimize the effects of the natural aging process. Aerobic training regulates vascular function by increasing shear stress, activating NO synthesis and antioxidant defense pathways, improving endothelial function. The objective of this study was to evaluate, through the functional, humoral and structural variables of blood vessels using Wistar rats, the differences between the young and elderly control groups aged at 16 months of age and the preventive effect of aerobic exercise, practiced continuously throughout the from the young/adult phase to old age, or practiced only from the end of the adult phase until old age. The aged groups were divided into three groups: aged control - CI, trained throughout life - TIL and later trained - TIT. The aerobic training protocol consisted of 8 weeks for the late elderly group and 61 weeks for the lifelong trained elderly group. During the experimental protocol, body weight and maximum physical capacity were evaluated; at the end of the protocol, the functional analyzes of direct blood pressure - BP and arterial stiffness - PWV, humoral plasma nitrite - NO and oxidative stress - TBARS, morphometry and collagen in the thoracic aorta, carotid and femoral arteries to verify wall/lumen ratio, thickness and collagen. After the analysis, we can say that the body weight of the aged and young animals did not show statistical differences ($p < 0.05$) when compared to the initial moments, after 8 weeks and at the end of the 61-week protocol, in contrast to the maximum capacity of the animals. TIL, obtained statistical difference ($p < 0.05$) between young and elderly control groups after 8 weeks of protocol and differences when we compared the physical capacity of the trained ones after 61 weeks TIL x TIT, showing a better capacity for the trained group throughout of life. Functional analyzes of BP and VOP showed that the TIL group showed a difference, obtaining a reduction in PWV when compared to the group CI ($p = 0.002$), humoral analyzes of NO and TBARS, show that the TIT trained group obtained a reduction in oxidative stress when compared to the CJ and CI groups ($p = 0.009$ and $p = 0.046$, respectively). Morphometry analysis showed a significant reduction in the wall/lumen ratio and thickness of the thoracic and carotid aorta arteries when comparing the CJ and TIL vs CI groups ($p < 0.05$), collagen analysis of the thoracic aorta artery showed that both groups trained TIL and TIT, obtained a reduction in arterial collagen when compared to the CI group ($p = 0.013$ and $p = 0.021$, respectively), however only the TIT group showed a reduction in collagen in the carotid artery when compared to the CI group ($p = 0.034$). It is concluded from this study that 16-month-old Wistar rats show structural changes in blood vessels, increased thickness and wall/light ratio, when compared to young rats, however, physical training throughout life obtained greater physical capacity, decreased PWV values, decreased the thickness of the aorta and carotid arteries, decreased the wall/lumen ratio of the aorta and carotid arteries and had lower levels of collagen in the aorta artery, when compared to the elderly control group, late physical training obtained a decrease in TBARS values when compared to the control groups, and lower levels of collagen in the aorta and carotid arteries, when compared to the elderly control groups.

KEYWORDS: Aging, exercise, aerobic exercise, pulse wave velocity, histology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	6
2 JUSTIFICATIVA.....	8
3 OBJETIVO GERAL.....	10
4 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	10
5 HIPÓTESE.....	10
6 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
6.1 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS.....	11
6.2 TESTES DE CAPACIDADE FÍSICA AERÓBIA.....	12
6.3 TREINAMENTO FÍSICO, DESENHO EXPERIMENTAL E LINHA DO TEMPO EXPERIMENTAL.....	12
6.4 ANÁLISE FUNCIONAL.....	13
6.4.1 MEDIDA DE PRESSÃO ARTERIAL DIRETA.....	13
6.4.1.2 CONFECÇÃO DE CÂNULAS E CIRURGIA DE IMPLANTAÇÃO.....	13
6.4.1.3 REGISTRO DE PRESSÃO ARTERIAL.....	14
6.4.2 MEDIDA DE RIGIDEZ ARTERIAL (VOP).....	14
6.5 EUTANÁSIA.....	14
6.6 ANÁLISE HUMORAL (BIOQUÍMICA SANGUÍNEA)	15
6.6.1 ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES DE NITRITO PLASMÁTICO.....	15
6.6.2 ANÁLISE DOS BIOMARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	15
6.7 ANÁLISE DA MORFOMETRIA E COLÁGENO ARTERIAL.....	15
6.8 ANÁLISE PROTEICA: EXPRESSÃO DA PROTEÍNA (eNOS).....	16
7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	17
8 RESULTADOS.....	17
9 DISCUSSÃO.....	26
10 CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS.....	32

APÊNCICE A – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) – “Efeitos do exercício físico e da suplementação de nitrito no controle cardiovascular de ratos idosos” registrada com o nº **281/2020** **Vol. 1**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. ANDERSON SARANZ ZAGO.

APÊNCICE B - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) – “Aulas da disciplina; Laboratório de Análise Experimental do Comportamento I”, do curso de graduação em Psicologia, registrada com o nº **1163/2018** **Vol. 1**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. FÁBIO LEYSER GONÇALVES.

1. INTRODUÇÃO

O aumento progressivo da população idosa é um fenômeno que vem ocorrendo em âmbito mundial, sendo considerado por alguns autores, um processo natural decorrente do cenário das últimas décadas, como a queda de natalidade, o aumento da expectativa de vida e a redução da mortalidade (VASCONCELOS; GOMES, 2012; MIRANDA; MENDES; SILVA, 2016). O envelhecimento pode acarretar tanto alterações biológicas quanto funcionais, tais como, aumento da fragilidade e vulnerabilidade, devido à influência dos agravos à saúde e ao estilo de vida adotado ao longo dos anos (BARBOSA et al., 2017).

As mudanças provocadas pelo envelhecimento são geralmente conhecidas, mas não se pode afirmar se são dependentes de fatores primários, presentes em todas as pessoas e geneticamente determinado ou, resultantes de fatores secundários, tais como, alimentação, fumo, ingestão de álcool, aspectos socioeconômicos e sedentarismo. A eliminação ou modificação dos fatores secundários podem proporcionar um envelhecimento saudável e um envolvimento mais ativo nas atividades diárias (FREITAS et. al., 2013; NEGRÃO et.al., 2010).

Segundo a literatura, o envelhecimento é considerado como o principal fator de risco responsável pelas doenças cardiovasculares, conseqüentemente, é também considerado como o principal fator de risco para o desenvolvimento da aterosclerose (BRANDES; FLEMING; BUSSE, 2005; NORTH; SINCLAIR, 2012).

A aterosclerose acomete alterações centrais (coração) e sistêmicas (artérias) observadas no sistema cardiovascular ao longo dos anos. No sistema central, observa-se um aumento do tecido fibroso em diversas partes do sistema de condução e redução das células auto excitáveis do nodo sinusal (LAKATTA; LEVY, 2003). No sistema arterial periférico, diversas alterações podem estar associadas à elevação da pressão arterial sistêmica (figura 1), por exemplo, a perda progressiva de tecido elástico, o acúmulo de tecido conjuntivo e o depósito de cálcio podem comprometer o enrijecimento, espessamento das artérias e a luz dos vasos (LAKATTA; LEVY, 2003; CAHILL; REDMOND, 2016). A hiperatividade simpática leva ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, que está diretamente relacionada à hipertrofia das células musculares lisas, ao espessamento da parede arterial e à disfunção endotelial. A redução da biodisponibilidade do óxido nítrico decorrente das modificações na expressão de substâncias ligadas a produção desse gás, do aumento de espécies reativas de oxigênio e da redução de substâncias antioxidante, parece ser o principal mecanismo que acomete a disfunção endotelial no envelhecimento (SEALS; DINENNO, 2004; BRANDES et al., 2005).

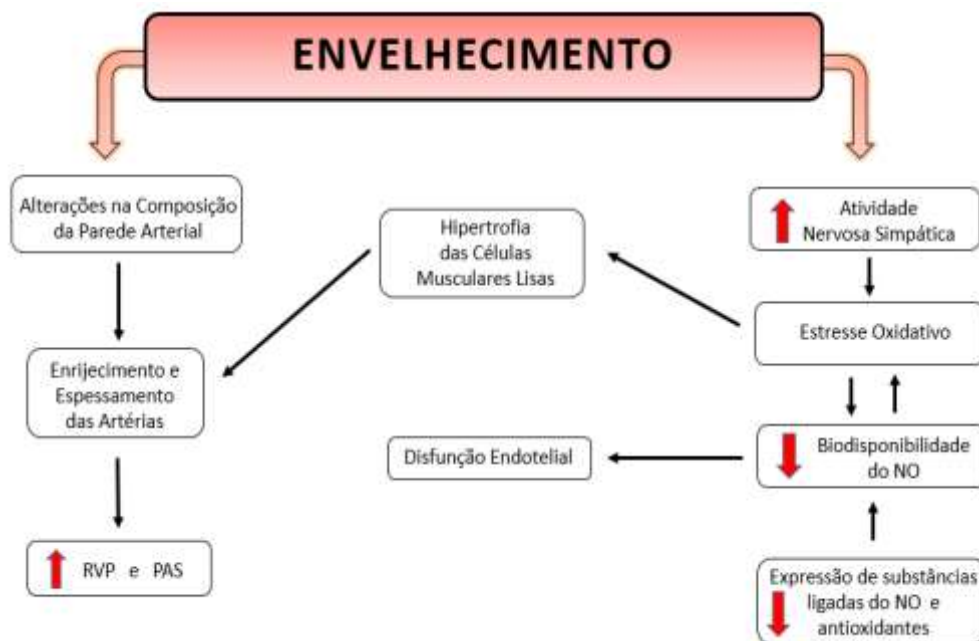


Figura 1. Principais efeitos sobre a estrutura e função cardiovascular no envelhecimento. RVP – resistência vascular periférica; PAS – pressão arterial sistólica; NO – óxido nítrico. (Adaptado de NEGRÃO et al., 2010).

A partir das considerações apontadas sobre os efeitos deletérios do envelhecimento, os estudos apresentam de forma recorrente implicações acometidas na saúde vascular em três mecanismos: funcionais (alteração da pressão arterial sistólica e rigidez arterial), humorais (alterações do perfil lipídico, estresse oxidativo e nitrito) e estrutural (acometendo alterações no vaso afetando a morfometria, colágeno e elastina).

Considerando que a população idosa vem aumentando nas últimas décadas e o impacto do envelhecimento se apresenta de forma inevitável, a prática regular do exercício físico é considerada como uma estratégia para contrapor os efeitos deletérios do processo natural de envelhecimento (NEGRÃO et al., 2010; ZAGO, 2010).

Evidências científicas sustentam a relação inversa entre a prática regular da atividade física e mortalidade prematura. Com a prática do exercício observa-se a redução de muitas doenças crônicas como doenças cardiovasculares (DCV), hipertensão arterial, derrame, osteoporose, diabetes melito tipo 2, síndrome metabólica, dislipidemias, obesidade, saúde funcional, quedas, entre outras, dessa forma, promovendo uma relação de causa-efeito entre atividade física e saúde (ACMS, 2014).

O treinamento aeróbio é um importante regulador na função vascular promovendo redução da frequência cardíaca e pressão arterial, aumento do consumo máximo de oxigênio, aumento da disponibilidade de NO, manutenção e/ou melhora da função endotelial. Tais efeitos benéficos são em detrimento do aumento da tensão de cisalhamento durante cada sessão de treino, ativando as vias de síntese de NO e de defesa antioxidante. O treinamento aeróbio contínuo melhora a aptidão

cardiorrespiratória, refletindo diretamente na capacidade de absorção, transporte, entrega e utilização de oxigênio aos tecidos ativos durante a atividade.

