
CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE – BIODINÂMICA DA MOTRICIDADE HUMANA

NÁDIA FAGUNDES GARCIA

**EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO NA REATIVIDADE VASCULAR DA
ARTÉRIA ILÍACA EM CAMUNDONGOS LDLR^{-/-}**

**Rio Claro-SP
2016**

NÁDIA FAGUNDES GARCIA

**EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO NA REATIVIDADE VASCULAR DA
ARTÉRIA ILÍACA EM CAMUNDONGOS LDLR^{-/-}**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia do Campus de Rio Claro, da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Motricidade.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Angelina Zanesco

Co-orientadora:

Prof^a. Dr^a. Camila de Moraes

Rio Claro-SP

2016

NÁDIA FAGUNDES GARCIA

**EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO NA REATIVIDADE VASCULAR DA
ARTÉRIA ILÍACA EM CAMUNDONGOS LDLR^{-/-}**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio Claro, da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Motricidade.

Banca Examinadora

Rio Claro-SP, 29 de março de 2016

Dedico este trabalho aos meus pais

José Jorge e Maura

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros votos de agradecimentos,

A Deus pela minha saúde, força e fé para superar as dificuldades

À Prof^a. Dr^a. Camila De Moraes, pela confiança, paciência e dedicação na execução deste trabalho, por todos os ensinamentos e conselhos desde o início da minha graduação e por ter feito a diferença na minha vida profissional.

À Prof^a. Dr^a. Angelina Zanesco, pela confiança, pela oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa e por todos os ensinamentos.

À Prof^a. Dr^a. Maria Andreia Delbin, pela confiança, ajuda financeira na execução deste trabalho e por todos os ensinamentos e conselhos durante o tempo em que estagiei em seu laboratório, pela discussão e contribuição para o presente estudo.

Ao Prof. Dr Alexandre Gabarra pela discussão e contribuição para o presente estudo.

Aos meus pais, José Jorge e Maura, que sempre estiveram ao meu lado, me aconselhando e amparando nos momentos em que mais precisei. Agradeço por serem meu exemplo de trabalho, honestidade, força e paciência. Muito obrigada pelo amor incondicional! Vocês são meu orgulho e minha fortaleza!

Ao meu irmão, Samuel, por ter dividido comigo 30m² durante um ano e oito meses. Só nós sabemos o que passamos nos dias de verão! Obrigada por todo respeito e parceria.

A toda minha família por acreditar em mim e me incentivar em busca deste sonho.

Aos meus amigos do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular – IB Unicamp, Amanda, Dani, Carmem, Hygor, Andressa, Jad, Nath, Stefano, Natali e César por terem me acolhido tão bem, me ensinado grande parte de tudo que aprendi durante este mestrado, por todos os conselhos e principalmente pelo laço de amizade. Minha eterna gratidão! Vocês foram essenciais.

À Milenna por ter feito parte do meu dia-a-dia, pela parceria diária, por ter aguentado firme e forte minhas chatices nos dias mais estressantes e por ter sido a calma quando tudo parecia tempestade. Você fez a diferença! Muito obrigada por tudo.

A todos os meus amigos de Inconfidentes, Ouro Fino, Monte Sião, Águas de Lindóia, Rio Claro, Campinas, Ribeirão Preto (minha cidade de coração) e tantas outras cidades que passei, agradeço por todas as risadas, histórias, alegrias e tristezas compartilhadas. Sem amigos não somos nada. Muito obrigada, meus amigos!

Aos animais que possibilitaram a realização deste trabalho

À Ivana, assistente administrativa do Instituto de Biociências – UNESP Rio Claro por toda paciência e competência na execução do seu trabalho e auxílio aos alunos.

E finalmente, ao Instituto de Biociências – UNESP Rio Claro, a CAPES, FAPESP E CNPq, sem os quais essa dissertação dificilmente poderia ter sido realizada.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regulação da contração do músculo liso	16
Figura 2. Mecanismo de relaxamento do músculo liso vascular	19
Figura 3. Metabolismo lipídico.....	21
Figura 4. Etapas do processo de aterosclerose.....	22
Figura 5. Concentração de glicose, colesterol total e triglicerídeos	39
Figura 6. Curvas concentração-resposta à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio	41
Figura 7. Curvas concentração-resposta à fenilefrina e ao análogo do tromboxano A ₂	42
Figura 8. Representação da fluorescência ao 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2).....	44
Figura 9. Representação da fluorescência induzida por dihidroetidina (DHE)	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teste incremental máximo realizado no início e ao final do protocolo de treinamento físico dos grupos *wild type* sedentário (WT), *wild type* treinado (WT/Ex), *knockout* sedentário e *knockout* treinado (KO/Ex). (KO) e *knockout* treinado (KO/Ex).....37

Tabela 2. Peso inicial, peso final, ganho de peso corporal e peso da gordura epididimal de camundongos dos grupos *wild type* sedentário (WT), *wild type* treinados (WT/Ex), *knockout* sedentário (KO) e *knockout* treinado (KO/Ex).....38

Tabela 3. Diâmetro da artéria e o delta de contração em resposta ao ΔKCl de anéis de artéria ilíaca, com endotélio intacto, de camundongos dos grupos *wild type* sedentário (WT), *wild type* treinado (WT/Ex), *knockout* sedentário (KO) e *knockout* treinado (KO/Ex).....40

Tabela 4. Valores de potência obtidos a partir de curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh) e ao nitroprussiato de sódio (SNP) em anéis de artéria ilíaca com endotélio intacto de camundongos dos grupos *wild type* sedentário (WT), *wild type* treinado (WT/Ex), *knockout* sedentário (KO) e *knockout* treinado (KO/Ex)41

Tabela 5. Valores de potência obtidos à partir de curvas concentração-resposta à fenilefrina (PHE) e ao análogo do tromboxano A₂ (U46619) em anéis de artéria ilíaca endotélio intacto de camundongos dos grupos *wild type* sedentário (WT), *wild type* treinado (WT/Ex), *knockout* sedentário (KO) e *knockout* treinado (KO/Ex)43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: Ácido araquidônico
ACh: Acetilcolina
AKT: Família de proteínas quinases, são quinases serina/treonina
AMPC: Monofosfato de adenosina cíclico
Apo B-100: Apolipoproteína B-100
Apo B: Apolipoproteína B
Apo E: Apolipoproteína E
Apo E^{-/-}: Camundongo *knockout* para apoproteína E
ATP: Trifosfato de adenosina
BH4: Tetrahidrobiopterina
c-SR: C – src tirosina quinase
Ca²⁺: Cálcio
CaCl₂.2H₂O: Cloreto de cálcio dihidratado
CAT: Catalase
CEMIB: Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
cNOS: Óxido nítrico sintase constitutiva
CO₂: Gás carbônico
COX: Ciclooxygenase,
CT: Colesterol total
Cu/Zn: Cobre/zinco
DAF: Análise de fluorescência ao 4,5-diaminofluoresceína
DAG: Diacilglicerol
DAOP: Doença arterial obstrutiva periférica
db/db: Camundongo diabético
DHE: Análise da fluorescência derivada da oxidação da dihidroetidina
EC₅₀: -Log da concentração do agonista necessária para produzir 50% da resposta máxima
EcSOD: Superóxido dismutase extracelular
EDCF: Fatores de contração derivados do endotélio
EDHP: Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDRP: Fator de relaxamento dependente do endotélio
E_{max}: Resposta máxima
eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial
EPM: Erro padrão da média
ERO: Espécie reativa de oxigênio
FAD: Flavina adenina dinucleotídeo
Fm: Fentomolar
FMN: Flavina mononucleotídeo
GCs: Guanilato ciclase solúvel

GMPC: Monofosfato de guanosina cíclico
GPx: Glutathione peroxidase
GSH-Px: Glutathione peroxidase
GTP: Guanosina trifosfato
HDL: Lipoproteína de alta densidade
HF: Hipercolesterolemia Familiar
ICAM: Molécula de adesão intercelular
IDL: Lipoproteína de densidade intermediária
iNOS - Óxido nítrico sintase induzível
IP₃: Inositol trifosfato
K⁺: Potássio
Kcal: Quilocaloria
KCl: Cloreto de potássio
KH₂PO₄: Hidrogenofosfato de potássio
KO: *Knockout*
KO/Ex: *Knockout* exercitado
L-arg: L-arginina
LDL: Lipoproteína de baixa densidade
LDL^{-/-}: Camundongo *knockout* para o receptor de LDL
LDL_{ox}: Lipoproteína de baixa densidade oxidada
m/min: Metros/minuto
MgSO₄.7H₂O: Sulfato de Magnésio heptahidratado
MLC: Miosina quinase de cadeia leve
MLC^P: Miosina fosfatase da cadeia leve
MMPs: Matrix de metaloproteinasas
Mn: Manganês
mN/mm: milinewton por milímetro
NaCl: Cloreto de sódio
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NaHCO₃: Bicarbonato de sódio
nNOS: Óxido nítrico sintase neuronal
NO: Óxido nítrico
NO₂: Dióxido de nitrogênio
NOS: Óxido nítrico sintase
PGA_{2α}: Prostaglandina A_α
PGE₂: Prostaglandina E₂
PGI₂: Prostaciclina
pH: Potencial de hidrogênio iônico
PHE: Fenilefrina
PI₃K: Fosfatidilinositol-3-quinase

PKC: Proteína quinase C
pM: Picomolar
RhoA-GDP: RhoA guanina difosfato
RhoA-GTP: RhoA guanina trifosfato
RhoGEF: Fator de troca Rho guanosina nucleotídeo
RS: Retículo sarcoplasmático
SNP: Nitroprussiato de sódio
SOD: Superóxido dismutase
TG: Triglicerídeos
TRC: Transporte reverso de colesterol
VCAM: Molécula de adesão vascular
VLDL: Lipoproteína de muito baixa intensidade
 $V_{\max}$: Velocidade máxima
WT: *Wild type*
WT/Ex: *Wild type* exercitado
 β HDL: Lipoproteína de alta densidade beta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 Músculo liso vascular e endotélio	15
2.2 Metabolismo lipídico, disfunção endotelial e aterosclerose.....	20
2.2.1 Modelo experimental de hipercolesterolemia familiar: camundongos LDLR ^{-/-}	24
2.3 Exercício Físico, função endotelial e aterosclerose.....	26
3. JUSTIFICATIVA	28
4. OBJETIVO.....	29
5. MATERIAL E MÉTODO.....	30
5.1 Animais.....	30
5.2 Adaptação ao ergômetro e teste incremental máximo.....	31
5.3 Programa de treinamento físico aeróbio.....	31
5.4 Obtenção das amostras de soro e de tecidos.....	32
5.5 Determinação dos parâmetros bioquímicos.....	32
5.6 Curvas concentração-resposta em anéis de artéria ilíaca	33
5.7 Produção de NO e espécies reativas de oxigênio (ERO) em artéria ilíaca.....	34
5.8 Análise estatística	36
6. RESULTADOS	37
6.1 Teste incremental máximo e eficácia do protocolo de treinamento	37
6.2 Ganho de peso corporal, gordura epididimal e consumo alimentar	38
6.3 Parâmetros bioquímicos	39
6.4 Reatividade vascular em artéria ilíaca	40
7. DISCUSSÃO.....	46
8. CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
ANEXO	
ANEXO I. Aprovação do Comitê de Ética no uso de animais (CEUA/Unicamp).....	72

RESUMO

A inatividade física e as dislipidemias são considerados fatores de risco para a gênese das doenças cardiovasculares. Estudos em animais mostram que o consumo de dieta contendo alto teor de lipídios leva à diminuição da resposta relaxante dependente do endotélio, o que pode ser prevenido pela realização de exercício físico. Entretanto, a maioria dos estudos investigou os efeitos do exercício físico em artérias de maior calibre e em modelos de dislipidemia induzida por dieta. Há escassez de estudos que avaliam os efeitos do exercício físico em artéria de menor calibre e, principalmente, em modelo que mimetiza a hipercolesterolemia familiar (HF). Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do treinamento físico aeróbio de moderada intensidade na reatividade vascular da artéria ilíaca em camundongos knockout para o receptor de LDL alimentados com dieta hiperlipídica. Foram utilizados camundongos *wild type* e knockout para o receptor de LDL (LDLR^{-/-}) divididos em quatro grupos experimentais: *wild type* sedentário (WT), *wild type* treinado (WT/Ex), *knockout* sedentário (KO) e *knockout* treinado (KO/Ex). Os grupos WT foram alimentados com ração balanceada e os grupos KO com dieta hiperlipídica (38% lipídios). Os grupos WT/Ex e KO/Ex realizaram corrida em esteira (60-70%V_{max}, 5 dias/semana, 60 min) durante oito semanas. A reatividade vascular em artéria ilíaca foi verificada através de curvas concentração-resposta a acetilcolina (ACh), nitroprussiato de sódio (SNP), fenilefrina (PHE) e ao análogo do tromboxano A₂ (U46619). A determinação da produção de óxido nítrico (NO) foi realizada pela análise de fluorescência ao 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2) e a produção de ânion superóxido pela análise da fluorescência derivada da oxidação da dihidroetidina (DHE). Foi quantificada a glicose, o colesterol total e os triglicerídeos sanguíneos. O grupo KO aumentou em 640% o ganho de peso corporal, 510% a gordura epididimal, 35% a glicose, 180% o colesterol total e 99% os triglicerídeos comparado ao grupo WT e o treinamento físico aeróbio foi eficaz em prevenir o ganho de peso e a gordura epididimal no grupo KO/Ex (167% e 121%, respectivamente). Nenhuma alteração foi verificada na glicose, colesterol total e triglicerídeos no soro. O relaxamento máximo induzido por ACh foi reduzido em 24% no grupo KO comparado ao grupo WT, sendo esta resposta normalizada no grupo KO/Ex, sem alteração na potência. A resposta máxima a PHE foi 65% maior, e resposta da potência foi 3 vezes maior na artéria ilíaca de animais do grupo KO comparado ao grupo WT. Nenhuma alteração na resposta foi encontrada aos agentes SNP e U46619. A produção de NO foi 47% menor no grupo KO comparado ao WT e a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) foi 48% maior no grupo KO comparado ao

grupo WT. O treinamento físico preveniu o aumento na produção de ERO no grupo KO/Ex. Em conclusão, o exercício físico aeróbio, realizado por oito semanas, preveniu a disfunção endotelial na artéria ilíaca de camundongos LDLR^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica. Este achado pode estar relacionado à menor produção de ERO, o que aumentaria a biodisponibilidade do NO.

Palavras-chave: exercício físico; reatividade vascular; artéria ilíaca, hipercolesterolemia familiar

ABSTRACT

Physical inactivity and dyslipidemia are considered risk factors for cardiovascular disease. A decrease in endothelium-dependent relaxation response, which can be prevented by physical exercise, had been showing in animals fed with high fat diet. However, most studies investigated the effects of physical exercise on large-caliber arteries using models of diet induced dyslipidemia. There are few studies that evaluate the effects of physical exercise in small-caliber artery and, mainly, in a model that mimics familial hypercholesterolemia (FH). Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of moderate intensity exercise training on vascular reactivity of iliac artery in FH model using mice lacking LDL receptor. *Wild type* and *knockout* mice (LDLR^{-/-}) were divided into four groups: sedentary control (WT), trained control (WT/Ex), sedentary *knockout* (KO) and trained *knockout* (KO/Ex). Control groups were fed with standard chow and *knockout* groups with high fat diet. Trained groups ran on a treadmill (60-70% Vmax, 60 min, 5 days/week for 8 weeks). Concentration-response curves to acetylcholine (ACh), sodium nitroprusside (SNP), phenylephrine (PHE) and thromboxane A2 analogue (U46619) were done in iliac artery rings. Arterial production of nitric oxide and oxygen reactive species formation were assessed using fluorescence analysis (DAF-2 and DHE). Serum concentration of glucose, total cholesterol and triglyceride were determined using commercial kits. After eight weeks, the KO group had higher body weight gain (around 640%), epididymal fat (510%), glucose (35%), total cholesterol (180%) and triglycerides (99%) compared with WT group. Exercise training was effective to prevent body weight and epididymal fat gain in KO/Ex group (less 167% and 121%, respectively). No changes were observed in glucose, total cholesterol and triglycerides concentration. KO animals had lower maximal response evoked by ACh (about 24%) and higher maximal response to PHE (about 65%) compared with WT group. Exercise training prevented these alterations since KO/Ex group had vascular response similar to WT and WT/Ex groups. Endothelial dysfunction observed in KO group could be related to the reduced production of NO (about 47%) and the increased formation of oxygen reactive species (about 48%). These features were partially prevented by exercise training, KO/Ex group had lower formation of oxygen species and a slight higher NO production compared with KO group. In conclusion, aerobic exercise training carried out for eight weeks, prevented endothelial dysfunction in iliac artery from LDLR^{-/-} mice fed with high fat diet. This finding could be related to the lower formation of reactive oxygen species *in situ* that increases the NO bioavailability.

Keywords: physical exercise, vascular reactivity; iliac artery; familial hypercholesterolemia

1-INTRODUÇÃO

As últimas décadas foram marcadas por estudos epidemiológicos que indicam um aumento na prevalência de fatores de risco cardiometabólico como inatividade física, obesidade, alterações do perfil lipídico, tabagismo e consumo excessivo de álcool, elevando, assim, a incidência das doenças crônico-degenerativas como hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus tipo 2 e aterosclerose (SCHRAMM et al., 2004). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2013) mais de 17,3 milhões de mortes por ano são atribuídas a essas doenças, sendo previsto ainda um aumento para mais de 23 milhões em 2030. No Brasil, as Doenças Crônicas Não Transmissíveis constituem o problema de saúde pública de maior magnitude e correspondem a 72% das causas de morte, atingindo prioritariamente as camadas mais pobres e mais vulneráveis da população (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Especificamente, a aterosclerose, tem em sua fisiopatologia, o envolvimento de diferentes fatores que interagem de forma complexa, desmistificando a ideia de que esta doença seria decorrente apenas do depósito anormal de lipídeos na parede vascular (BAHIA et al., 2006). Dentre esses fatores, destacam-se de forma importante a inflamação e a disfunção endotelial. Em humanos, foi demonstrado que a disfunção endotelial é consequência do estresse oxidativo, da redução da biodisponibilidade de óxido nítrico e depleção de cofatores essenciais da óxido nítrico sintase endotelial (ANTONIADES et al., 2007; GIMBRONE; GARCIA-CARDEÑA, 2013). Em camundongos que mimetizam a hipercolesterolemia familiar, a disfunção endotelial já pode ser observada nos estágios iniciais da aterosclerose (MILLER et al. 2013).

A doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) é caracterizada pela evolução da placa ateromatosa instalada na parede arterial que leva à redução do fluxo sanguíneo e, caso o processo não seja interrompido, a obstrução do fluxo ocorre (GARCIA, 2006). O tratamento da DAOP inclui modificação dos fatores de risco e mudanças no estilo de vida, incluindo a prática regular de exercício físico (DURAZZO et al. 2005; YOSHIDA et al. 2008) reduzindo assim, a morbidade e a mortalidade do paciente acometido devido aos inúmeros benefícios cardiovasculares e endócrino-metabólicos obtidos por esta prática (NETO; NASCIMENTO, 2007; CHI; JAFF, 2008).

O aumento do fluxo sanguíneo sobre a parede vascular, induzido pelo aumento da frequência cardíaca durante o esforço físico, estimula a produção do vasodilatador óxido nítrico (NO) (ZANESCO; ANTUNES, 2007; DELBIN et al., 2012). Além da função vasodilatadora, o

NO desempenha papel protetor no processo de aterosclerose, pois, inibe a adesão e agregação plaquetária (ZAGO; ZANESCO, 2006).

Sendo assim, a prática regular de exercício aeróbio tem sido recomendada tanto para prevenção quanto para o tratamento da aterosclerose. A Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC, 2012) recomenda a prática regular de exercício físico de característica predominantemente aeróbia, em uma frequência semanal de três a seis vezes, com duração de 30 a 60 minutos por sessão e em intensidade moderada para prevenir eventos cardiovasculares e o declínio funcional dos indivíduos.

Os efeitos do exercício físico na função vascular e os mecanismos envolvidos nessas alterações estão, em parte, esclarecidos. No entanto, estudos envolvendo o efeito do exercício físico em indivíduos acometidos por doenças vasculares são menos conclusivos. Diante desse quadro, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do treinamento físico aeróbio de moderada intensidade na reatividade vascular da artéria ilíaca em animal *knockout* para o receptor de LDL alimentado com dieta hiperlipídica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Músculo liso vascular e endotélio.

A parede vascular é constituída por três túnicas: a túnica íntima, interna, composta de células endoteliais e responsáveis por liberar substâncias constritoras e dilatadoras do vaso sanguíneo; a túnica média, composta de célula muscular lisa e tecido elástico, responsável por controlar o tônus vascular e a túnica adventícia, mais externa, formada por tecido conjuntivo e fibras elásticas, responsável por dar suporte aos vasos (YUN et al., 2005).

A regulação da contração no músculo liso se dá através da ligação de diferentes agonistas (norepinefrina, angiotensina II, endotelina-1, por exemplo) aos seus receptores de membrana. Após esta ligação, a sinalização tem início com o aumento da atividade da fosfolipase-C via acoplamento a proteína G. A fosfolipase-C produz dois potentes segundos mensageiros da membrana lipídica: diacilglicerol (DAG) e o inositol 1,4,5 – trifosfato (IP₃). O IP₃ se liga a receptores específicos do retículo sarcoplasmático e promove a liberação de cálcio (Ca²⁺) para o citosol. O DAG juntamente com o Ca²⁺ ativa a proteína quinase C (PKC) que fosforila proteínas alvo específicas. Na maioria das células do músculo liso, a PKC promove a contração e a fosforilação dos canais para Ca²⁺ ou outras proteínas que regulam o ciclo da ponte cruzada. A ativação da ligação Ca²⁺/calmodulina leva a fosforilação da miosina quinase de cadeia leve (MLC quinase) que em conjunto com a actina desencadeia o ciclo da ponte cruzada iniciando o encurtamento da célula de músculo liso (WEBB, 2003). No músculo liso existe uma via que também causa contração, mas é independente de cálcio. Essa via envolve a Rho quinase que é ativada por receptores excitadores acoplados a proteína G (endotelina-1, por exemplo). Essa enzima fosforila a fosfatase da cadeia leve de miosina, inibindo-a e, assim, aumentando a fosforilação da cadeia leve. A Rho quinase também fosforila diretamente a cadeia leve da miosina. Essas duas ações aumentam a contração do músculo liso (PARANHOS; MIGUEL, 2007). A figura 1 ilustra o mecanismo contrátil do músculo liso vascular