Estudos ressaltam que a capacidade aeróbia decresce ao longo da vida, cerca de 10% por década, em indivíduos saudáveis (TALBOT; METTER; FLEG, 2000; FLEG, 2012; SANTOS; LAROCCA; SEALS, 2014). Portanto, a prática regular do exercício físico entre adultos de meia-idade e idosos é essencial para promover um envelhecimento bem-sucedido, especialmente na população mais jovem (RUEGSEGGER; BOOTH, 2018; LIN et al., 2020).

Tais afirmações nos remete a conclusão de que quanto antes a prática regular do exercício físico for adotada, melhor serão os benefícios desta prática ao longo do processo de envelhecimento. No entanto, muitas dúvidas ainda existem na literatura com relação ao tempo de prática e o efeito preventivo do exercício no sistema cardiovascular do idoso.

Estudos demonstram que o treinamento físico de curto prazo está relacionado com o aumento da função endotelial nas artérias coronárias, enquanto a intervenção de longo prazo estaria atrelada a melhora da dilatação dependente do endotélio na aorta e nas artérias coronárias (YUNG et al., 2009). Hotta e colaboradores (2017), demonstraram em seu estudo com modelo animal, utilizando ratos jovens e idosos, que a rigidez arterial aumenta com a idade, no entanto, o treinamento físico aeróbio é capaz de reverter o aumento relacionado à idade em ratos velhos, sem alteração nos ratos jovens. Ainda, este estudo também demonstrou a melhora na função endotelial das arteríolas coronárias, revertendo a disfunção diastólica no coração envelhecido. Hanna e colaboradores (2014) demonstraram em modelo animal, também utilizando ratos jovens e idosos, que a relação colágeno-elastina da parede arterial de ratos envelhecidos não se alterou com a idade e foi reduzida com o treinamento físico. Ainda, este estudo também evidenciou que a interferência do treinamento reduz a relação parede-lúmen, aumenta a rigidez da parede e restaura a função miogênica em artérias coronárias envelhecidas.

Embora os benefícios do exercício físico para a manutenção e longevidade do processo de envelhecimento estejam bem esclarecidos na literatura, ainda há uma lacuna que busque entender a relação tempo de prática e efeitos preventivo do exercício aeróbio na saúde cardiovascular levando-se em consideração, concomitantemente, fatores funcionais, humorais e estruturais das artérias.

2. JUSTIFICATIVA

Uma vez que o envelhecimento tem sido considerado um fenômeno universal e projeções apontam que esse quadro se acentuará ainda mais, tem sido grande a preocupação por parte dos profissionais da área da saúde, sobre as alterações nos aspectos biológicos e funcionais na população idosa.

Partindo desse pressuposto, o exercício físico regular vem sendo apontado como uma ferramenta terapêutica não farmacológica eficaz para contrapor os efeitos deletérios decorrentes do envelhecimento, destacando-se o exercício físico aeróbio regular como uma excelente estratégia para controle e prevenção de doenças.

No entanto, ainda há uma carência de estudos que busque verificar o efeito preventivo do exercício físico aeróbio praticado ao longo da vida ou iniciado tardiamente, relacionando de forma concomitante variáveis funcionais, humorais, e estruturais dos vasos sanguíneos. Desta forma, este estudo possibilitará um entendimento mais completo dos mecanismos vasculares reguladores do sistema cardiovascular durante o processo natural de envelhecimento e, o efeito do exercício físico enquanto mecanismo preventivo.

De modo geral, a associação dos mecanismos relacionados com a prática de exercícios físicos aeróbios e como eles atuam no vaso sanguíneo, podem ser fatores primordiais para minimizar os efeitos deletérios relacionados ao envelhecimento. Ainda, é importante mencionar que para o projeto de pesquisa atual, a utilização do modelo animal possibilitará o estudo de forma combinada e concomitante de ambos os mecanismos.

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações acometidas pelo envelhecimento comparando jovem e idoso, e o efeito preventivo do exercício físico aeróbio, praticado de forma contínua ao longo da fase jovem/adulta até a velhice ou, praticado somente a partir do final da fase adulta até a velhice, nas variáveis funcionais, humorais e estruturais de vasos sanguíneos de ratos.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudar o efeito do envelhecimento nas variáveis funcionais de pressão arterial sistólica e rigidez arterial, nas variáveis humorais de nitrito plasmático, nitrito tecidual do ventrículo esquerdo e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e variáveis estruturais das artérias aorta torácica, carótida e femoral analisando a espessura da parede, razão parede/luz e colágeno, comparando os grupos controles de jovens e idosos;
2. Analisar se a resposta do treinamento de longo prazo (aeróbio ao longo da vida), irá trazer melhores respostas na relação entre as variáveis funcionais de pressão arterial sistólica e rigidez arterial, nas variáveis humorais de nitrito plasmático, nitrito tecidual do ventrículo esquerdo e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e variáveis estruturais das artérias aorta torácica, carótida e femoral analisando a espessura da parede, razão parede/luz e colágeno em comparação ao treinamento tardio (rato já envelhecido).

5. HIPÓTESE

1. O presente estudo espera que o rato envelhecido apresente maiores efeitos deletérios, nas variáveis estudadas, apresentando maior prejuízo na função arterial quando comparado ao rato jovem.
2. Espera-se que o período de treinamento físico aeróbio ao longo da vida irá trazer melhores benefícios na relação entre as variáveis funcionais mantendo os níveis ideais de pressão arterial sistólica e atenuar o aumento da rigidez arterial; nas variáveis humorais espera-se níveis de nitrito plasmático e teciduais aumentados corroborando com a diminuição dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; e nas variáveis estruturais das artérias aorta, carótida e femoral, espera-se a diminuição da espessura e razão parede/luz e níveis reduzidos de colágeno.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 80 ratos machos (Wistar), provenientes do Centro de Pesquisa e Produção de animais da UNESP-Botucatu com idade de seis semanas (45 dias), com peso 200 a 250 gramas. Durante o protocolo experimental, os animais foram mantidos em gaiolas com até quatro animais, no Biotério da Faculdade de Ciências da UNESP, campus de Bauru, com ração e água fornecidos *ad libitum*, em ciclo claro-escuro de 12/12 horas e temperatura controlada de 22° C. Dentre os animais, 60 ratos machos (Wistar), registrados com nº 281/2020 Vol.1, e aprovada pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) da UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho” UNESP – Faculdade de Ciências, Campus Bauru, ficaram em processo de treinamento ou controle durante seu envelhecimento até completarem dezesseis meses de vida. Para a complementação do estudo 20 ratos machos (Wistar) idosos, provenientes do Departamento de Psicologia – Faculdade de Ciências -UNESP-BAURU, ao qual os ratos foram utilizados para a disciplina do professor Dr. FÁBIO LEYSER GONÇALVES, intitulada como “Laboratório de Análises Experimental do Comportamento I”, do curso de Graduação em Psicologia, certificado registrado com o nº 1163/2018 Vol.1, e aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) da UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA ‘Júlio de Mesquita Filho’ UNESP – Faculdade de Ciências, Campus Bauru. Esses animais, após a utilização na disciplina, foram doados para esta pesquisa e permaneceram em processo de envelhecimento no biotério até completarem dezesseis meses de vida, sendo o treinamento iniciado apenas nas últimas 8 semanas de vida.

6.1- Caracterização dos grupos

Os animais foram divididos em quatro grupos (n=20/grupo), igualitariamente para peso corporal e capacidade física, sendo formados os seguintes grupos:

- CJ - Jovem controle: Ratos jovens que iniciaram o protocolo de controle (60 dias) e foram eutanasiados após 8 semanas ($\cong$ 4 meses) permanecendo sedentários ao longo de todo o período;
- CI – Idoso sedentário controle: Ratos idosos que foram eutanasiados após 61 semanas (16 meses) e que permaneceram sedentários ao longo de todo o período;
- TIL – Idosos treinados ao longo da vida: Ratos idosos que foram eutanasiados após 61 semanas (16 meses) e que iniciaram o treinamento aeróbico com 08 semanas (60 dias) e permaneceram com o treinamento até a eutanásia;
- TIT – Idosos treinados tardiamente: Ratos idosos que foram eutanasiados após 61 semanas (16 meses) e que permaneceram sedentários durante a idade adulta e iniciaram o treinamento aeróbico de

8 semanas, após 53 semanas (14 meses) permanecendo com o treinamento até a eutanásia.

Ao final do procedimento, cada grupo foi dividido em dois subgrupos, após a perda amostral de 19 animais, os grupos mantiveram a seguinte composição: CJ (n=9), CI (n=7), TIL (n=8) e TIT (n=7) foram utilizados para análises funcionais e humorais (pressão arterial sistólica, rigidez arterial, nitrito plasmático, nitrito tecidual do ventrículo esquerdo e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e CJ (n=9), CI (n=7), TIL (n=7) e TIT (n=7) para análises histológicas (morfometria da espessura da parede, razão parede/luz e quantificação de colágeno das artérias aorta torácica, carótida e femoral).

6.2- Testes de Capacidade Física Aeróbia

O teste de esforço máximo aeróbio foi realizado em uma esteira ergométrica (modificada para ratos, possuindo 10 raia suspensas de ferro, Inbramed, Millennium). Inicialmente os animais passaram por uma adaptação por um período de 10 dias. Em seguida, todos os animais realizaram o teste de esforço máximo (TEM), por meio do protocolo que preconiza aumento de 3m/min a cada 3 minutos de exercício na esteira até exaustão, determinando assim a capacidade física máxima de forma indireta (BAREL et al, 2010; HERRERA et al, 2020).

6.3- Treinamento Físico, Desenho Experimental e Linha do Tempo Experimental.

Foi utilizada para ambos os treinamentos a intensidade de 50-60% da velocidade máxima atingida no teste de TEM (BAREL et al., 2010; HERRERA, et al., 2020). A figura 1 ilustra o protocolo experimental de 8 semanas desempenhado pelos animais do grupo CJ e TIT.

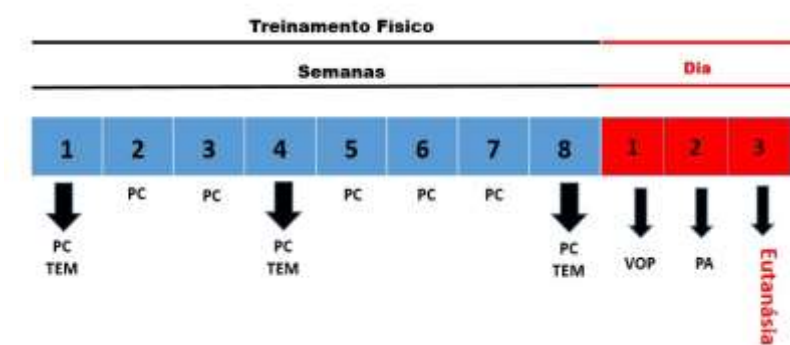


FIGURA 1: Protocolo Experimental de treinamento físico – 8 semanas (PC – peso corporal; TEM – Teste de capacidade máxima; VOP – Velocidade de onda de pulso; PA direta – Registro de Pressão Arterial).

O desenho do protocolo experimental de 61 semanas desempenhado pelos animais dos grupos CI e TIL está ilustrado da figura 2 e 3.