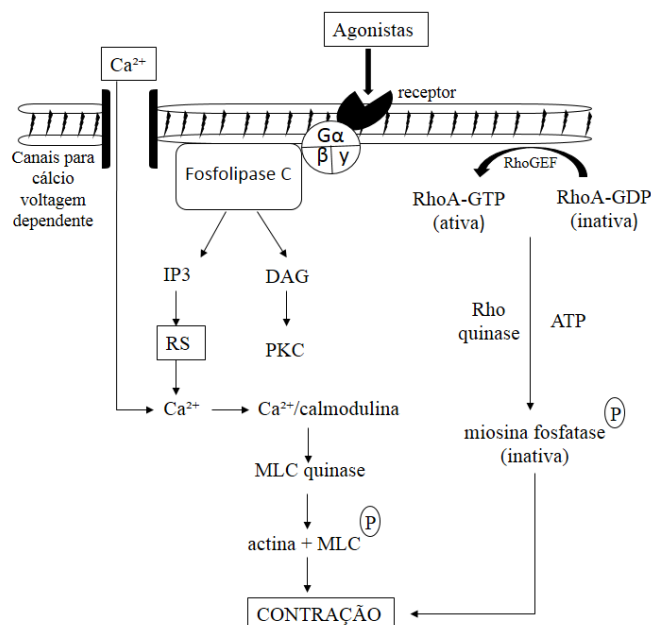


Figura 1. Regulação da contração do músculo liso (Adaptado de WEBB, 2003). Ca^{2+} : cálcio; IP3: inositol trifosfato; RS: retículo sarcoplasmático; DAG: diacilglicerol; PKC: proteína quinase C; MLC: miosina quinase de cadeia leve; MLC^{P} : miosina fosfatase da cadeia leve; ATP: trifosfato de adenosina; RhoA-GTP: RhoA guanina trifosfato; RhoA-GDP: RhoA guanina difosfato; RhoGEF: fator de troca Rho guanosina nucleotídeo

Por outro lado, o mecanismo de relaxamento do músculo liso ocorre como resultado da remoção do estímulo contrátil ou por uma ação direta de substâncias que estimulam a inibição do mecanismo contrátil (MORGAN, 1990; SOMLYO et al., 1999) resultando na diminuição da concentração intracelular de cálcio e no aumento da atividade da MLC quinase. O retículo sarcoplasmático e a membrana plasmática contém cálcio magnésio-ATPase que removem o Ca^{2+} do citosol. Além disso, o trocador de $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ (localizado na membrana plasmática) auxilia na diminuição do Ca^{2+} intracelular. Portanto, durante o relaxamento fecham-se os canais para cálcio dependentes de voltagem resultando na diminuição do influxo de cálcio intracelular (WEBB, 2003).

Furchgott e Zawadzki (1980) foram os pioneiros a descrever o fator de relaxamento dependente do endotélio (EDRF) liberado em resposta à acetilcolina, posteriormente caracterizado como óxido nítrico (NO). Este fato estimulou uma série de estudos sobre o endotélio e sua importância em várias condições clínicas, incluindo a aterosclerose. Além da acetilcolina, outras substâncias agonistas foram posteriormente descobertas, tais como a serotonina, histamina, bradicinina, trombina e trifosfato de adenosina (ATP) (BAHIA et al., 2004).

O NO é a principal substância vasodilatadora liberada pelo endotélio, além das prostaciclina (PGI_2) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Além das substâncias vasodilatadoras, o endotélio também libera substâncias vasoconstritoras, tais como a angiotensina II, endotelina-1 e tromboxano A_2 (BAHIA et al., 2006).

O NO produzido pelas células endoteliais desempenha um papel de grande importância fisiológica para o controle cardiovascular, pois é um potente vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária, impede a formação de trombos e, conseqüentemente, previne a doença aterotrombótica (MONCADA et al., 1991; VANHOUTTE, 2003). A biossíntese do NO compreende uma das funções mais importantes do metabolismo da L-arginina no organismo. É formado a partir do nitrogênio da guanidina presente na L-arginina sob a ação catalítica da enzima sintase de óxido nítrico (NOS), gerando concentrações equimolares de L-citrulina (SIASOS et al., 2006).

Existem três diferentes isoformas da óxido nítrico sintase (NOS), sendo duas constitutivas (cNOS) e uma induzida (iNOS). As cNOS estão presentes em neurônios (nNOS) e no endotélio (eNOS) e a iNOS em macrófagos, neutrófilos, linfócitos eosinófilos, células de Kupffer, hepatócitos e células epiteliais (ZAGO; ZANESCO, 2006). A nNOS é encontrada no cérebro, medula espinal, gânglios simpáticos e adrenais, neurônios nitrérgicos, células epiteliais de pulmão, estômago e útero, em células da ilhota pancreática e do músculo esquelético (MONCADA et al., 1991). A eNOS se encontra ligada à membrana das células endoteliais e tem como função regular o tônus do músculo liso vascular e impedir adesão e agregação plaquetária (MONCADA; HIGGS, 2006).

Para que a NOS seja ativada e ocorra síntese de NO, os estímulos podem ser químicos ou físicos. Os estímulos químicos se caracterizam pela interação agonista exógeno/endógeno a receptores específicos presentes nas células endoteliais. Por exemplo, a acetilcolina que quando ligada ao seu receptor induz a formação de IP_3 , responsável por liberar íons cálcio do retículo sarcoplasmático (aumentando o cálcio intracelular), formando o complexo cálcio-calmodulina que fosforila a enzima eNOS que irá converter a L-arginina, em NO e L-citrulina na célula endotelial (MONCADA, 1994). A ativação da eNOS é dependente da elevação de íons cálcio nas células endoteliais e requerem um doador de elétron, a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) e cofatores como a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), a flavina

mononucleotídeo (FMN) e a tetrahydrobiopterina (BH4) (MONCADA, 1997; MOMBOULI; VANHOUTTE, 1999; VANHOUTTE, 2003).

O estímulo físico ocorre através da força que o sangue exerce na parede das artérias, denominado tensão de cisalhamento ou *shear stress*, que ativa os mecanorreceptores presentes na membrana das células endoteliais. Estes mecanorreceptores podem ser as proteínas Gs, os canais iônicos, a caveolina e as integrinas que captam as alterações de tensão sobre a parede celular e convertem os estímulos mecânicos em estímulos químicos para a ativação da eNOS (KOJDA; HARRISON, 1999). As vias envolvidas neste processo estão relacionadas à ativação de proteínas como a PKC, a c-Src e a Akt/ PI3K que fosforilam a eNOS ativando-a independente da presença de cálcio (HIGASHI; YOSHIKUMI, 2004; KOJDA; HAMBRECHT, 2005).

O NO produzido difunde-se rapidamente das células endoteliais para as células musculares lisas do vaso sanguíneo, onde irá ativar uma enzima catalítica, a guanilato ciclase solúvel (GCs) via acoplamento do NO com o grupamento heme desta enzima (sítio receptor) formando o monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), a partir da quebra do trifosfato de guanosina (GTP). A formação do GMPc desencadeia a inibição da geração de IP₃, o aumento do sequestro de Ca²⁺ citosólico, a desfosforilação da cadeia leve de miosina, a inibição do influxo de Ca²⁺, e o estímulo da Ca²⁺-ATPase de membrana com a abertura de canais para K⁺ (figura 2) (MONCADA; HIGGS, 2006).

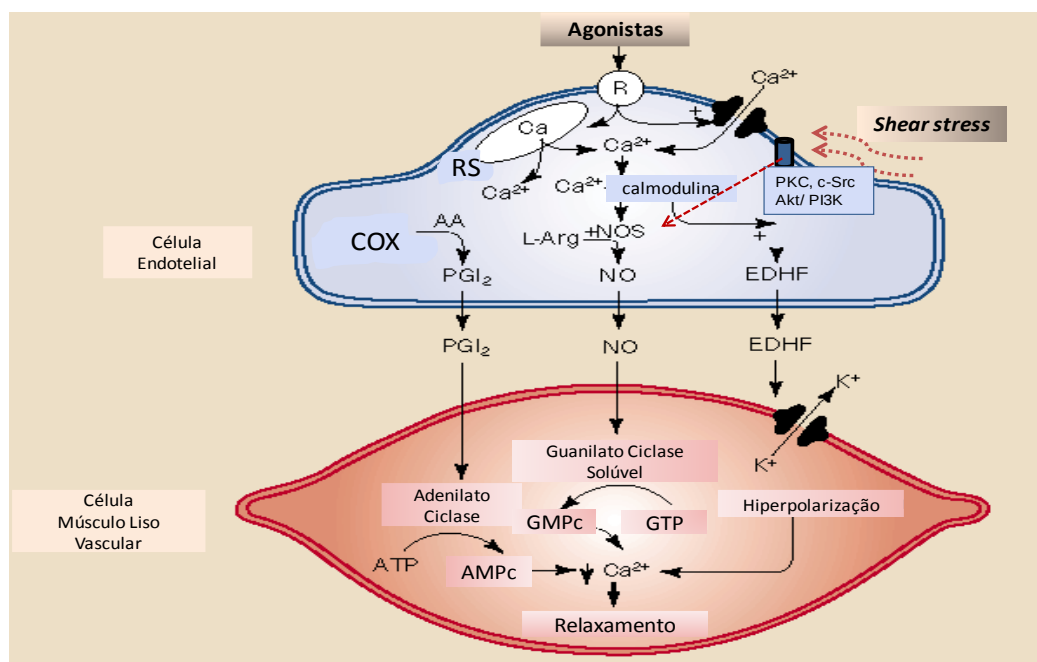


Figura 2. Mecanismo de relaxamento do músculo liso vascular. Produção de Óxido Nítrico mediada por agonistas (linha contínua) e por *shear stress* (linha tracejada) (Adaptado de VANHOUTTE, 2003). R: receptor; Ca^{2+} : cálcio; RS: retículo sarcoplasmático; AA: ácido araquidônico; COX: ciclooxigenase, PGI_2 : prostaciclina; L-Arg: L-arginina; NO: óxido nítrico; NOS: óxido nítrico sintase; EDHF: fator hiperpolarizante derivado do endotélio; PKC: proteína quinase C; c-Src: C-src tirosina quinase; Akt: serina/teonina quinase; PI3K: fosfatidilinositol-3-quinase; ATP: adenosina trifosfato; AMPc: monofosfato de adenosina cíclico; GTP: guanosina trifosfato; GMPC: monofosfato de guanosina cíclico; K^+ : potássio.

A homeostase vascular é mantida por ação das células endoteliais que funcionam como sensores biológicos uma vez que captam alterações no meio, como mudanças de pressão ou no equilíbrio oxidativo, e respondem de modo a reequilibrar o ambiente vascular através da liberação de fatores constritores e dilatadores do vaso que, juntos, regulam a pressão do sangue arterial e a perfusão para o tecido local a fim de assegurar um fornecimento adequado de sangue para todos os tecidos através do controle do grau de contração do músculo liso vascular (NAGAO; VANHOUTTE, 1993; PEARSON, 2000; NASCIMENTO et al, 2003).

A diminuição do relaxamento vascular induzido por acetilcolina tem sido associada não somente à redução dos fatores de relaxamento derivados do endotélio (EDRF), mas também ao concomitante aumento na liberação de fatores de contração derivados do endotélio (EDCF) como o tromboxano (A_2), prostaglandinas PGE_2 e $\text{PGA}_{2\alpha}$, prostanóides contráteis oriundos da atividade de ciclooxigenase (COX) que se contrapõem ao relaxamento vascular induzido pelos EDRF (SILVA, 2013)

2.2. Metabolismo lipídico, disfunção endotelial e aterosclerose

As lipoproteínas são divididas em cinco classes principais: quilomícrons, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), de densidade intermediária (IDL), de baixa densidade (LDL) e de alta densidade (HDL), diferindo, uma da outra, segundo a composição da apolipoproteína de membrana, a densidade, o tamanho e a mobilidade eletroforética (ROSS, 1993).

O papel fundamental dos quilomícrons e das VLDL é transportar, respectivamente, os triglicerídeos alimentares e os de síntese hepática (gordura endógena). Em indivíduos normolipidêmicos cerca de 70% do colesterol total estão contidos nas LDL que, por sua vez, são o produto da degradação das VLDL (lipoproteínas ricas em triglicerídeos) que, na superfície dos capilares, sofrem lipólise continuada pela ação da enzima lipase lipoproteica. Nessa cascata de degradação, em paralelo com a perda de triglicerídeos, o conteúdo de colesterol aumenta progressivamente até chegar ao produto final, as LDL, sendo que o conteúdo de triglicérides é apenas residual e o colesterol, especialmente na forma esterificada, constitui a maior parte dos lipídios contidos nessa lipoproteína. Então, as LDL são removidas da circulação para o interior das células, principalmente as hepáticas, por receptor de membrana que reconhecem a apo B-100 presente na membrana da lipoproteína (SANTOS et al., 2012) (figura 3).