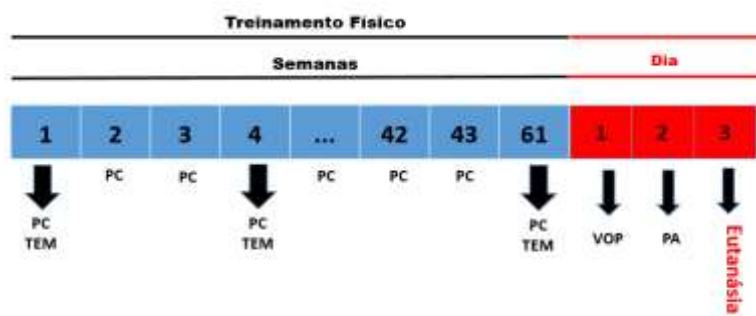


FIGURA 2: Protocolo Experimental de treinamento físico-61semanas (PC – peso corporal; TEM – Teste de capacidade máxima; VOP – Velocidade de onda de pulso; PA direta – Registro de Pressão Arterial).

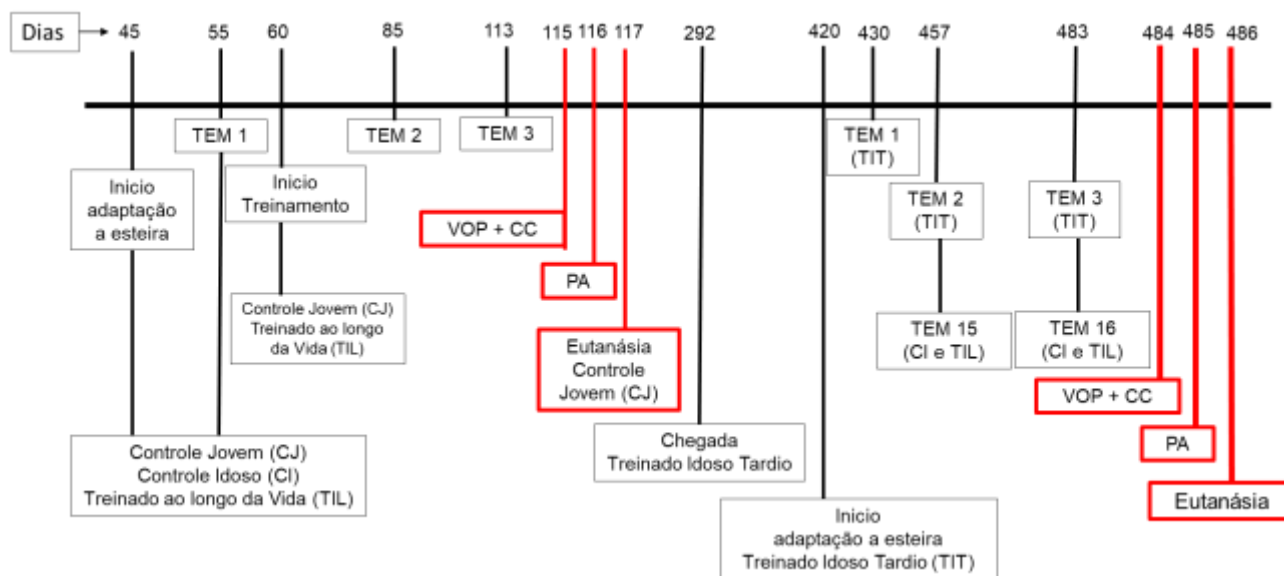


FIGURA 3: Linha do Tempo Experimental - (PC – peso corporal; TEM – Teste de capacidade máxima; VOP – Velocidade de onda de pulso; CC – Cirurgia de Canulação; PA direta – Registro de Pressão Arterial).

6.4- Análise Funcional

6.4.1 – Medida de Pressão Arterial Direta

A realização da medida de pressão arterial ocorreu na última semana do protocolo experimental. O método utilizado foi a pressão arterial direta.

6.4.1.2 – Confeção de cânulas e Cirurgia de implantação

Para este procedimento foram confeccionadas cânulas utilizando tubos de polietileno, Tygon PE 50 (Scientific Commodities Inc.) e Tygon PE 10 (Scientific Commodities Inc), que foram previamente soldados.

Os animais foram anestesiados com ANASEDAN (cloridrato de xilasina, 10mg/kg), e DOPALEN (cloridrato de Cetamina, 50mg/Kg), CEVA, Paulínia, SP, Brasil (na proporção 1:1, 1 mg/kg de peso corporal) posteriormente ao procedimento anestésico, foram posicionados de decúbito ventral e realizada uma incisão e dissecação da artéria femoral esquerda, após a cirurgia a cânula foi exteriorizada na região dorsal do animal. Em procedimento pós-operatório, com o objetivo de analgesia foi aplicado anti-inflamatório flunixinina (Banamine 2,5 mg/kg, i.m.).

6.4.1.3 – Registro de pressão arterial

Após 24h do procedimento cirúrgico, com os animais devidamente acordados foi registrada a pressão arterial direta, pela ligação da cânula da artéria femoral ao sistema de registro (transdutor + pré-amplificador, AD instruments®) em média de trinta a quarenta minutos, e após 24h análise foi realizada através de um computador (software Lab Chart Pro).

6.4.2- Medida de Rigidez Arterial (VOP)

Para análise das medidas de rigidez arterial os animais foram submetidos a um protocolo padronizado e validado por Fabricio et al. (2020), protocolo não invasivo para a avaliação da rigidez arterial em ratos, os animais foram anestesiados com ANASEDAN® (cloridrato de xilasina, 10mg/Kg), CEVA e DOPALEN® (cloridrato de quetamina, 50mg/Kg), VETBRANDS do Brasil (na proporção de 1:1, 0,1mg / 100g de peso corporal) e posicionados em decúbito ventral, sobre uma cama aquecedora. Com um dos sensores posicionados acima do cotovelo, especificamente no antebraço direito e o outro acima do joelho do animal. Foi avaliada a diferença da VOP entre membros superiores e inferiores, pelo dispositivo para animais de pequeno porte (popmètre). A velocidade da onda de pulso foi analisada pelo software pOpMET 1.0 (TousDroits reserves®, Axelif SAS 2013), ajustado de acordo com a distância medida entre os sensores (FABRICIO et al., 2020).

6.5- Eutanásia

Os animais foram anestesiados com ANASEDAN® (cloridrato de xilasina, 20mg/kg), e DOPALEN® (cloridrato de ketamina, 160mg/kg), VETEBRANDS do Brasil (proporção de 1:1, 0,1mg/100g de peso corporal). Após a anestesia foram utilizados dois métodos diferentes: decapitação para os animais que foram utilizados para a análise humoral e proteica, e para a técnica histológica, através da perfusão do ventrículo esquerdo, descrita posteriormente.

6.6- Análise Humoral (Bioquímica Sanguínea)

6.6.1 - Análise das Concentrações de Nitrito Plasmático

Após o procedimento de eutanásia pelo método de decapitação, foram coletados 5 ml de sangue e o tecido cardíaco (ventrículo esquerdo), para análise das concentrações de nitrito plasmático. Após a coleta, o sangue foi imediatamente centrifugado a 4000 rotações por minuto ao longo de 5 minutos e o plasma foi armazenado em um freezer -80°C. Após a centrifugação, a solução contendo as alíquotas de plasma foram analisadas em duplicata quanto às concentrações de nitrito usando o método de quimioluminescência redutiva à base de ozônio e posteriormente foi avaliada por um analisador de quimioluminescência de fase gasosa (analisador Sievers Modelo 280 NO; Boulder, CO, EUA), conforme descrito previamente (PINHEIRO et al., 2020; SANCHES-LOPES et al., 2020).

6.6.2 - Análise dos biomarcadores do Estresse Oxidativo.

Para investigarmos os biomarcadores do estresse oxidativos a análise utilizada permitiu a quantificação da presença de TBARS nas amostras. Foi adicionada 750µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (P/V) a 250µL de amostra de plasma para que ocorra a reação. O TCA teve a função de desnaturar as proteínas presentes e acidificar o meio de reação. Essa mistura foi agitada e centrifugada durante 10 minutos a 4000rpm. Retirando-se 500µL do sobrenadante e a este foi adicionada 500 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% (P/V), ao qual reagiu com os produtos da peroxidação lipídica formando um composto de coloração rosada. A mistura foi incubada por 30 minutos a 100°C e em seguida resfriada em gelo, após ocorreu a leitura da absorbância a 535nm em espectrofotômetro (Biospectro).

6.7 – Análise da Morfometria e colágeno da Artéria Torácica, Artéria Carótida e Artéria Femoral, através da Técnica Histológica.

Para análise da morfometria e colágeno arterial foi realizada a eutanásia por meio do procedimento anestésico descrito anteriormente e logo após a parada cardíaca respiratória foi

realizado a incisão ventral, na linha mediana da região torácica com abertura pelo tórax, para exposição do coração. Os animais foram perfundidos através do ventrículo esquerdo, introduzindo uma agulha no ventrículo esquerdo e imediatamente após foi realizado uma abertura do átrio direito para extravasamento do sangue. A perfusão foi realizada por uma bomba peristáltica, realizando a perfusão com ~100ml de solução salina estéril e posteriormente com ~500 ml de solução paraformaldeído a 4% tamponado com PBS (em capela com exaustão). Posteriormente ao procedimento de perfusão foi realizada a dissecação para a retirada dos vasos: aorta torácica mediana, artéria carótida e artéria femoral esquerda.

Após a remoção, os segmentos arteriais foram pós-fixados em solução de paraformaldeído tamponado com 4% durante 48 horas. Em seguida os tecidos foram desidratados em sequência crescente de etanol e xilol (70%, 95% (2x), 100%(3x) e Xilol (3x) e emblocados em parafina. Na sequência, foram realizados cortes transversais de 5 μ m (morfometria) e 7 μ m (colágeno) e para cada amostra de tecido foram confeccionadas três lâminas com nove cortes semi-seriados em cada uma, totalizando vinte e sete cortes/tecidos. A montagem dos cortes foi realizada entre lâmina e lamínula, que foram submetidos às técnicas de coloração por método Weigert, por Hematoxilina-eosina, para evidênciação dos componentes celulares (HERRERA et. al, 2020).; e, por Picro-Sirius red, para a diferenciação dos tipos de fibra colágeno tipo I (cora-se em vermelho vivo) (CURY et al., 2018). Para análise e fotografia das imagens foi utilizado um microscópio Leica DM 4 B (Leica Microsystems, GmbH, Wetzlar, Alemanha) com aumento de 2,5x para análise morfométrica da aorta torácica, carótida e femoral e aumento de 20x e 40x para área de deposição de colágeno da aorta torácica e aorta carótida e femoral respectivamente. Todas as análises off-line (software ImageJ) foram realizadas às cegas para evitar qualquer má interpretação.

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estatísticos descritivos foram relatados em média e $\pm$ desvio padrão (DP). Para a análise da estatística indutiva, o teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para testar a distribuição normal dos dados, análise de variância de um caminho (ANOVA) com pós-teste de Tukey foi utilizada para os dados que apresentaram normalidade ($p < 0,05$), caso contrário análise de Kruskal-Wallis foi utilizada para detectar tais diferenças, com nível de significância de $p < 0,05$.

8. RESULTADOS

8.1 Peso Corporal

A figura 4 apresenta os valores de peso corporal dos animais, no momento inicial (4A), no

momento após 8 semanas (4B) e final do protocolo experimental após 61 semanas (4C). Os grupos não apresentaram diferenças significativas entre eles, somente quando comparamos os momentos pré e pós o programa.

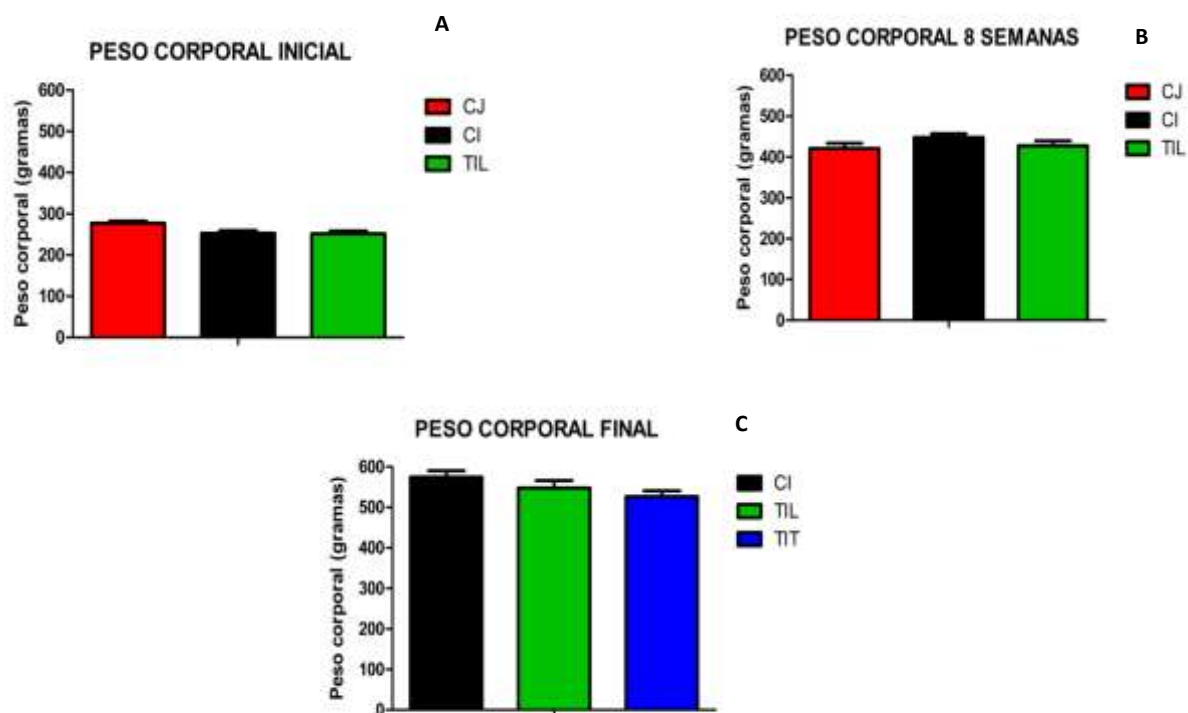


Figura 4: Peso corporal inicial (4A); Peso corporal após 8 semanas (4B); Peso corporal após 61 semanas (4C), em g grupos: Controle Jovem (CJ); Controle Idoso (CI); Treinado Idoso ao Longo da Vida (TIL); e Treinado Idoso Tardamente (TIT). $p < 0,05$.

8.2 Capacidade Física Máxima

A capacidade física máxima para os animais dos grupos, Controle Jovem (CJ) e Treinado Idoso Tardamente (TIT), foram avaliados em três momentos distintos (início, 4 semanas e 8 semanas do protocolo), e para os grupos, Controle Idoso (CI) e Treinados ao Longo da vida (TIL), foram realizadas as avaliações da capacidade física máxima em 16 momentos do protocolo (início, 4,8,12,16,22,26,30,34,38,42,46,50,54,58 e 61 semanas).

No momento do protocolo inicial para os grupos CJ, CI e TIL (Figura 5A), não foi constatada diferenças estatísticas entre os grupos, confirmando que os grupos eram homogêneos.

Os resultados apresentados na avaliação após 8 semanas (Figura 5B), demonstrou que o grupo que realizou treinamento físico aeróbio, obteve aumento da capacidade física dos animais.

A avaliação da capacidade física máxima dos animais que realizaram o processo de envelhecimento após 61 semanas (Figura 5C), demonstrou que ambos os grupos treinados obtiveram aumento da capacidade física em relação ao grupo controle idoso (CI) e, ao compararmos os grupos treinado ao longo da vida e tardiamente, o grupo treinado idoso ao longo da vida (TIL) possui maior

capacidade física máxima em relação ao grupo treinado idoso tardiamente (TIT).

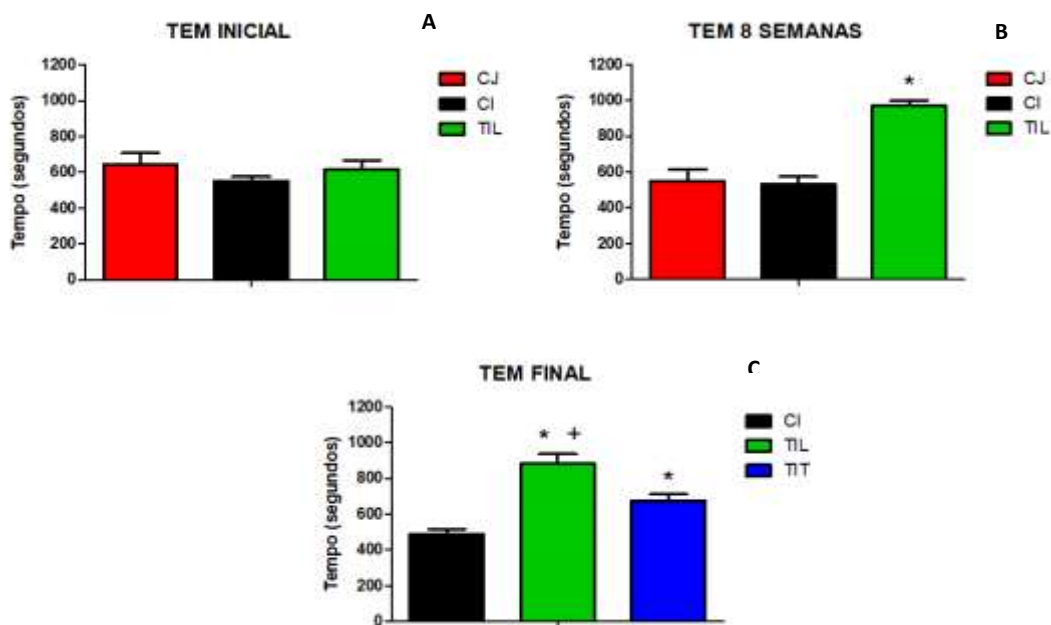


Figura 5: Teste de Capacidade Máxima (TEM); Grupos: Controle Jovem (CJ); Controle Idoso (CI); Treinado idoso ao Longo da vida (TIL); Treinado Idoso Tardiamente (TIT). Significância: * vs sedentário e + vs TIT; $p < 0.05$.

Os resultados das avaliações da capacidade física máxima dos animais, que foram avaliados em três momentos distintos ou para os grupos que realizaram as avaliações em dezesseis momentos do protocolo, estão representados através de uma linha do tempo (Figura 6), demonstrando que todos os grupos não apresentavam diferenças significativas entre eles no momento inicial do protocolo.

Após o início da intervenção do treinamento físico, o grupo treinado idoso ao longo da vida demonstrou um aumento exponencial da capacidade física máxima até a décima sexta semana de treinamento, atingindo a média de 1099 segundos e, após este ápice, apresentou uma queda gradativa, mas sempre com níveis superiores aos demais grupos estudados (CI vs TIL, $p < 0,001$; CI vs TIT, $p < 0,011$).

O grupo treinado idoso tardiamente, iniciou seu protocolo de forma tardia, demonstrando uma capacidade física máxima inicial, próxima dos grupos controles e após a intervenção do treinamento físico, demonstrou uma evolução em sua capacidade física, mas abaixo dos níveis do grupo treinado idoso ao longo da vida, obtendo uma média de capacidade física máxima ao final do protocolo de 675 segundos x 882 segundos do grupo treinado idoso ao longo da vida (TIL vs TIT, $p = 0,004$).

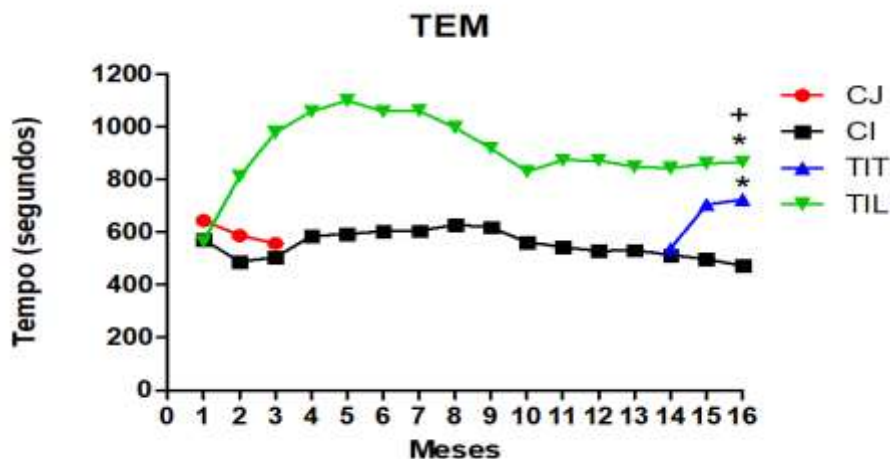


Figura 6: Linha do tempo do Teste de Capacidade Máxima (TEM); Grupos: Controle Jovem (CJ); Controle Idoso (CI); treinado idoso ao Longo da vida (TIL); Treinado Idoso Tardamente (TIT). Significância: * vs sedentário e + vs TIT; $p < 0,05$.

8.3 Medida de Rigidez Arterial

A velocidade de onda de pulso (VOP), foi realizada ao final do protocolo de 8 semanas para o grupo controle jovem (CJ), e ao final do protocolo de envelhecimento para os grupos controle idoso (CI), treinado ao longo da vida (TIL) e treinado tardiamente (TIT), representada pela figura 7. As análises demonstraram que o grupo idoso treinado ao longo da vida (TIL) apresentou menores valores de VOP quando comparado com o grupo idoso controle (CI, $p=0,002$).

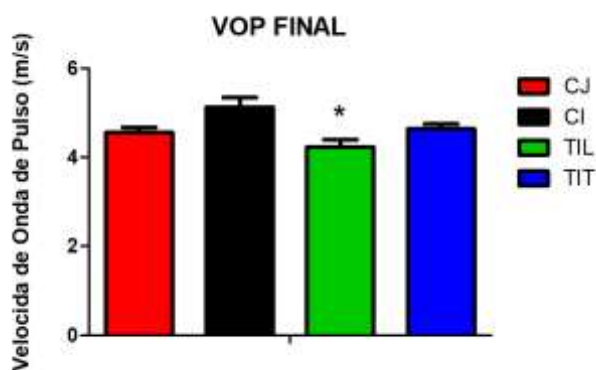


Figura 7: Velocidade de Onda de Pulso (VOP); Grupos: Controle Jovem (CJ); Controle Idosos (CI); Treinado Idosos ao Longo da vida (TIL); Treinado Idoso Tardamente. Significância: * vs controle idoso; $p < 0,05$.

8.4 Pressão arterial sistólica

A figura 8 evidencia os valores de pressão arterial sistólica (8A) ambas avaliadas ao final do protocolo, demonstrando que o treinamento físico tardio ou realizado ao longo da vida não promoveu benefícios em relação pressão arterial sistólica quando comparado com o grupo controle ($p=0,227$).