Por outro lado, a principal função da HDL é remover o excesso do colesterol dos tecidos periféricos e de outras lipoproteínas, enviando-os ao fígado, onde será metabolizada e secretada na bile, sendo conhecido como transporte reverso de colesterol (TRC) (INEU et al., 2006). A HDL pode ter origem hepática, intestinal ou ainda ser produto da metabolização de lipoproteínas, como quilomícrons ou VLDL. O TRC inicia-se com a captação de colesterol livre das membranas plasmáticas por meio das pré- β HDL, no espaço intravascular dos tecidos periféricos. Estas se transformam gradativamente em HDL₃ e, pela ação da enzima lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), responsável pela esterificação do colesterol, as HDL tem seu conteúdo de éster de colesterol aumentado e passam a ser denominadas HDL₂. A HDL pode transportar o colesterol diretamente ao fígado ou transferi-lo para as VLDL e LDL, pela ação da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) (LOTTENBERG, 2009).

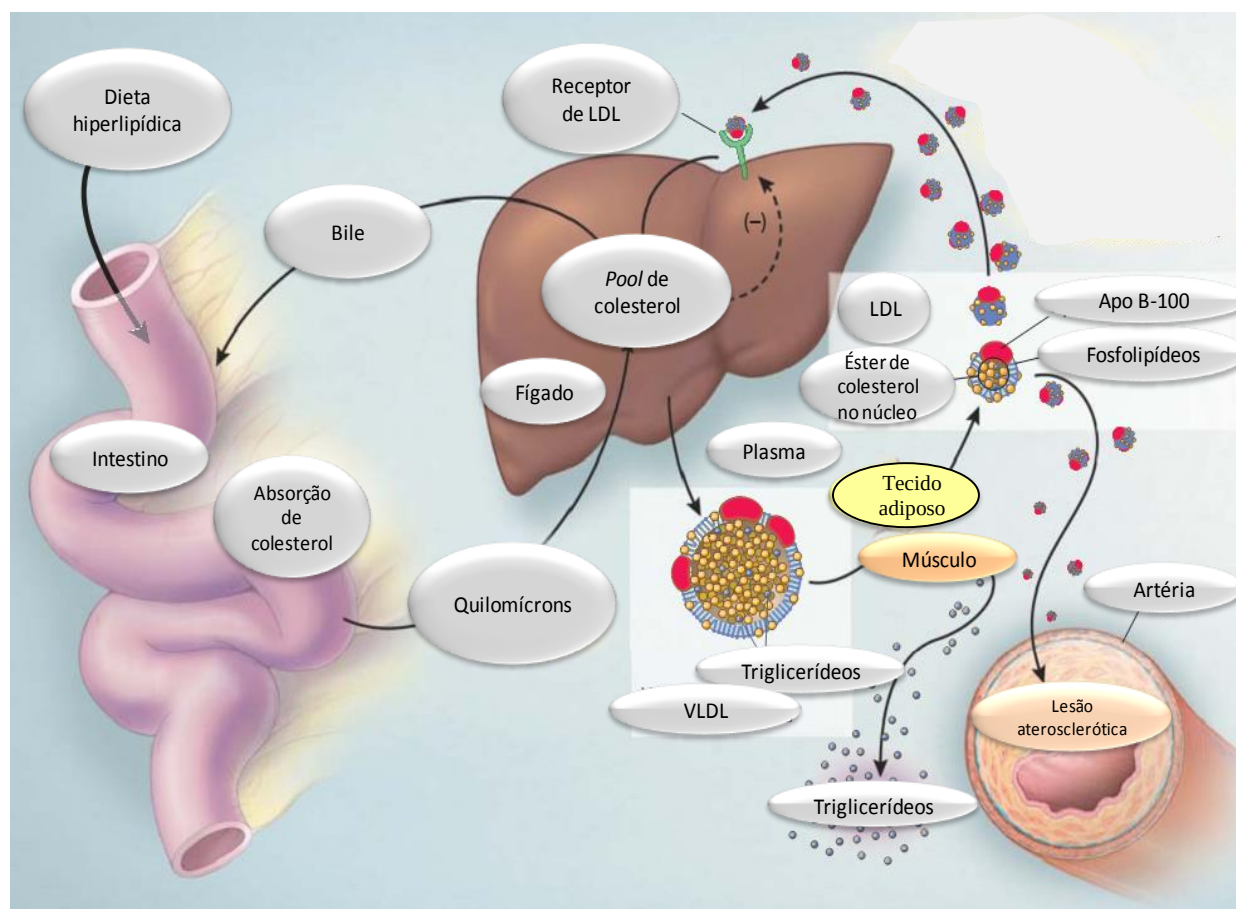


Figura 3. Metabolismo lipídico (Adaptado de NABEL, 2003). VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; Apo B-100: Apolipoproteína B-100

Entre as teorias que explicam o processo aterosclerótico tem grande aceitação a ideia de que o quadro se origina a partir do aumento da concentração plasmática da lipoproteína de baixa densidade (LDL).

A figura 4 ilustra as etapas do processo aterosclerótico. Maiores concentrações de LDL plasmática, principalmente as de menor tamanho, aumentam o risco de infiltração desta lipoproteína para a camada íntima da artéria (1), onde serão oxidadas por ação das espécies reativas de oxigênio (2), posteriormente ocorrerá migração dos monócitos para a camada íntima da artéria (3) e captura das partículas oxidadas de LDL por macrófagos (4) levando a formação das células de espuma, dando início a migração de células de defesa (linfócitos T) e liberação de citocinas pró-inflamatórias, metaloproteínases, ERO, fatores de crescimento celular (5) que poderá resultar em proliferação da camada de músculo liso, disfunção endotelial (6) e formação da placa aterosclerótica (7). Essas alterações resultam em espessamento da parede do vaso, além de

diminuir a capacidade de relaxamento vascular por comprometimento endotelial (MATSUZAWA, 2014).

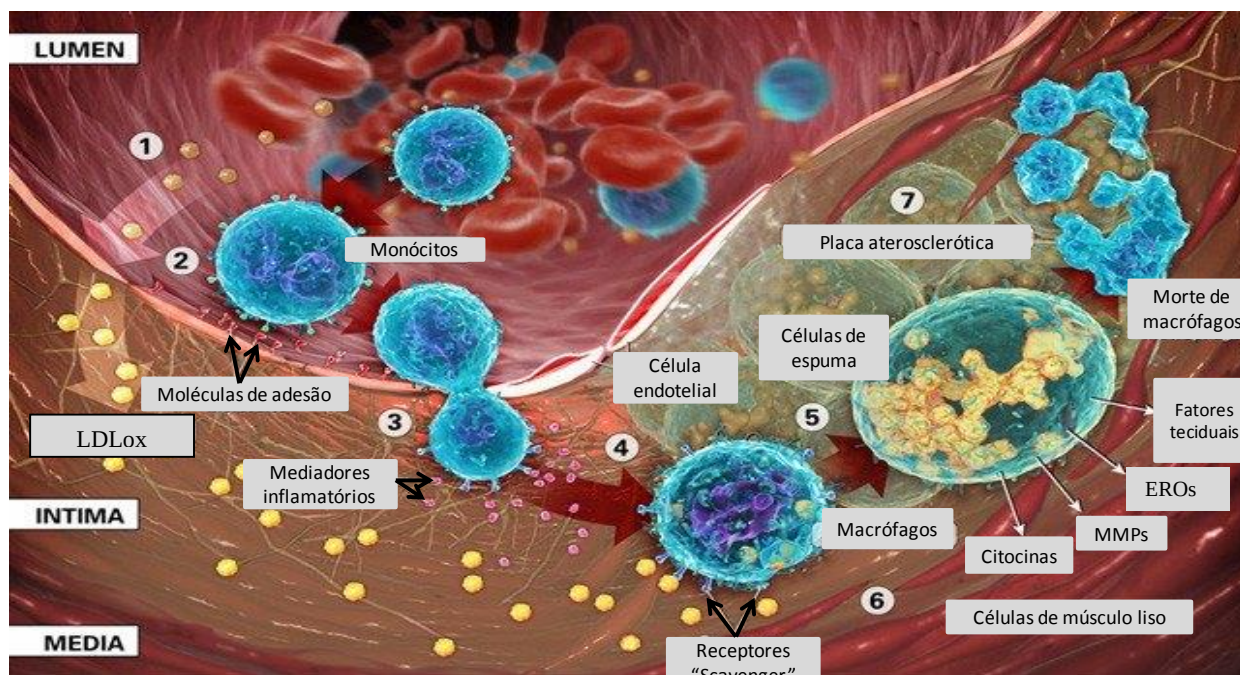


Figura 4. Etapas do processo de aterosclerose (Adaptado de InViVo Communications Inc, disponível em: <http://www.21stcentech.com/biomedicine-part-3-medical-simulation-at-the-beginning-of-the-21stcentury/>). LDLox: lipoproteína de baixa densidade oxidada; MMPs: matrix de metaloproteinases; EROs: espécies reativas de oxigênio

A lesão endotelial ocorre pela ação das células de espuma que secretam citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento celular (WEBER, 2008). Além disso, há evidência de que o LDL oxidado reduz o limiar para a ativação de plaquetas, ação que contribui para a formação de trombos (MAGWENZI et al., 2015).

Redução do relaxamento induzido por acetilcolina em aorta foi observado em camundongos com duplo *knockout* (*apoE^{-/-}* e *LDLR^{-/-}*) alimentados com dieta padrão. O mecanismo relacionado à piora do relaxamento dependente do endotélio durante o processo de aterosclerose não está esclarecido. A diminuição da biodisponibilidade do substrato e do cofator (L-arginina e tetrahidropiridina, respectivamente) para síntese de NO, a redução da atividade da eNOS, aumento da inativação do NO e diminuição da sensibilidade das células de músculo liso ao NO parecem influenciar na redução do relaxamento dependente do endotélio (JORGE et al., 1996; SHAUL, 2003).

O ânion superóxido (O_2^-), o peroxinitrito ($ONOO^-$), o radical hidroxila (OH^-) e o peróxido de oxigênio (H_2O_2) são espécies reativas de oxigênio (ERO) que têm sido associadas a praticamente todos os estágios da lesão vascular aterosclerótica (MADAMANCHI et al., 2005; MUELLER et al. 2005). As ERO são o resultado de processos metabólicos oxidativos e sua produção em condições fisiológicas normais é de fundamental importância na função endotelial. A atividade enzimática intra e extracelular da xantina oxidase, do citocromo P450, da via da cicloxigenase e da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida oxidase (NADPH oxidase) são a principal fonte de ERO no vaso (FORTUÑO et al., 2005). Além destas, a eNOS também passa a produzir ERO em detrimento da produção de NO quando há redução da disponibilidade do precursor de NO, L-arginina, e/ou do cofator tetrahidrobiopterina (BH_4) (PARK; PARK, 2015).

A produção contínua de ERO durante processos metabólicos leva a uma resposta fisiológica no sentido de aprimorar os mecanismos de defesa antioxidante com o objetivo de limitar os níveis intracelulares de ERO e impedir danos celulares. Dentre os agentes antioxidantes presentes no vaso, podemos destacar a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GSH-Px) e mais três tipos de superóxido dismutase (SOD), sendo a SOD-1 dependente de Cu/Zn, presente no núcleo e no citosol, a SOD-2 dependente de Mn, presente na mitocôndria e a SOD-3 dependente de Cu/Zn, presente na matriz extracelular (RUSH et al., 2005). A enzima SOD tem como função dismutar o O_2^- , formando H_2O_2 e as enzimas CAT e GSH-Px, por sua vez, transformam H_2O_2 em H_2O (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). O desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e sua dismutação resulta no aumento da quantidade de ERO no sistema, condição conhecida como estresse oxidativo (WAJCHENBERG, 2002).