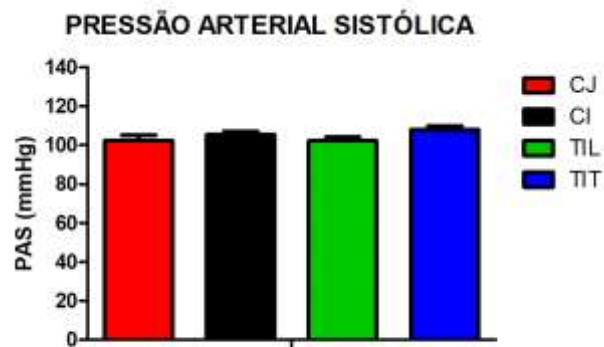


Figura 8: Pressão Arterial Sistólica (PAS); Grupos: Controle Jovem (CJ); Controle Idosos (CI); Treinado Idosos ao Longo da vida (TIL); Treinado Idoso Tardiamente (TIT). Significância: $p < 0,05$.

8.5 Concentrações Nitrito plasmático e tecidual

As concentrações de nitrito (NO_2^-) foi analisada em duas diferentes estruturas, no plasma sanguíneo (9A) e ventrículo esquerdo (tecido cardíaco) (9B). Os resultados demonstram que não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos (Figura 9).

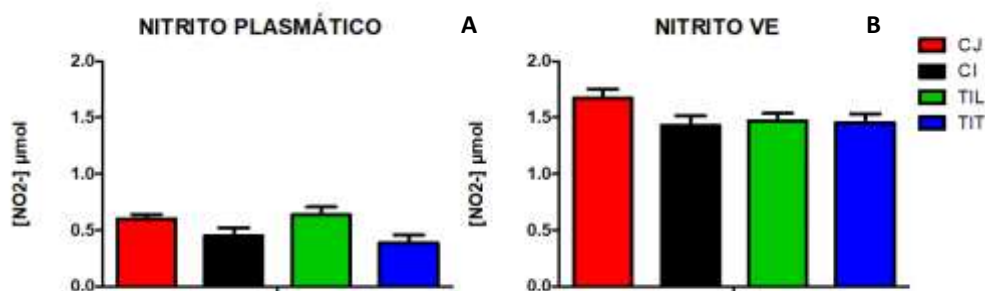


Figura 9: Nitrito Plasmático (9A), Nitrito Ventrículo Esquerdo (9B); Grupos: Controle Jovem (CJ); Controle Idosos (CI); Treinado Idosos ao Longo da vida (TIL); Treinado Idoso Tardiamente. Significância: $p < 0,05$.

8.6 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A figura 10 evidencia os valores de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS). Ao final do protocolo experimental, pode ser observada que o treinamento físico tardio (TIT) apresenta valores menores de TBARS quando se comparado com o grupo controle idoso (CI, $p=0,046$) e o grupo controle jovem (CJ, $p=0,009$), que foram mantidos sedentários.

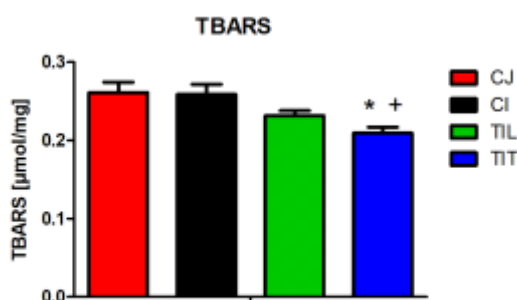


Figura 10: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); Grupos: Controle Jovem (CJ); Controle Idosos (CI); Treinado Idosos ao Longo da vida (TIL); Treinado Idoso Tardiamente (TIT). Significância: * vs controle idoso; + vs controle jovem; $p < 0,05$.

8.7 Morfometria da Relação parede/luz e Espessura da Artéria Torácica, Artéria Carótida e Artéria Femoral.

8.7.1 Aorta Torácica

A figura 11 apresenta a espessura (A), a relação parede luz (B) e os cortes histológicos corados em H.E (C) na artéria aorta, sendo possível observar que o grupo treinado ao longo da vida (TIL, $p=0,032$) e o grupo controle jovem (CJ, $p<0,001$) apresentaram valores menores de espessura arterial quando comparado com o grupo controle idoso (CI). A mesma relação acontece na variável da relação parede/luz (CI vs TIL, $p=0,011$; CI vs CJ, $p<0,001$). O grupo treinado tardio (TIT), apresentou diferenças em comparação ao grupo CJ ($p=0,001$), demonstrando que a espessura tende a aumentar com o decorrer da idade e, o programa de 8 semanas não foi eficaz em atenuar tais alterações.

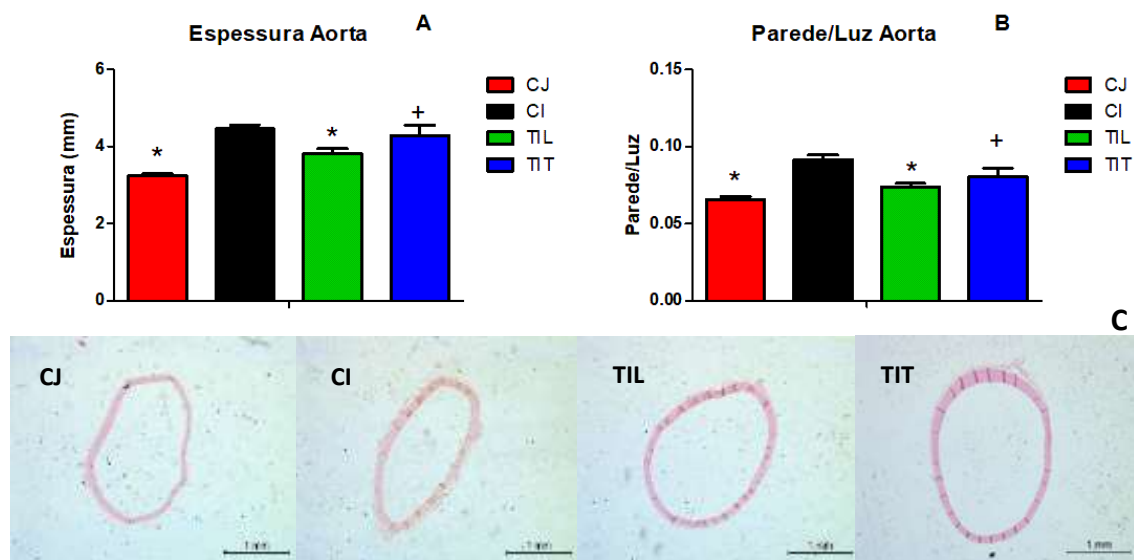


Figura 11: Espessura da aorta torácica (A), relação parede/luz (B) e fotos representativas de cortes histológicos (5µm) corados com Hematoxilina e eosina (HE), ao final do programa, em CJ (Controle jovem), CI (Controle idoso), TIL (Treinado ao longo da vida), e TIT (Treinado tardio); Diferenças significativas: * vs controle idoso; + vs controle jovem; $p < 0,05$.

8.7.2 Carótida

A figura 12 apresenta a espessura (A), relação parede luz (B) e os cortes histológicos corados em H.E (C) na artéria carótida. Em ambas as figuras o grupo treinado ao longo da vida (TIL, $p=0,011$) e o grupo controle jovem (CJ, $p=0,002$) apresentaram valores menores de espessura arterial quando se comparado com o grupo controle idoso (CI) e, a mesma relação acontece na relação parede/luz arterial. Entretanto, não foram encontradas diferenças no grupo que realizou o treinamento tardio (TIT).

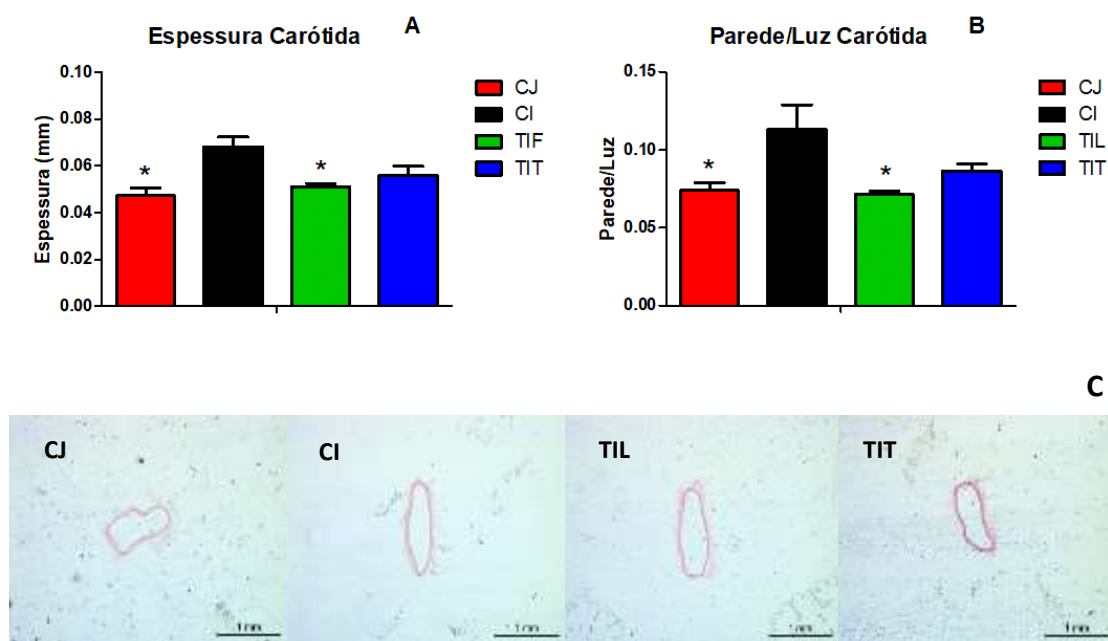


Figura 12: Espessura da aorta carótida (A), relação parede/luz (B) e fotos representativas de cortes histológicos (5µm) corados com Hematoxilina e eosina (HE), ao final do programa, em CJ (Controle jovem), CI (Controle idoso), TIL (Treinado ao longo da vida), e TIT (Treinado tardio); Diferenças significativas: * vs controle idoso; $p < 0,05$.

8.7.3 Femoral

A figura 13 demonstra os valores de espessura (A), a relação parede luz (B) e os cortes histológicos corados em H.E (C), na artéria femoral, porém não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos para tais variáveis (A, $p=0,189$; B, $p=0,414$).

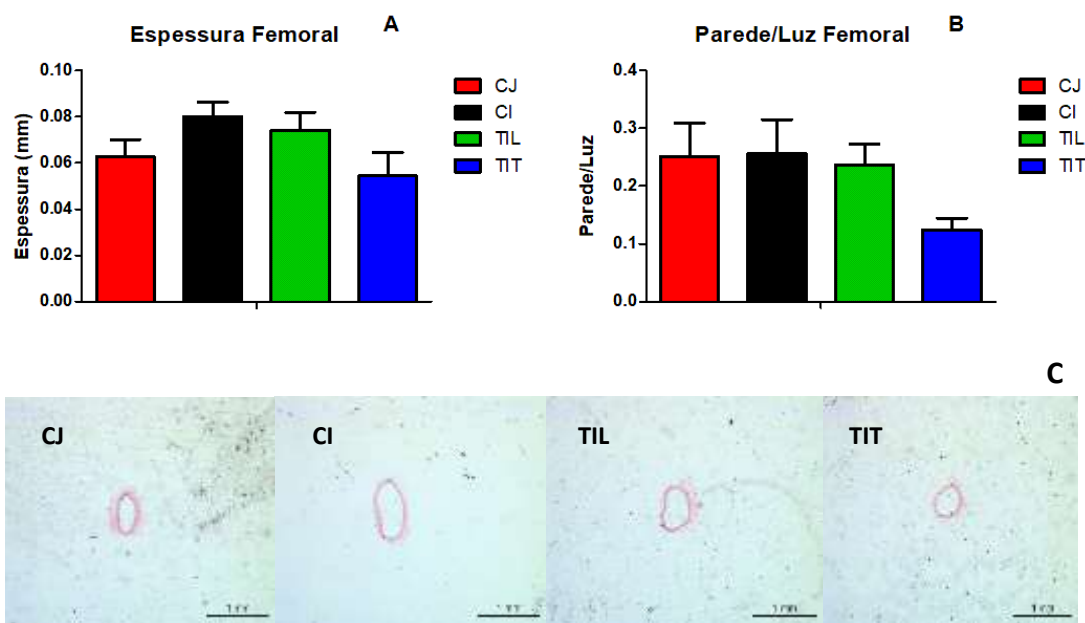


Figura 13: Espessura da aorta (A), relação parede/luz (B) e fotos representativas de cortes histológicos (5µm) corados com Hematoxilina e eosina (HE), ao final do programa, em CJ (Controle jovem), CI (Controle idoso), TIL (Treinado ao longo da vida), e TIT (Treinado tardio); $p < 0.05$.