Por ser uma espécie radicalar o NO reage rapidamente com outros radicais, como o oxigênio (O_2) e o ânion superóxido (O_2^-). Quando o NO reage com o O_2 forma dióxido de nitrogênio (NO_2), porém quando reage com o O_2^- forma peroxinitrito ($ONOO^-$) (FORTUÑO, 2005). Dessa forma, a disfunção endotelial pode ser caracterizada não somente pela menor produção de NO, mas também pela menor biodisponibilidade desse agente devido ao aumento de sua degradação pela ERO, principalmente o O_2^- (KINGWELL, 2000; KLEINBONGARD et al., 2006).

Além de comprometer a biodisponibilidade do NO, o estresse oxidativo também contribui para o aumento da produção de fatores de contração derivados do endotélio (EDCF), incluindo a endotelina-1, prostaglandina, tromboxano A_2 e angiotensina II. O desequilíbrio entre a produção

de agentes vasodilatadores e vasoconstritores produzidas pelo endotélio é conhecido como disfunção endotelial, quadro que também está associado às doenças cardiometabólicas (GARCIA-REDONDO et al., 2009).

2.2.1 Modelo animal de hipercolesterolemia familiar: camundongo *LDLR*^{-/-}

A hipercolesterolemia familiar (HF) é uma doença genética hereditária caracterizada por elevada concentração circulante de lipoproteína de baixa densidade e um elevado risco para o desenvolvimento prematuro de aterosclerose (MARAIS, 2004). O fenótipo clínico da HF é geralmente decorrente de defeitos no gene *LDLR*, que codifica o receptor de LDL (*LDLR*) e pode também ser secundário a defeitos no gene *APOB*, que codifica a apo B-100 que, quando defeituosa, possui menor afinidade pelo *LDLR*. Nestas duas condições, a captação de partículas de LDL colesterol pelo fígado é reduzida e, conseqüentemente, a concentração circulante desta lipoproteína fica aumentada (BROWN; GOLDSTEIN, 1986; SORIA et al., 1989).

A HF é um problema de saúde mundial reconhecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2010). Estima-se que no mundo todo existam mais de 10 milhões de indivíduos portadores de HF; no entanto, menos de 10% desses têm diagnóstico conhecido de HF, e menos de 25% recebem tratamento hipolipemiante. Um dado preocupante é a alta incidência de doença aterosclerótica prematura (em homens abaixo de 55 anos e em mulheres abaixo de 65 anos), o que reduz a expectativa de vida dos indivíduos portadores de HF (SANTOS, et al., 2012). Estudos em humanos e em animais demonstram que o consumo de grande quantidade de gordura, principalmente do tipo saturada, resulta em elevação do colesterol sérico e maior incidência de aterosclerose (GUEDES et al., 2006; CAMPOS et al., 2010; FERNANDES et al., 2013). Foi demonstrada a efetividade da redução de LDL colesterol na evolução da aterosclerose coronária (KROON et al., 1996; NISHIMURA et al., 1999), nas lesões aórticas (PITSAVOS et al., 1998), no espessamento médio-intimal carotídeo (SMILDE et al., 2001), na função endotelial e em biomarcadores inflamatórios (ALONSO et al., 2001).

O estudo da evolução da aterosclerose é difícil, visto que a doença pode se manifestar já nos estágios iniciais da vida, entretanto, os sintomas podem começar a aparecer décadas depois. Por isso, foi necessário o desenvolvimento de modelo animal que apresentasse evolução rápida da doença, com aumento dos depósitos de gordura na parede vascular (SANTOS, 2008). Assim, dois

modelos de animal geneticamente modificado que mimetizam a HF (deleção do gene receptor de LDL) (ISHIBASHI et al. 1993, 1994) ou a hiperlipidemia tipo III (deleção do gene da apo E) (PIEDRAHITA et al. 1992, PLUMP al. 1992; NAKASHIMA et al. 1994) foram desenvolvidos e são utilizados para o estudo da aterosclerose. No entanto, o modelo que melhor se assemelha a HF é o primeiro (camundongo LDLR^{-/-}) visto que defeitos genéticos afetando o receptor da LDL são os mais comumente observados em humanos (ISHIBASHI, et al. 1993). Quando esses animais são alimentados com dieta pobre em gordura e colesterol, desenvolvem uma lesão mínima na raiz da aorta (ISHIBASHI, 1994) e quando submetidos à dieta hiperlipídica desenvolvem lesão aterosclerótica progressiva (ISHIBASHI, 1993).

Estudo feito por Langbein et al. (2015) demonstrou piora da função endotelial na aorta torácica de camundongos LDLR^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica (39% de gordura, 20% proteína e 41% carboidratos) quando comparado ao grupo *wild type* alimentado com dieta padrão (11% de gordura, 24% proteína, 65% carboidratos) Estudo prévio também observou relaxamento induzido por acetilcolina prejudicado em camundongos LDLR^{-/-} (RABELO, 2003).

2.3 Exercício Físico, função endotelial e aterosclerose

O sistema cardiovascular é amplamente modificado pelo estresse imposto durante o esforço físico, assim, podemos observar alterações morfofuncionais que contribuem para o aumento do inotropismo cardíaco e a redução da resistência vascular periférica, por exemplo (McARDLE et al., 2011). Esta última alteração está relacionada ao aprimoramento da função endotelial que ocorre em resposta à tensão de cisalhamento (ou *shear stress*) induzido pelo aumento do fluxo sanguíneo pulsátil e pressão que o sangue exerce sobre a parede vascular, o que estimula a célula endotelial a produzir e liberar o NO, resultando em relaxamento da musculatura lisa vascular (MONCADA et al., 1991; COHEN; VANHOUTTE, 1995).

Estudos em modelo animal que realizaram protocolo de exercício físico aeróbio mostraram aumento da expressão de eNOS, da produção de NO e do número de cavéolas, dessa maneira, têm comprovado os efeitos benéficos do exercício físico na prevenção ou tratamento de doenças cardiovasculares (NAPOLI et al., 2004; TEODORO et al., 2010).

Ao analisar a área da lesão aterosclerótica, Fernandes et al. (2013) encontraram que camundongos apoE^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica que realizaram exercício aeróbio em esteira (corrida, 15m/min, 30 min/dia 5 dias/semana por 12 semanas) apresentaram menor área da lesão aterosclerótica, sem modificação do perfil lipídico, quando comparados aos animais sedentários. Os mecanismos propostos para explicar este achado estão relacionados à diminuição de espécies reativas e da inflamação sistêmica e ao aumento da vasodilatação mediada por NO. O estudo de Pynn et al. (2004) apresentou resultados semelhantes utilizando a mesma linhagem de animais (camundongos apoE^{-/-}) que foram submetidos a um programa de exercício físico (corrida 15m/min, 60 min/dia, 5 dias/semana por 6 semanas) e nenhuma alteração no peso corporal ou nos níveis de lipídeos foi observada, entretanto, houve aumento da expressão da eNOS e da biodisponibilidade de NO na carótida, o que poderia limitar o tamanho da placa de ateroma.

Resultados semelhantes foram observados em camundongos LDLR^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica. Meilhac et al. (2001) observaram menor lesão aterosclerótica na aorta de camundongos LDLR^{-/-} submetidos ao exercício físico aeróbio (corrida, 15m/min, 30 min/dia, 5 dias/semana por 12 semanas), sendo que os mecanismos relacionados a estes achados foram o aumento da expressão da eNOS, da catalase e da glutathione peroxidase. O estudo de Ramachandran et al. (2005) utilizando a mesma linhagem de animais e protocolo de exercício igual ao do estudo

anterior observaram redução da área da lesão aterosclerótica independente de modificações no perfil lipídico, sendo os achados relacionados ao aumento da expressão da SOD e aumento da biodisponibilidade de NO.

A utilização de outra modalidade de exercício aeróbio, a natação (intensidade moderada, 60 min/dia, 5 dias/semana, por 18 semanas), também produziu efeito sobre a expressão da eNOS, tanto no plasma quanto em homogenato de aorta, aumentando-a, além de reduzir a quantidade de espécies reativas em camundongos LDLR^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica (NAPOLI et al., 2004).

Fukai et al. (2000) demonstraram que o aumento da expressão da ecSOD em vasos é dependente de NO. Para isso, submeteram camundongos eNOS^{-/-} a um protocolo de exercício aeróbio (corrida, 15m/min, 30 min/dia, 5 dias/semana por 3 meses) e mostraram que o *shear stress* produzido pelo exercício físico não promoveu aumento da expressão desta enzima antioxidante, resultado que foi observado em camundongos *wild type* submetidos ao mesmo protocolo de exercício. Esta dependência foi confirmada em estudo com cultura de células em que a expressão de ecSOD foi aumentada após incubação com doador de NO.

Portanto, além de aprimorar a via do NO, trabalhos mostram que o exercício físico modifica o balanço redox, pois, aumenta a atividade do aparato antioxidante (JIANG et al., 2000; MEILHAC et al., 2001; RABELO et al., 2003; NAPOLI et al., 2004; CZARKOWSKA-PACZEK et al., 2009).

Protocolo de exercício realizado por 4 semanas (corrida, 50%-70% da velocidade máxima, 60 min/dia, 5 vezes/semana) também foi eficaz em reduzir a área de lesão aterosclerótica e os marcadores de estresse oxidativo, além de reduzir o colesterol plasmático de camundongos LDLR^{-/-} fêmeas (ovarectomizadas) alimentadas com dieta padrão (HEEREN et al., 2009). Modificação do perfil lipídico com redução de frações não-HDL também foi observada em camundongos LDLR^{-/-}, alimentados com dieta padrão, que realizaram corrida voluntária (MOREIRA et al., 2013). Por outro lado, no estudo de Fernandes et al. (2013) foi observado aumento da concentração de colesterol total e de LDL em camundongos apoE^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica e submetidos ao exercício físico aeróbio (corrida, 15m/min, 30 min/dia, 5 dias/semana por 12 semanas).

3. JUSTIFICATIVA

Animais alimentados com dieta contendo alto teor de lipídeos apresentam diminuição da resposta relaxante dependente do endotélio em aorta e aorta torácica (CRAUWELS, et al., 2003; RABELO, 2003) dano que foi prevenido com a realização de exercício físico (LANGILLE et al. 1996; MEISSNER et al. 2011). Entretanto, a maioria dos estudos encontrados na literatura investigou os efeitos do exercício físico em artéria de maior calibre (aorta) e em modelos de dislipidemia induzida por dieta. Há escassez de estudos que avaliam os efeitos do exercício físico em artéria de menor calibre (femoral, ilíaca e coronária) e, principalmente, em modelo que mimetiza a hipercolesterolemia familiar.

A artéria ilíaca é um vaso de condutância suscetível ao desenvolvimento da aterosclerose, pois, sua estrutura anatômica apresenta um ponto em que há redução da velocidade do fluxo sanguíneo (bifurcação que a divide em ilíaca interna e ilíaca externa). Uma vez instalada a placa de ateroma há redução ou obstrução do fluxo sanguíneo para o membro inferior causando o sintoma de dor nas pernas devido à reduzida perfusão e oxigenação da área irrigada pela artéria ilíaca. Esta condição clínica é conhecida como Doença Arterial Obstrutiva Periférica (PEDRON, 2001).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do treinamento físico aeróbico de intensidade moderada na resposta vascular da artéria ilíaca em camundongos LDLR^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica.

4. OBJETIVO

Avaliar o efeito do treinamento físico aeróbio de moderada intensidade na reatividade vascular da artéria ilíaca camundongos LDLR^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica.