8.8 Concentrações de Colágeno da Artéria Torácica, Artéria Carótida e Artéria Femoral.

8.8.1 Aorta Torácica

A figura 14 apresenta as concentrações de colágeno na artéria aorta (A) e os cortes histológicos corados com vermelho de picrosirius (B). Na artéria aorta podemos observar que ambos os programas de treinamento físico (TIL e TIT) apresentam valores menores de porcentagem de colágeno quando se comparado com o grupo controle idoso (CI, $p=0,013$ e $p=0,021$, respectivamente), entretanto não houve diferenças entre os grupos controles idoso e jovem ($p=0,103$), ambos mantidos sedentários.

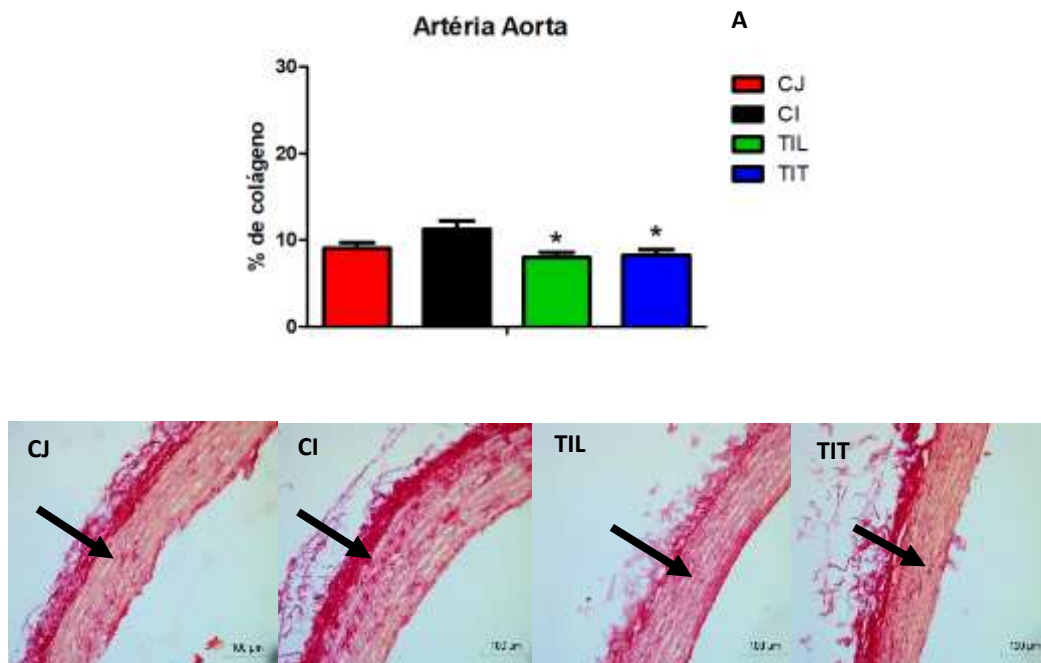


Figura 14 (A): Porcentagem de colágeno na artéria aorta (A) e fotos representativas de cortes histológicos (7µm) corados com vermelho de picrosirius (B), ao final do programa, em CJ (Controle jovem), CI (Controle idoso), TIL (Treinado ao longo da vida), e TIT (Treinado tardio); Diferenças significativas: * vs controle idoso; $p < 0,05$.

8.8.2 Carótida

A figura 15 apresenta as concentrações de colágeno na artéria carótida (A) e os cortes histológicos corados com vermelho de picrosirius (B), pode-se observar que o grupo que realizou o treinamento físico de forma tardia (TIT) apresentou valores reduzidos de porcentagem de colágeno quando se comparado ao grupo controle idoso ($p = 0,034$), porém o programa de treinamento físico realizado ao longo de toda a vida (TIL), apesar de apresentar valores percentuais menores em relação ao grupo controle idoso (CI), esta diminuição não apresentou significância ($p=0,144$).

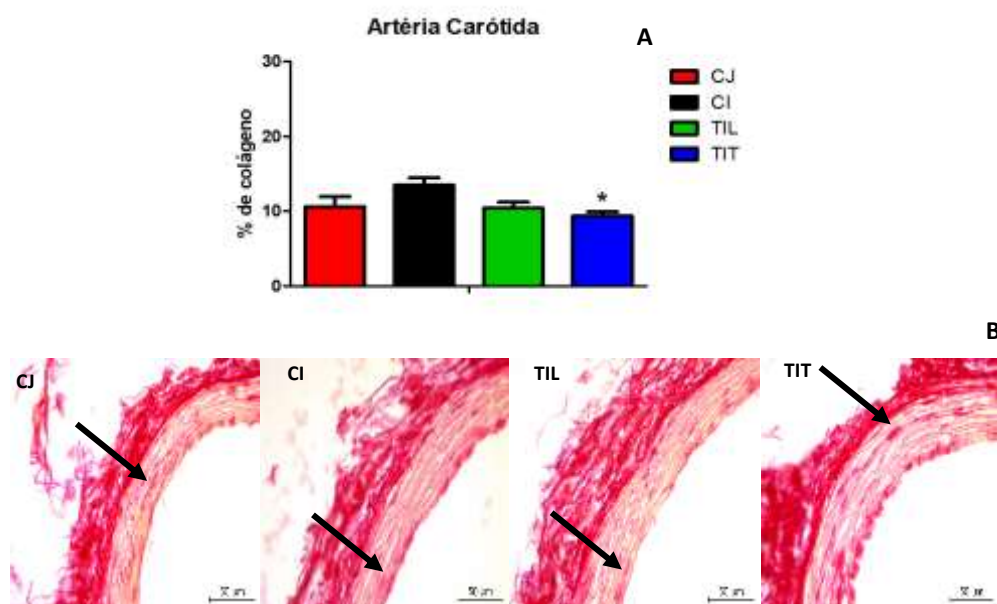


Figura 15: Porcentagem de colágeno na artéria carótida (A) e fotos representativas de cortes histológicos (7 μ m) corados com vermelho de picrosirius (B), ao final do programa, em CJ (Controle jovem), CI (Controle idoso), TIL (Treinado ao longo da vida), e TIT (Treinado tardio); Diferenças significativas: * vs controle idoso; $p < 0,05$.

8.8.3 Femoral

A figura 16 apresenta as concentrações de colágeno na artéria femoral (A) e os cortes histológicos corados com vermelho de picrosirius (B), pode-se observar que o grupo que realizou o treinamento físico ou o grupo controle, não foi encontrado diferenças entre os grupos ($p=0,969$).

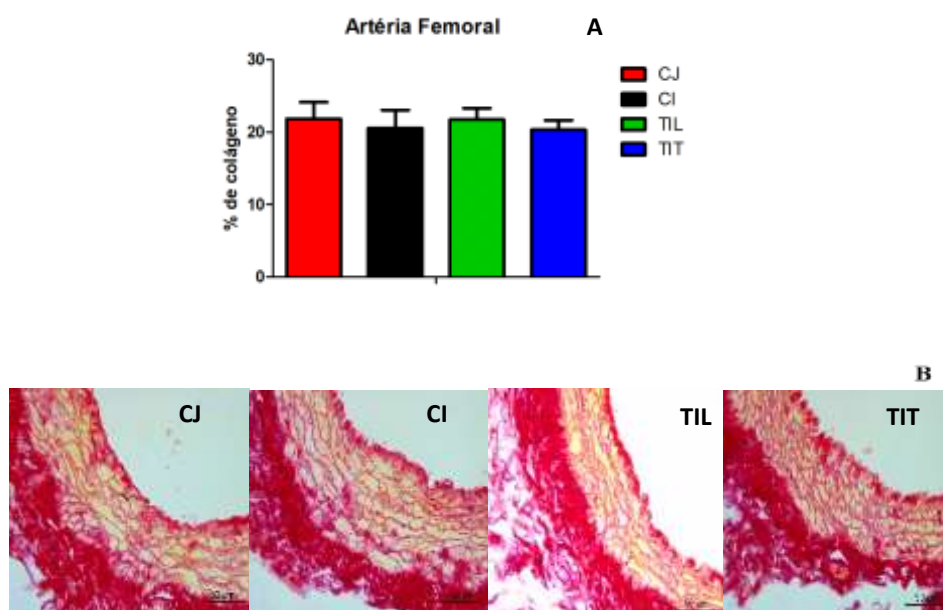


Figura 16: Porcentagem de colágeno na artéria femoral (A) e fotos representativas de cortes histológicos (7 μ m) corados com vermelho de picrosirius (B), ao final do programa, em CJ (Controle jovem), CI (Controle idoso), TIL (Treinado ao longo da vida), e TIT (Treinado tardio); Diferenças significativas: $p < 0,05$.

9. DISCUSSÃO

Neste presente estudo, buscamos em seu primeiro momento, avaliar possíveis alterações acometidas na saúde vascular entre os grupos controles jovem e controle idoso, evidenciando se o processo de envelhecimento de 16 meses, seria um período adequado para demonstrarmos os efeitos deletérios, nas alterações de peso corporal, capacidade física aeróbia, rigidez arterial, pressão arterial sistólica, nitrito plasmático e tecidual do ventrículo esquerdo, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), morfometria arterial e concentrações de colágeno arterial.

O peso corporal dos animais do grupo controle jovem e idoso, foram analisados em dois e três momentos, respectivamente. No momento inicial não foram observadas diferenças entre os grupos, apresentando uma média inferior a 300 gramas. Após 8 semanas de protocolo, ambos os grupos apresentaram aumento exponencial de peso corporal, mas sem diferenças estatísticas entre os grupos controles jovem e idoso, ultrapassando 400 gramas. No momento três, após 16 meses de experimento, o grupo controle idoso obteve aumento de peso corporal atingindo aproximadamente 600 gramas. Este aumento de peso corporal, já era esperado e está de acordo com MARQUES et. al. (2015), que observou em ratos Wistar, o aumento de peso corporal ao decorrer da idade, ao longo dos 12 meses de protocolo experimental. Deste mesmo modo, Li e colaboradores (2018), observaram em ratos Wistar envelhecidos (18 meses de vida), aumento de peso corporal de acordo com a idade, demonstrando assim que a progressão do peso corporal é algo natural com o envelhecimento.