Objetivos específicos:

- Avaliar a reatividade vascular em anéis de artéria ilíaca, com endotélio intacto, aos seguintes agentes:
 - ✓ Resposta relaxante: acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (SNP);
 - ✓ Resposta contrátil: fenilefrina (PHE) e análogo do tromboxano A2 (U46619).
- Avaliar a produção de NO e de espécies reativas de oxigênio (ERO) em artéria ilíaca:
 - ✓ Quantificar a produção de NO por análise de fluorescência ao 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2)
 - ✓ Quantificar a produção de espécies reativas de oxigênio por análise da fluorescência derivada da oxidação da dihidroetidina (DHE)
- Avaliar o perfil metabólico dos animais:
 - ✓ Quantificar a concentração de glicose, colesterol total e triglicerídeos no sangue
 - ✓ Quantificar a massa adiposa epididimal

5. MATERIAL E MÉTODO

5.1 Animais

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (CEUA-IB-UNICAMP, protocolo: 3537-1).

Camundongos *wild type* (C57BL/6J) e camundongos *knockout* para o receptor do LDL colesterol (LDLR^{-/-}) com 3 meses de idade, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB-UNICAMP) foram mantidos no Biotério de Manutenção do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Área da Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (DBEF-IB-UNICAMP). Os camundongos foram alojados em caixas coletivas com 5 animais cada, em local com temperatura controlada entre 22°C e 24°C e com ciclo claro/escuro de 12 horas.

Os camundongos LDLR^{-/-} foram alimentados com dieta comercial tipo hiperlipídica sendo a fonte energética composta de: 32% de carboidratos, 20,3% de proteínas, 38% de lipídios, 5% de fibras, 3,5% de minerais e 1,2% de vitaminas contendo 6,2 Kcal/g (PragSoluções Biociências, SP- Brasil). Os camundongos do grupo *wild type* foram alimentados com ração comercial (Nuvilab® CR1, PR-Brasil), com distribuição de macronutrientes conforme segue: 68% de carboidratos, 22% de proteínas e 10% lipídios contendo 3,6 Kcal/g. Todos os camundongos tiveram livre acesso à água e à alimentação (ração comercial ou dieta hiperlipídica). O peso corporal e a ingestão alimentar dos animais foram medidas semanalmente até o final do estudo e o ganho de peso corporal foi calculado pela diferença entre o peso corporal final e peso corporal inicial.

Assim, os camundongos foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

1. Camundongos controle com ração comercial (Nuvilab®) e sedentários (WT, n=17);
2. Camundongos controle com ração comercial (Nuvilab®) e treinados (WT/Ex, n=17);
3. Camundongos LDLR^{-/-} com dieta tipo hiperlipídica e sedentários (KO, n=25);
4. Camundongos LDLR^{-/-} com dieta tipo hiperlipídica e treinados (KO/Ex, n=23).

5.2 Adaptação ao ergômetro e teste incremental máximo

O ergômetro utilizado foi uma esteira para pequenos animais e com baias individuais (Gesam, SP – Brasil). Uma semana antes do início do protocolo experimental, os animais foram submetidos a um período de adaptação à esteira onde a velocidade de corrida foi progressivamente aumentada variando de 5 metros/minuto (m/min) no primeiro dia até 8 m/min no quarto dia da semana, sendo que as sessões de exercício tinham duração de 10 a 15 minutos e eram realizadas uma vez por dia. Esta adaptação teve como objetivo minimizar o possível estresse causado nos animais devido ao uso da esteira. Somente os animais adaptados à esteira seguiram às próximas etapas do estudo.

No quinto dia da semana os animais adaptados realizaram um teste incremental máximo, em que a velocidade inicial foi de 8 m/min e foi progressivamente aumentada em 3,2 m/min a cada 3 minutos, com 0% de inclinação. O critério utilizado para a determinação da exaustão e finalização do teste foi o animal tocar o fundo da baia por no máximo 5 vezes, demonstrando a incapacidade de manter o esforço (BROOKS; WRITE, 1978). A velocidade em que ocorreu a exaustão foi considerada como velocidade máxima ($V_{\max}$). Este teste apresenta correlação significativa com a medida do consumo direto de oxigênio em roedores machos, o que permite fidedignidade para o controle do treinamento físico (Adaptado de FERREIRA et al., 2010; RODRIGUES et al., 2006).

À partir do desempenho no teste incremental os animais foram divididos em grupos sedentários e treinados, sendo que este último foi composto por animais que apresentaram melhor padrão de corrida.

5.3 Programa de treinamento físico aeróbio

Os treinos eram realizados em 5 dias da semana (segunda a sexta-feira) sempre no período da manhã. É importante salientar que os animais foram agrupados para o treinamento físico de acordo com a velocidade de treinamento.

Durante a primeira semana a intensidade e a duração das sessões foram progressivamente aumentadas. Inicialmente os animais correram por 40 minutos e com o decorrer da semana a duração da sessão foi aumentada até que se chegasse aos 60 minutos. A velocidade de corrida variou entre 40% $V_{\max}$ no primeiro dia até 45% $V_{\max}$ no último treino da semana.

A partir da segunda semana de treinamento as sessões passaram a ser de 60 min, com velocidade entre 60% $V_{\max}$ até 70% $V_{\max}$. Da terceira até a oitava semana os animais correram a 70% $V_{\max}$ durante 60 minutos.

A eficácia do treinamento físico foi avaliada através do teste de esforço máximo realizado ao final do período de treinamento. Assim como no início do experimento, todos os animais foram submetidos ao teste, em que o tempo total, distância total e velocidade máxima foram determinados.

5.4 Obtenção das amostras de soro e de tecidos

Ao término das oito semanas de treinamento, os animais foram mantidos em repouso por um período de 48 horas e jejum nas últimas 12 horas que antecederam o sacrifício.

Os animais foram anestesiados com 2 g/Kg de uretano via intraperitoneal e após a confirmação do efeito da droga (ausência de reflexo caudal) foi realizada a punção cardíaca para a coleta do sangue total. Após este procedimento o diafragma do animal foi rompido e as amostras de tecido adiposo branco da região epididimal foram coletas e pesadas imediatamente. A artéria ilíaca foi removida cuidadosamente e mantida em solução preparada de Krebs contendo (mM): NaCl- 118; NaHCO_3 - 25; glicose- 5,6; KCl- 4,7; KH_2PO_4 - 1,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 1,17 e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 2,5. Parte da artéria ilíaca foi utilizada para os ensaios de reatividade vascular e outra porção, de aproximadamente 2 mm, foi imersa em meio para congelamento Tissue-Tek® OCT™ (Sakura Finetek Inc., CA, EUA),

As amostras de sangue foram centrifugadas por 15 minutos a 3000 rotações/minuto e as alíquotas do soro foram congeladas em freezer a -80 °C para posteriores análises.

5.5 Determinação de parâmetros bioquímicos

A glicose sanguínea de jejum foi determinada utilizando uma gota de sangue extraída da cauda do animal e depositada em fitas reativas de teste que foram inseridas em monitor digital de glicemia seguindo as instruções do fabricante (Advantage Roche, SP, Brasil). Esta medida foi realizada antes da utilização do anestésico para excluir a interferência do uso do uretano sobre a glicemia.

Amostras de soro congeladas foram utilizadas para a determinação do colesterol total (CT) e dos triglicerídeos (TG) utilizando kit CHOD-PAP (Roche Diagnostics GMBH, BW, Alemanha).

Para a determinação do CT, foram necessários 2 µl de amostra e acrescentados 200 µl de reagente em todas as amostras. No espectrofotômetro foi feita a leitura da absorbância com filtro e comprimento de onda de 492nm. Para a determinação do TG, foram necessários 4 µl de amostra e acrescentados 200 µl de reagente. No espectrofotômetro foi feita a leitura da absorbância com filtro e comprimento de onda de 492 nm.

5.6 Curvas concentração-resposta em anéis de artéria ilíaca

A artéria ilíaca foi isolada, cuidadosamente limpa e cortada em anéis sendo que cada anel teve medido o seu comprimento (aproximadamente 2 mm), com a utilização de retículo micrométrico (Nikon Instruments, NY, EUA). Cada anel foi montado em sistema de miógrafo multicanais para pequenos vasos (Modelo 610M, DMT A/S, NA, Dinamarca) utilizando dois fios de tungstênio com 20 µm de diâmetro cada e mantidos em 5 ml da solução de Krebs aquecida a 37°C, pH 7,4 e areada com 95 % de O₂ e 5 % de CO₂. A tensão basal inicial foi calculada através da normalização da dimensão dos vasos utilizando uma curva de circunferência interna por tensão da parede (MULVANY; HALPERM, 1977). Através dos valores gerados de circunferência interna o diâmetro de cada anel foi calculado. As alterações de tensão do tecido foram obtidas utilizando transdutores isométricos e registradas em sistema PowerLab 400TM de aquisição de dados e o software versão 7,0 (AD Instruments, MA, EUA).

Após o período de 45 minutos de estabilização, a solução Krebs foi substituída por solução de KCl 80 mM para a verificação da viabilidade do tecido e após a obtenção da resposta máxima foram lavados com solução de Krebs.

Curvas concentração-resposta aos vasodilatadores acetilcolina (ACh: 1nM - 300 µM) e nitroprussiato de sódio (SNP: 100 fM - 3 µM) foram obtidas. O relaxamento foi determinado em relação a pré-contracção induzida pelo análogo do tromboxano A₂ (U46619) em concentração suficiente para produzir 50-80% da contracção máxima.

Os efeitos contráteis do agonista α -adrenérgico, fenilefrina (PHE: 1 nM - 300 µM, na presença de propranolol 100nM incubado por 30 minutos) e do análogo do tromboxano A₂

(U46619: 100 pM - 3 μ M) também foram avaliados. Os valores de contração foram determinados em milinewton (mN) por milímetro (mm) de artéria (mN/mm).

As curvas concentração-resposta foram obtidas através do aumento cumulativo das concentrações do agonista em meia unidade logarítmica entre doses sucessivas (VAN ROSSUM; 1963). Os dados obtidos foram avaliados através da equação descrita:

$$E = E_{MAX} / \{ [1 + (10c/10x)^n] + \Phi \}$$

Onde E representa o efeito do agonista na resposta tecidual; E_{MAX} representa a resposta máxima que o agonista produziu; c representa o logarítmo da EC_{50} , definida como a concentração do agonista que produz metade da resposta máxima; x representa o logarítmo das concentrações do agonista, o termo exponencial n é o coeficiente angular ou inclinação, parâmetro que define o tipo de curva concentração-resposta obtida; por fim o símbolo Φ representa a resposta observada na ausência do agonista. A análise de regressão não linear para determinar os parâmetros: E_{MAX} , log EC_{50} (pEC_{50}) e n foram determinados utilizando o programa GraphPad Prism (GraphPad Software, CA, EUA) com o valor basal Φ = zero.