Em relação à capacidade física, o presente estudo demonstrou que animais Wistar, quando não estimulados com treinamento físico, apresentaram um declínio no transcorrer do protocolo experimental. Observou-se uma diminuição de aproximadamente 14,8% no grupo controle jovem em protocolo de 4 meses, e diminuição de aproximadamente 13,84% no grupo controle idoso em protocolo de 16 meses. Esses resultados corroboram com o de Qin. e colaboradores (2020) que observou em ratos Wistar, já envelhecidos com 16 meses de idade e mantidos sedentários, um declínio da capacidade física na realização de um teste máximo em esteira, ao longo do processo de envelhecimento.

As avaliações funcionais da pressão arterial sistólica e rigidez arterial, foram realizadas ao final do protocolo. Para a pressão arterial, os resultados não demonstraram diferença entre os grupos experimentais, o que já era esperado pela linhagem de animais utilizado (Wistar – normotensos). Outros estudos, como o de HOTTA et. al. (2017), também demonstraram ausência de alteração na pressão arterial sistólica de ratos jovens e idosos. Em relação à rigidez arterial, o grupo controle idoso apresentou valores de VOP superiores ao grupo controle jovem, possivelmente relacionado a maior rigidez das grandes artérias, mas sem diferença estatística significativa, $p < 0,05$. No entanto, para a VOP, embora nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos controles jovem e idoso, pode-se observar uma tendência de aumento dos valores para o grupo idoso. Em estudo de GU et.

al. (2014), com ratos Fisher de 23 meses de idade, foi observado um aumento considerável de VOP, no grupo idoso em comparação aos animais jovens controles e, também, demonstra que o exercício físico atenuou os valores de VOP em animais idosos que realizaram o treinamento físico, corroborando com o resultado encontrado do presente estudo.

Para as análises humorais, este estudo também não encontrou diferença estatística entre os grupos controles, nas análises das concentrações de nitrito plasmático e tecidual do ventrículo esquerdo e nas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Apesar da ausência de diferença estatística, cabe a ressalva que o grupo idoso possui uma tendência de diminuição dos valores plasmáticos de nitrito, o que pode indicar um prejuízo nos fatores humorais do controle cardiovascular.

Com relação às análises estruturais de morfometria do vaso, a aorta torácica, aorta carótida apresentaram diferenças entre os grupos controles jovem e idoso. Este parece ser um dos principais resultados quando comparamos os grupos controles, obtendo valores de razão parede/luz, das artérias aorta torácica e carótida, diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,005$); CJ x CI ($p = 0,001$), para aorta torácica e ($p = 0,008$), para aorta carótida e diferenças na espessura da parede ($p = < 0,001$), para aorta torácica e ($p = < 0,002$) para aorta carótida, corroborando com o estudo de FABRICIO et. al. (2020), que demonstrou em ratos adultos e idosos (12 meses) sem treinamento, alterações da espessura na artéria aorta, obtendo aumento na parede em idosos. Este mesmo estudo demonstrou aumento do colágeno arterial na aorta, carótida e femoral, relacionando ratos jovens, adultos e idosos, entretanto, no presente estudo observamos um aumento do colágeno nas artérias aorta e carótida, em ratos idosos, mas sem diferenças estatísticas ($p < 0,005$) entre os grupos controles.

Uma vez investigado todas as variáveis funcionais, humorais e estrutural das artérias entre grupos controles, buscou-se compreender qual o efeito deletério do envelhecimento em animais sedentários. Em termos funcionais, o envelhecimento por si parece não gerar um comprometimento significativo pois as variáveis de pressão arterial e VOP não apresentaram diferenças que poderiam comprometer a funcionalidade do sistema. A mesma conclusão pode ser aplicada para as variáveis humorais, pois NO e TBARS também não apresentaram diferenças significativas entre os grupos jovens e idosos (controle), no entanto cabe a ressalva que embora tenha sido observado uma tendência a diminuição, especialmente dos valores de NO, o fato dos animais serem considerados normotensos, essas diferenças não apareceram. Por outro lado, há um destaque para as variáveis estruturais em que diferenças foram apontadas para a espessura e razão parede luz e, uma tendência de maior concentração de colágeno para a artéria aorta e femoral. Este resultado demonstra alterações estruturais significativas com o processo de envelhecimento prejudicando a complacência arterial.

Outro fator importante a ser considerado por este estudo é que os animais utilizados possuíam

a idade de 16 meses, sendo, portanto, considerados como adultos idosos e não idosos propriamente ditos. Os estudos de SUDAKOV et. al (2021); SENGUPTA (2013) e ANDREOLLO et. al. (2012) relatam que os animais são considerados adultos com 2 meses de idade (60 dias), atingem a maturidade adulta por volta 5-6 meses e após 6-7 meses os animais começam a demonstrar sinais de envelhecimento, relatam em seus estudos que a vida média do rato de laboratório vive cerca de 24 a 36 meses. É possível que se o mesmo experimento for realizado com ratos com idade de 24 meses, as “tendências” estatísticas encontradas no estudo atual alcancem significância.

Ainda, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito preventivo do exercício aeróbio praticado ao longo da vida comparado ao exercício realizado tardiamente, em amenizar ou proteger dos efeitos naturais que o envelhecimento acomete no sistema vascular. Neste sentido, no presente trabalho foram realizadas os mesmos conjuntos de análises citadas para os grupos controles.

Nossos achados demonstraram que o peso corporal dos animais treinados obteve um aumento exponencial acompanhando os níveis do grupo idoso (CI), mas sem apresentarem diferenças estatísticas. Em relação a capacidade física dos grupos treinados ao longo da vida (TIL) e tardiamente (TIT), foi demonstrado uma evolução exponencial ao longo do período. Estes resultados demonstram que o treinamento foi eficaz para melhorar a capacidade aeróbia dos animais. Tais dados já eram esperados, pois já é bem esclarecido na literatura, que a prática regular de exercício físico promove diversos benefícios, entre eles, aumento da aptidão física dos animais. Moreira et. al. (2015), observaram o desempenho no teste de capacidade máxima após 10 semanas de treinamento aeróbio em meio aquático, com intensidade 50-80%, demonstrando que o grupo treinado apresentou aumento da capacidade física em relação ao grupo sedentário. É importante ressaltar que o grupo treinado ao longo da vida (TIL), apresentou melhor capacidade física aeróbia em relação ao grupo treinado tardiamente (TIT), indicando que períodos de treinamento aeróbio contínuo, ao longo do processo de envelhecimento acomete melhora na capacidade física aeróbia, consequentemente gerando maiores benefícios no sistema cardiorrespiratório. Este resultado sugere que o decréscimo desta capacidade decorrente dos efeitos naturais do envelhecimento é atenuado e está de acordo com vários estudos (TALBOT, METTER, FLEG, 2000; FLEG, 2012; SANTOS, LARROCCA, SEALS, 2014).

Nas análises funcionais da pressão arterial sistólica e da rigidez arterial ao final do protocolo, os resultados demonstraram que os grupos após a intervenção, não obtiveram diferença de pressão arterial sistólica em ambos os grupos treinados, estando de acordo com o estudo de HOTTA et. al. (2017). Entretanto, na rigidez arterial (VOP), o grupo treinado ao longo da vida (TIL) apresentou redução desta variável comparado ao grupo controle idoso (CI). Estes resultados estão de acordo com o estudo de SEALS et al. (2019) que também investigaram a rigidez arterial através da velocidade de onda de pulso e demonstraram os efeitos do exercício aeróbio regular e a relação do

enrijecimento com o envelhecimento em homens de meia-idade, obtendo após as intervenções do treinamento regular, o benefício em aumentar a complacência da artéria carótida.

Para as análises humorais, este estudo não encontrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,005$) entres os grupos treinados para as análises das concentrações de nitrito plasmático e tecidual do ventrículo esquerdo, no entanto, foi demonstrado uma diminuição nas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), nos grupos treinados (TIL) e (TIT) em relação aos grupos controles, mas apenas o grupo treinado tardiamente (TIT), obteve níveis de significância $p < 0,005$. Conforme o estudo de BOVERIS and NAVARRO (2008), o exercício moderado crônico diminui o conteúdo mitocondrial de oxidação, TBARS e carbonilas e, por outro lado, aumenta 15-20% das atividades enzimáticas antioxidantes após 24 semanas de treinamento. No entanto, este efeito quase desapareceu em ratos idosos após 50 semanas de treinamento, podendo o grupo (TIL), ser acometido por esta diminuição das enzimas antioxidantes, apontado neste estudo. É importante destacar também que os animais utilizados por este estudo eram considerados normotensos e, sugere-se que os fatores humorais não tiveram grandes influências nos resultados finais.

Demostramos anteriormente as diferenças nas alterações morfometrias dos vasos entre os grupos controles jovens x idoso, entretanto, somente o treinamento ao longo da vida foi capaz de minimizar/prevenir os efeitos deletérios do envelhecimento, na artéria aorta torácica e aorta carótida. Corroborando com os achados na morfometria dos vasos, as análises das concentrações de colágeno arterial evidenciaram uma diferenciação de percentual de colágeno nas artérias aorta torácica e aorta carótida, demonstrando uma diminuição nos grupos treinados (TIL e TIT), quando comparados ao grupo controle idoso (CI, $p = 0,013$ e $p = 0,021$, respectivamente), e apenas o grupo treinado tardiamente (TIT), obteve uma diminuição de colágeno na artéria carótida ($p = 0,034$), resultados estes que está de acordo com o estudo de HANNA et.al (2014) que investigou em modelo animal de ratos jovens e idosos, a relação elastina e colágeno e, a remodelação estrutural das artérias, com os efeitos da idade e treinamento físico. Tais resultados demonstram que a idade aumenta a espessura da parede e a rigidez das artérias de resistência coronárias, e a proporção parede-lúmen é aumenta com a idade, mas este aumento foi revertido com a prática do treinamento físico. O estudo de GU et. al. (2014), que avaliou efeitos do treinamento físico aeróbio crônico, no enrijecimento da aorta e disfunção endotelial em ratos jovens (03 meses) e idosos (23 meses), demonstrou que o treinamento físico promove a diminuição do enrijecimento da aorta, marcado pela redução na concentração de colágeno, aumento da concentração da elastina, redução da velocidade de onda de pulso (VOP) e, previne a disfunção endotelial mediado pela resposta à acetilcolina.

Confirmando em partes a hipótese do presente estudo, em que era esperado que o rato envelhecido apresentasse maiores efeitos deletérios decorrentes do processo natural de envelhecimento, nas variáveis funcionais, humorais e estrutural do vaso; apenas a variável estrutural,

através dos valores da morfometria quando relacionamos a razão parede/luz e espessura da parede, foram concretizadas neste estudo. Ainda assim, cabe a ressalva que os animais possuíam apenas 16 meses de vida, ou seja, um processo mais longo de envelhecimento poderia complementar este estudo, demonstramos maiores alterações nas variáveis propostas.

Contudo, ao olharmos para a hipótese em que relacionamos os treinamentos apresentados neste estudo, várias relações benéficas que contemplem o treinamento ao longo da vida foram apontadas de forma eficiente no efeito preventivo, aos efeitos deletérios acometidos no envelhecimento vascular. Partindo da análise funcional, não obtivemos uma melhora nas variáveis da pressão arterial sistólica (PAS), mas, em contrapartida os valores se apresentaram dentro da média, padronizada em normotensos. Ao olharmos para os valores de rigidez arterial o grupo treinado ao longo da vida (TIL) demonstrou uma redução em comparação ao grupo idoso (CI). Este resultado indica que o treinamento foi efetivo em minimizar os efeitos de uma possível rigidez arterial. Em conjunto com as análises da estrutura do vaso, foi demonstrado uma relação parede/luz e diminuição da espessura da parede do vaso e diminuição do colágeno da artéria aorta, demonstrando a relação da melhora da variável funcional (VOP), com estas variáveis estruturais.