5.7 Produção de NO e espécies reativas de oxigênio (ERO) em artéria ilíaca

A determinação da produção de NO foi realizada pela análise de fluorescência ao 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2) como previamente descrito (DELBIN et al., 2012). O diacetato (DAF-2 DA) entra nas células e é hidrolisado por esterases do citosol em DAF-2. Na presença de NO e oxigênio, DAF-2 é transformado na forma de triazol, emitindo uma fluorescência verde (KOJIMA et al., 1998). Cortes histológicos de 10 μ m de espessura foram obtidas em criostato a -25°C. Dois cortes de cada amostra foram colocados sobre lâminas com silanina e incubados com 100 μ l de tampão fosfato 0,1M (pH=7,4) contendo cálcio (0,45mM) por 30 minutos em câmara úmida a 37°C. Posteriormente, uma nova incubação foi realizada com tampão fosfato e DAF-2 (8 μ M) por 30 minutos em câmara úmida (37°C) ao abrigo da luz, o que caracterizou a incubação “basal”. O segundo corte da mesma amostra foi incubado com o mesmo tampão (contendo cálcio e DAF-2), porém após 15 minutos de incubação foi acrescentado 30 μ M de acetilcolina e a incubação permaneceu por mais 15 minutos em câmara úmida (37°C) ao abrigo da luz, o que caracterizou a incubação “ACh”. As imagens foram captadas em microscópio óptico Eclipse 80i (Nikon, TYO, Japão) utilizando-se objetiva com aumento de 20 vezes acoplada a uma câmara

fotográfica DS-U3(Nikon, TYO, Japão). Para a fluorescência de DAF-2 utilizamos o filtro de fluoresceína e sua quantificação foi realizada utilizando o Software ImageJ 1.46p (NIH, MD, EUA). Mediu-se a densidade integrada em 7 regiões aleatórias de cada corte com área fixa (camada de músculo liso) e a média desses valores foi considerada a medida final de cada amostra. A quantificação da produção de NO pela fluorescência de DAF-2 foi medida no estado basal e após incubação por 15 minutos com ACh (30 μ M).

A avaliação da produção tecidual de ERO foi realizada pela análise da fluorescência derivada da oxidação da dihidroetidina (DHE), como previamente descrito (HERNANZ et al., 2004; WENCESLAU et al., 2011). A DHE atravessa a membrana celular e, na presença de espécies reativas de oxigênio, é oxidada em brometo de etídio, o qual se intercala ao DNA, emitindo uma fluorescência vermelha. Esta sonda é particularmente mais sensível à oxidação por ânion superóxido, em comparação a outras espécies reativas como o peroxinitrito, radical hidroxila, peróxido de hidrogênio, ânion hipoclorito e oxigênio singlete (PIECH et al., 2003).

Os cortes transversais de artéria ilíaca (obtidos conforme descrito anteriormente) foram incubados por 30 minutos com 100 μ l de tampão fosfato 0,1M (pH=7,4) contendo DTPA (10^{-4} M) por 30 minutos em câmara úmida a 37°C. Posteriormente, uma nova incubação foi realizada com tampão fosfato e DHE (Sigma-Aldrich, MO, EUA) e também com agente mimético à superóxido dismutase (SOD) por 30 minutos cada em câmara úmida (37°C) ao abrigo da luz. As imagens foram captadas em microscópio óptico Eclipse 80i (Nikon, TYO, Japão), utilizando-se objetiva com aumento de 20 vezes acoplado a uma câmera fotográfica DS-U3 (Nikon, TYO, Japão). Para detecção da fluorescência de DHE foi utilizado o filtro de rodamina e sua quantificação foi realizada utilizando o Software ImageJ 1.46p (NIH, MD, EUA). Mediu-se a densidade integrada em 7 regiões aleatórias de cada corte com área fixa (camada de músculo liso) e a média desses valores foi considerada a medida final de cada amostra. A quantificação da produção de ERO pela fluorescência de DHE foi medida no estado basal e após incubação por 30 minutos com agente mimético à superóxido dismutase (2,5 μ M).

5.8 Análise Estatística

Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (S.E.M) para n experimentos. Análise de variância, ANOVA two-way, seguida de pós-teste de Bonferroni, foi empregada para avaliar diferenças entre os grupos experimentais utilizando o programa Graph Pad

Prism 5.0 (GraphPad Software, CA, EUA). Para constatar a efetividade do treinamento físico os resultados do teste incremental de cada grupo foram comparados utilizando Teste t pareado utilizando o programa Graph Pad InStat (GraphPad Software, CA, EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

6. RESULTADOS

6.1 Teste incremental máximo e eficácia do protocolo de treinamento

Não houve diferença no desempenho dos animais no teste incremental realizado na semana de adaptação ao ergômetro. Ao final do protocolo de treinamento físico, os grupos treinados (WT/Ex e KO/Ex) apresentaram melhora do desempenho com aumento da velocidade máxima (41% e 37% respectivamente), da distância total percorrida (86% e 71%, respectivamente) e do tempo total de teste (42% e 44%, respectivamente) quando comparados aos seus resultados iniciais. Por outro lado, os animais sedentários apresentaram pior desempenho após oito semanas, sendo que para o grupo KO esta redução foi mais pronunciada. Com base nesses resultados, podemos comprovar a eficácia do protocolo de treinamento físico empregado neste estudo (tabela 1).

Tabela 1. Teste incremental máximo realizado no início e ao final do protocolo de treinamento físico dos grupos *wild type* sedentário (WT), *wild type* treinado (WT/Ex), *knockout* sedentário e *knockout* treinado (KO/Ex). (KO) e *knockout* treinado (KO/Ex)

	WT	WT/Ex	KO	KO/Ex
Velocidade máxima inicial (m/min)	25,7 ± 0,43	25,7 ± 0,94	25,2 ± 0,72	25,2 ± 0,91
Velocidade máxima final (m/min)	23,6 ± 0,72 ^{\$}	36,6 ± 1,13* ^{\$}	21,9 ± 0,77 ^{\$}	34,5 ± 1,56* ^{\$}
Distância inicial (m)	343,7 ± 17,81	348,4 ± 26,62	332,6 ± 11,75	359,21 ± 26,08
Distância final (m)	308,9 ± 17,24	648,2 ± 49,37* ^{\$}	277,2 ± 17,59 ^{\$}	614,5 ± 47,08* ^{\$}
Tempo inicial (min)	19,4 ± 0,62	20,1 ± 1,03	19,4 ± 0,51	19,5 ± 0,92
Tempo final (min)	18,1 ± 0,67	28,5 ± 1,38* ^{\$}	16,9 ± 0,79 ^{\$}	28,1 ± 1,35* ^{\$}

Dados expressos como média ± EPM. O *n* experimental foi de: WT=17, WT/Ex=17, KO=23, KO/Ex=22. *diferente de WT; +diferente de KO (ANOVA *two-way*), ^{\$}diferente da condição inicial (Teste *t* pareado).

6.2 Ganho de peso corporal, gordura epididimal e consumo alimentar

Ao final do protocolo experimental, a comparação entre os grupos WT e KO evidenciou maior ganho de peso (cerca de 640% superior) e de gordura epididimal (510%) no grupo KO. O protocolo de treinamento físico foi efetivo para amenizar o ganho de peso corporal e o aumento da gordura epididimal no grupo KO/Ex (aumento de 167% e 121%, respectivamente, comparado com WT), entretanto, estas variáveis ainda foram maiores para o grupo KO/Ex em comparação ao WT/Ex. Com relação ao consumo alimentar, os animais dos grupos KO, alimentados com dieta hiperlipídica, consumiram menor quantidade de alimento ingerida (em gramas), entretanto, a ingestão energética (em Kcal) foi maior para estes grupos. Os valores médios de cada variável estão mostrados na tabela 2.

Tabela 2. Peso inicial, peso final, ganho de peso corporal e peso da gordura epididimal de camundongos dos grupos *wild type* sedentário (WT), *wild type* treinado (WT/Ex), *knockout* sedentário (KO) e *knockout* treinado (KO/Ex).

	WT	WT/Ex	KO	KO/Ex
Peso inicial (g)	24,8±0,49 (17)	23,9±0,80 (17)	23,2±0,31 (25)	23,3±0,59 (24)
Peso final (g)	26,3±0,43 (17)	26,1±0,64 (17)	33,4±0,10 (23)*	27,1±0,78 (22) ⁺ &
Ganho de peso (g)	1,5±0,29 (17)	2,2±0,54 (17)	11,1±0,91 (23)*	4,0±0,52 (22) ⁺ &
Gordura epididimal (g)	0,3±0,02 (17)	0,2±0,01 (17)	1,1±0,12 (23)*	0,6±0,05 (20) ⁺ &
Consumo alimentar (g/animal/dia)	5,0±0,29	5,2±0,39	3,5±0,08*	3,6±0,08 ^{&}
Ingestão energética (Kcal/animal/dia)	18,1±1,06	17,6±0,91	21,5±0,49*	22,2±0,48 ^{&}

Dados expressos como média ± EPM. O *n* experimental está inserido entre parêntesis. A diferença entre o *n* inicial e o final deve-se à morte de animais durante o período experimental, exceto para gordura epididimal no grupo KO/Ex em que dois resultados foram excluídos. *diferente de WT; &diferente de WT/Ex; +diferente de KO; para *p*<0,05 (ANOVA two-way).

6.3 Parâmetros Bioquímicos

O grupo KO apresentou maior concentração de glicose, colesterol total e triglicerídeos (35%, 180% e 99%, respectivamente) comparado ao grupo WT. O protocolo de treinamento físico não foi eficaz para modificar estes parâmetros em animais KO/Ex ou em animais WT/Ex (Figura 5).

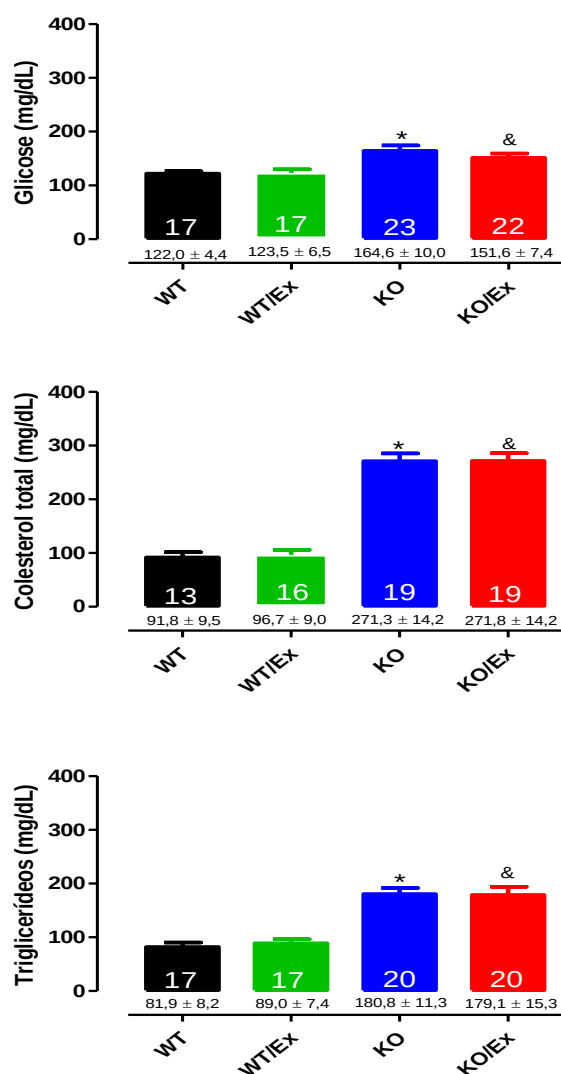


Figura 5. Concentração de glicose, colesterol total e triglicerídeos de camundongos dos grupos *wild type* sedentário (WT), *wild type* treinado (WT/Ex), *knockout* sedentário (KO) e *knockout* treinado (KO/Ex). Dados estão expressos como média ± EPM. O *n* experimental está mostrado em cada coluna, houve perda de amostra para as dosagens de colesterol total e de triglicerídeos. *diferente de WT; &diferente de WT/Ex; para $p < 0,05$ (ANOVA two-way).

6.4 Reatividade vascular em artéria ilíaca

O valor médio do diâmetro da artéria ilíaca em animais do grupo KO foi 23% maior comparado ao grupo WT. Em animais do grupo KO/Ex esta alteração não foi observada. Com relação à resposta máxima induzida pela solução de KCl (80 mM) foi observada resposta semelhante entre os grupos experimentais. A tabela 3 mostra os valores do diâmetro da artéria ilíaca e o delta de contração em resposta ao cloreto de potássio.

Tabela 3. Diâmetro da artéria e o delta de contração em resposta ao Δ KCl de anéis de artéria ilíaca, com endotélio intacto, de camundongos dos grupos *wild type* sedentário (WT), *wild type* treinado (WT/Ex), *knockout* sedentário (KO) e *knockout* treinado (KO/Ex).