10. CONCLUSÃO

Conclui-se com este estudo que ratos Wistar com 16 meses de vida apresentam alterações estruturais dos vasos sanguíneos quando comparados a ratos jovens, no entanto, o treinamento ao longo da vida foi capaz de prevenir tais efeitos deletérios relacionados ao processo de envelhecimento.

REFERÊNCIAS

AMERICAM COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. ACSM - Diretrizes do ACSM para os testes de esforço e sua prescrição / American College of Sports Medicine; tradução Dilza Balteiro Pereira de Campos. – 9. ed. – Rio de Janeiro: Guanabara, 2014.

ANDREOLLO NA, SANTOS EF, ARAÚJO MR, LOPES LR. Rat's age versus human's age: what is the relationship? *Arq Bras Cir Dig.* 2012 Jan-Mar;25(1):49-51. English, Portuguese. doi: 10.1590/s0102-67202012000100011. PMID: 22569979.

BARBOSA, K.T.F., et. al. – Envelhecimento e vulnerabilidade individual: um panorama dos idosos vinculados à estratégia saúde da família. *Texto contexto - enferm.* vol.26 no.2 Florianópolis 2017 Epub 26 junho 2017.

BAREL, M., PEREZ, OAB, GIOZZET, VA et al. O treinamento físico previne a hiperinsulinemia, a perda de glicogênio muscular e a atrofia muscular induzida pelo tratamento com dexametasona. *Eur J Appl Physiol* 108 , 999-1007 (2010). <https://doi.org/10.1007/s00421-009-1272-6>

BRANDES, R.P., FLEMING, I., BUSSE, R. -Endothelial Agin. *Cardiovascular Research* 286– 294, 2005.

BOVERIS A, NAVARRO A. Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents. *Free Radic Biol Med.* 2008 Jan 15;44(2):224-9. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.08.015. Epub 2007 Aug 31. PMID: 18191758.

CAHILL, P.A., REDMOND, E.M. - Vascular endothelium – Gatekeeper of vessel health. Published in final edited form as: *Atherosclerosis.* 2016 May; 248: 97– 109.doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007.

CURY, SS, FREIRE, PP, MARTINUCCI, B., DOS SANTOS, VC, DE OLIVEIRA, G., FERRETTI, R., ... CARVALHO, RF (2018). A análise da dimensão fractal revela desorganização do músculo esquelético em camundongos mdx. *Comunicações de Pesquisa Bioquímica e Biofísica*, 503(1), 109– 115. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.189>

FABRICIO, M.F., et. al. - Standardization of a new non-invasive device for assessment of arterial stiffness in rats: Correlation with age-related arteries' structure. *MethodsX*. 2020; 7: 100901. Published online 2020 Apr 27. doi: 10.1016/j.mex.2020.100901.

FLEG JL. Aerobic exercise in the elderly: a key to successful aging. *Discov Med*. 2012 Mar;13(70):223-8. PMID: 22463798.

GU Q, WANG B, ZHANG XF, MA YP, LIU JD, WANG XZ. Chronic aerobic exercise training attenuates aortic stiffening and endothelial dysfunction through preserving aortic mitochondrial function in aged rats. *Exp Gerontol*. 2014 Aug;56:37-44. doi: 10.1016/j.exger.2014.02.014. Epub 2014 Mar 5. PMID: 24607516.

HANNA MA, TAYLOR CR, CHEN B, LA HS, MARAJ JJ, KILAR CR, BEHNKE BJ, DELP MD, MULLER-DELP JM. Structural remodeling of coronary resistance arteries: effects of age and exercise training. *J Appl Physiol* (1985). 2014 Sep 15;117(6):616-23. doi: 10.1152/jappphysiol.01296.2013. Epub 2014 Jul 24. PMID: 25059239; PMCID: PMC4157167.

HERRERA NA, DUCHATSCH F, KAHLKE A, AMARAL SL, VASQUEZ-VIVAR J. In vivo vascular rarefaction and hypertension induced by dexamethasone are related to phosphatase PTP1B activation not endothelial metabolic changes. *Free Radic Biol Med*. 2020 May 20;152:689-696. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.01.012. Epub 2020 Jan 21. PMID: 31978540; PMCID: PMC8546799.

HOTTA K, CHEN B, BEHNKE BJ, GHOSH P, STABLEY JN, BRAMY JA, SEPULVEDA JL, DELP MD, MULLER-DELP JM. Exercise training reverses age-induced diastolic dysfunction and restores coronary microvascular function. *J Physiol*. 2017 Jun 15;595(12):3703-3719. doi: 10.1113/JP274172. Epub 2017 May 23. PMID: 28295341; PMCID: PMC5471361.

LI FH, SUN L, ZHU M, LI T, GAO HE, WU DS, ZHU L, DUAN R, LIU TC. Beneficial alterations in body composition, physical performance, oxidative stress, inflammatory markers, and adipocytokines induced by long-term high-intensity interval training in an aged rat model. *Exp Gerontol*. 2018 Nov;113:150-162. doi: 10.1016/j.exger.2018.10.006. Epub 2018 Oct 9. PMID: 30308288.

LIN YH, CHEN YC, TSENG YC, TSAI ST, TSENG YH. Physical activity and successful aging among middle-aged and older adults: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Aging*

(Albany NY). 2020 Apr 29;12(9):7704-7716. doi: 10.18632/aging.103057. Epub 2020 Apr 29. PMID: 32350152; PMCID: PMC7244057.

MIRANDA, G.M.D.; MENDES, A.C.G.; SILVA, A.L.A. – O envelhecimento populacional brasileiro: desafios e consequências sociais atuais e futuras – REV. BRAS. GERONTOL., Rio de Janeiro, 2016; 19(3): 507-519.

MOREIRA, L. L.; NAVARRO, A. C.; PEIXOTO, M. F. D.; MELO, D. S.; ALMEIDA, R. E. A.; RODRIGUES, A. C.; PEREIRA, L. V. C.; SILVA, G. Treinamento aeróbio contínuo versus treinamento acumulado: Uma comparação de seus efeitos e desempenho em modelo animal. Brazilian Journal of Exercise Prescription and Physiology, v. 9, n. 56, p. 605-616, 28 Apr. 2015.

NEGRÃO, C.E.; BARRETO, A.C.P – Cardiologia do Exercício do Atleta ao Cardiopata. 3.ed. – Barueri, SP: Manole,2010.

NORTH, B.J., SINCLAIR, D. A. - The intersection between aging and cardiovascular disease. Circ Res. 2012;110(8):1097-1108.

Organização mundial de Saúde. OMS - Um relatório sobre saúde. (Acessado em 15/12/2019 /Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/numero-de-pessoas-idosas-com-necessidade-de-cuidados-prolongados-triplicara-nas-americas-ate-2050>> Publicado em outubro 02/2019).

QIN F, DONG Y, WANG S, XU M, WANG Z, QU C, YANG Y, ZHAO J. Maximum oxygen consumption and quantification of exercise intensity in untrained male Wistar rats. Sci Rep. 2020 Jul 13;10(1):11520. doi: 10.1038/s41598-020-68455-8. PMID: 32661254; PMCID: PMC7359321.

RUEGSEGGER GN, BOOTH FW. Health Benefits of Exercise. Cold Spring Harb Perspect Med. 2018 Jul 2;8(7):a029694. doi: 10.1101/cshperspect.a029694. PMID: 28507196; PMCID: PMC6027933.

SANCHES-LOPES, J.M., FERREIRA G.C., PINHEIRO L.C., KEMP R., TANUS-SANTOS J.E. - Consistent gastric pH-dependent effects of suppressors of gastric acid secretion on the antihypertensive responses to oral nitrite. Biochem Pharmacol. 2020 JUL;177:113940. DOI: 10.1016/J.BCP.2020.113940. EPUB 2020 MAR 26. PMID: 32224135.

SANTOS, P. JR., LAROCCA T.J., SEALS, D.R. - Aerobic exercise and other healthy lifestyle factors that influence vascular aging. *AdvPhysiol Educ.* 2014; 38:296–307. doi: 10.1152/advan.00088, 2014.

SEALS, D.R., DINENNO, F.A. - Collateral damage: cardiovascular consequences of chronic sympathetic activation with human aging. *Am J Physiol Heart CircPhysiol* 287: H1895–H1905.

SENGUPTA, P. - The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med.* 2013 Jun;4(6):624-30. PMID: 23930179; PMCID: PMC3733029.

Sociedade Brasileira de Geriatria e Gerontologia - SBGG – (Acessado em 27/11/2019 /Disponível em: <https://sbgg.org.br/oms-divulga-metas-para-2019-desafios-impactam-a-vida-de-idosos> Publicado em janeiro 27/2019).

SUDAKOV SK, ALEKSEEVA EV, NAZAROVA GA, BASHKATOVA VG. - Age-Related Individual Behavioural Characteristics of Adult Wistar Rats. *Animals (Basel).* 2021 Aug 2;11(8):2282. doi: 10.3390/ani11082282. PMID: 34438740; PMCID: PMC8388463.

TALBOT LA, METTER EJ, FLEG JL. Atividades físicas de lazer e sua relação com a aptidão cardiorrespiratória em homens e mulheres saudáveis de 18 a 95 anos. *Med Sci Sports Exerc* 32:417-425, 2000.

Tratado de Geriatria e Gerontologia. Freitas, E.V.; Py, L.; Neri, A. L.; Cançado, F. A. X.C.; Gorzoni, M.L.; Doll, J. 3ª. Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. ISBN 978-85-277-2054-0.

VASCONCELOS, A.M.N., GOMES, M.M.F. – Transição demográfica: e experiência brasileira. *Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília*, 21(4):539-548, out-dez 2012.

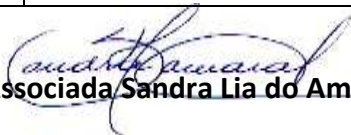
YUNG LM, LAHER I, YAO X, CHEN ZY, HUANG Y, LEUNG FP. Exercise, vascular wall and cardiovascular diseases: an update (part 2). *Sports Med.* 2009;39(1):45-63. doi: 10.2165/00007256-200939010-00004. PMID: 19093695.

ZAGO, A.S., - Exercício físico e o processo saúde-doença no envelhecimento. *Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.*, rio de janeiro, 2010; 13(1):153-158.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Efeito do exercício físico e da suplementação de nitrito no controle cardiovascular de ratos idosos**", registrada com o nº **281/2020 Vol. 1**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. ANDERSON SARANZ ZAGO - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP - FACULDADE DE CIÊNCIAS, CAMPUS DE BAURU, em reunião de 27/05/2020.

Finalidade	☐ Ensino ☒ Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	De 01/07/2020 a 30/06/2022
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogêneo/Wistar
Nº de animais	96
Peso/Idade	200-250g/45 dias
Sexo	Macho
Origem	Centro de Pesquisa e Produção de Animais da UNESP-Botucatu



Profª Associada Sandra Lia do Amaral Cardoso

Coordenadora da CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Aulas da Disciplina: Laboratório de Análise Experimental do Comportamento I**", do **Curso de Graduação em Psicologia**, registrada com o nº **1163/2018 Vol.1**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. **FÁBIO LEYSER GONÇALVES** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP - FACULDADE DE CIÊNCIAS, CAMPUS DE BAURU, em reunião de 06/12/2018.

Finalidade	(X) Ensino () Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	De 01/02/2019 a 31/01/2021
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico/Wistar
Nº de animais	80
Peso/Idade	200g/45 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central - UNESP


Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini
Coordenador da CEUA