	WT (9)	WT/Ex (8)	KO (10)	KO/Ex (12)
Diâmetro da ilíaca (μm)	215,5 $\pm$ 18,88	263,6 $\pm$ 13,90	277,4 $\pm$ 12,87*	223,5 $\pm$ 11,55 ⁺
Δ contração ao KCl (mN/mm)	4,0 $\pm$ 0,69	4,3 $\pm$ 0,67	5,1 $\pm$ 0,32	4,8 $\pm$ 0,65

Dados estão expressos como média $\pm$ EPM. *diferente de WT; ⁺ diferente de KO; para $p < 0,05$ (ANOVA *two-way*). O n experimental está mostrado entre parêntesis. Para este ensaio a quantidade de elementos por grupo está reduzida devido a problemas metodológicos que levaram à perda de viabilidade dos tecidos.

Com relação à resposta relaxante, redução significativa na resposta máxima à acetilcolina foi observada em artérias de animais do grupo KO quando comparado ao grupo WT. A realização de exercício físico, neste caso, preveniu completamente a redução do relaxamento dependente do endotélio (Figura 6, painéis A e C). Nenhuma diferença foi verificada na resposta máxima ao nitroprussiato de sódio entre os grupos experimentais (Figura 6, painéis B e D). A potência dos agonistas de relaxamento não foi modificada (Tabela 4).

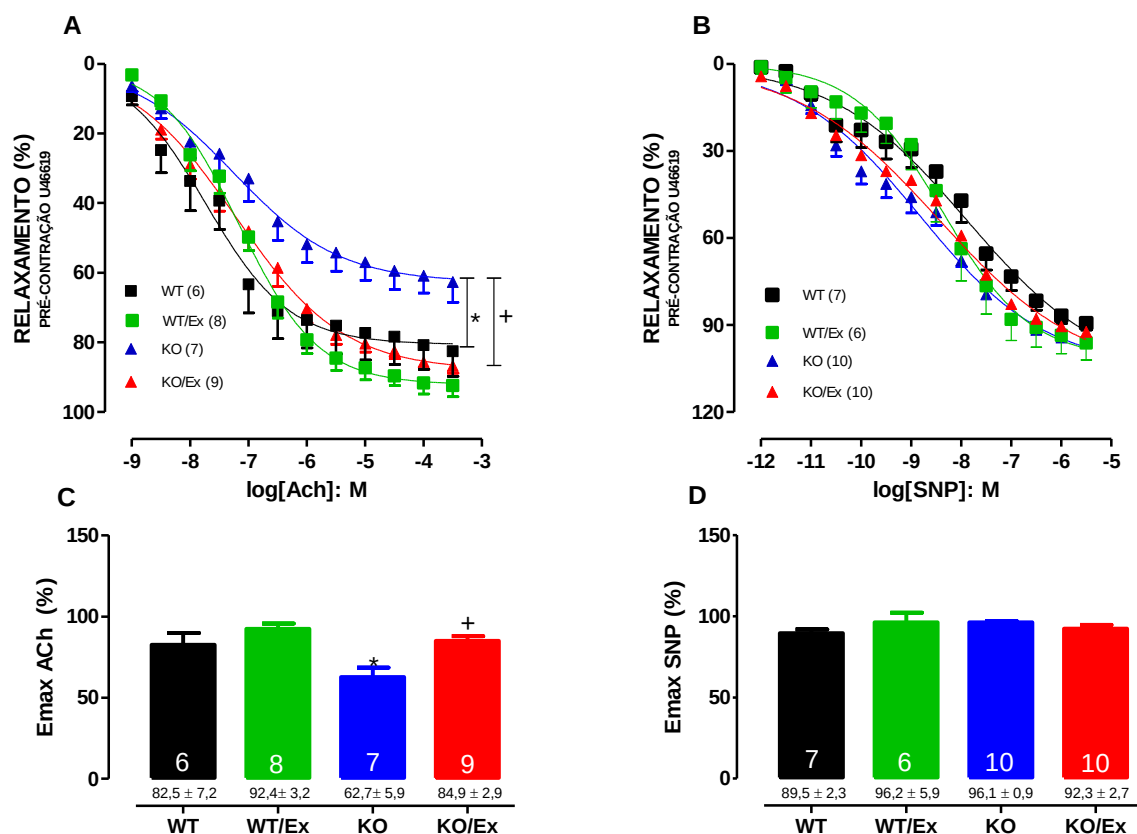


Figura 6. Curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh, painel A) e ao nitroprussiato de sódio (SNP, painel B) em anéis de artéria ilíaca com endotélio intacto de camundongos dos grupos *wild type* sedentário (■ WT), *wild type* treinado (■ WT/Ex), *knockout* sedentário (▲ KO) e *knockout* treinado (▲ KO/Ex). Respostas máximas (Emax) estão quantificadas nos gráficos de coluna (painel C e D). Dados estão expressos como média ± EPM. O *n* experimental está mostrado em cada coluna. *diferente de WT; + diferente de KO; para $p < 0,05$ (ANOVA two-way).

Tabela 4. Valores de potência (pEC_{50}) obtidos a partir de curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh) e ao nitroprussiato de sódio (SNP) em anéis de artéria ilíaca, com endotélio intacto, de camundongos dos grupos *wild type* sedentário (WT), *wild type* treinado (WT/Ex), *knockout* sedentário (KO) e *knockout* treinado (KO/Ex).

	WT	WT/Ex	KO	KO/Ex
ACh	7,39 ± 0,30 (6)	7,16 ± 0,05 (8)	7,33 ± 0,20 (7)	7,28 ± 0,12 (9)
SNP	6,17 ± 0,24 (7)	6,32 ± 0,29 (6)	6,96 ± 0,20 (10)	6,68 ± 0,28 (10)

Dados de potência são representados como $-\log$ da concentração do agonista necessária para produzir 50% da resposta máxima. Dados estão expressos como média ± EPM. O *n* experimental está mostrado entre parêntesis.

Foi observado aumento da resposta contrátil e da potência do agonista α -adrenérgico fenilefrina em artérias de animais do grupo KO em comparação aos animais do grupo WT, sendo este aumento de 65% para $E_{\max}$ e de 3 vezes para a pEC_{50} . A resposta contrátil ao análogo do tromboxano A_2 , U46619, não foi significativamente modificada nos animais KO ou nos animais exercitados. As curvas para ambos os agonistas contráteis são mostradas na figura 7 e a pEC_{50} na tabela 5.

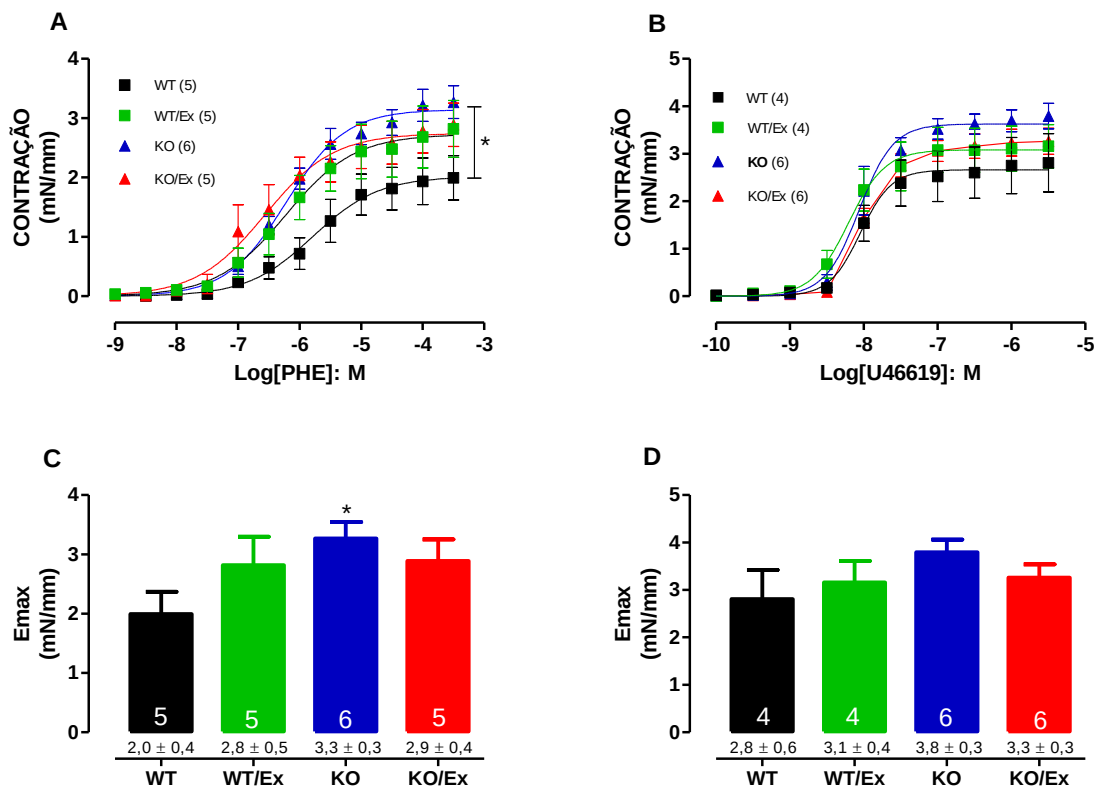


Figura 7. Curvas concentração-resposta à fenilefrina (PHE, painel A) ao análogo do tromboxano A_2 (U46619, painel B) em anéis de artéria ilíaca com endotélio intacto de camundongos dos grupos *wild type* sedentário (■ WT), *wild type* treinado (■ WT/Ex), *knockout* sedentário (▲ KO) e *knockout* treinado (▲ KO/Ex). Respostas máximas ($E_{\max}$) estão quantificadas nos gráficos (painel C e D). Dados estão expressos como média ± EPM. O n experimental está mostrado em cada coluna. *diferente de WT; para $p < 0,05$ (ANOVA two-way).

Tabela 5. Valores de potência (pEC₅₀) obtidos a partir de curvas concentração-resposta à fenilefrina (PHE) e ao análogo do tromboxano A₂ (U46619) em anéis de artéria ilíaca com endotélio intacto de camundongos dos grupos *wild type* sedentário (WT), *wild type* treinado (WT/Ex), *knockout* sedentário (KO) e *knockout* treinado (KO/Ex).

	WT	WT/Ex	KO	KO/Ex
PHE	5,71 ± 0,15 (5)	6,21 ± 0,10 (5)	6,23 ± 0,06 (6)*	6,57 ± 0,20 (5)
U46619	8,04 ± 0,03 (4)	8,19 ± 0,06 (4)	8,02 ± 0,09 (6)	7,98 ± 0,02 (6)

Dados de potência são representados como -log da concentração do agonista necessária para produzir 50% da resposta máxima. Dados estão expressos como média ± EPM. O *n* experimental está mostrado entre parêntesis. *diferente de WT; para *p*<0,05 (ANOVA *two-way*).

Diante dos achados nos experimentos de reatividade vascular, passamos a investigar os mecanismos responsáveis pela alteração da resposta relaxante e contrátil observada em artérias de animais KO e KO/Ex. A primeira via investigada foi a da produção local de NO em estado basal e após estímulo com acetilcolina. O resultado mostra uma redução de 47% na produção basal de NO e de 65% na produção estimulada por ACh em artérias de animais do grupo KO (Figura 8).

Foi avaliada também a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), realizada pela análise da fluorescência derivada da oxidação da dihidroetidina no estado basal e na presença de superóxido dismutase (SOD). Verificou-se um aumento de 48% na produção de ERO em artérias do grupo KO, que foi parcialmente prevenido pela realização de exercício físico nos animais KO/Ex. A quantificação e as imagens representativas estão mostradas na figura 9.

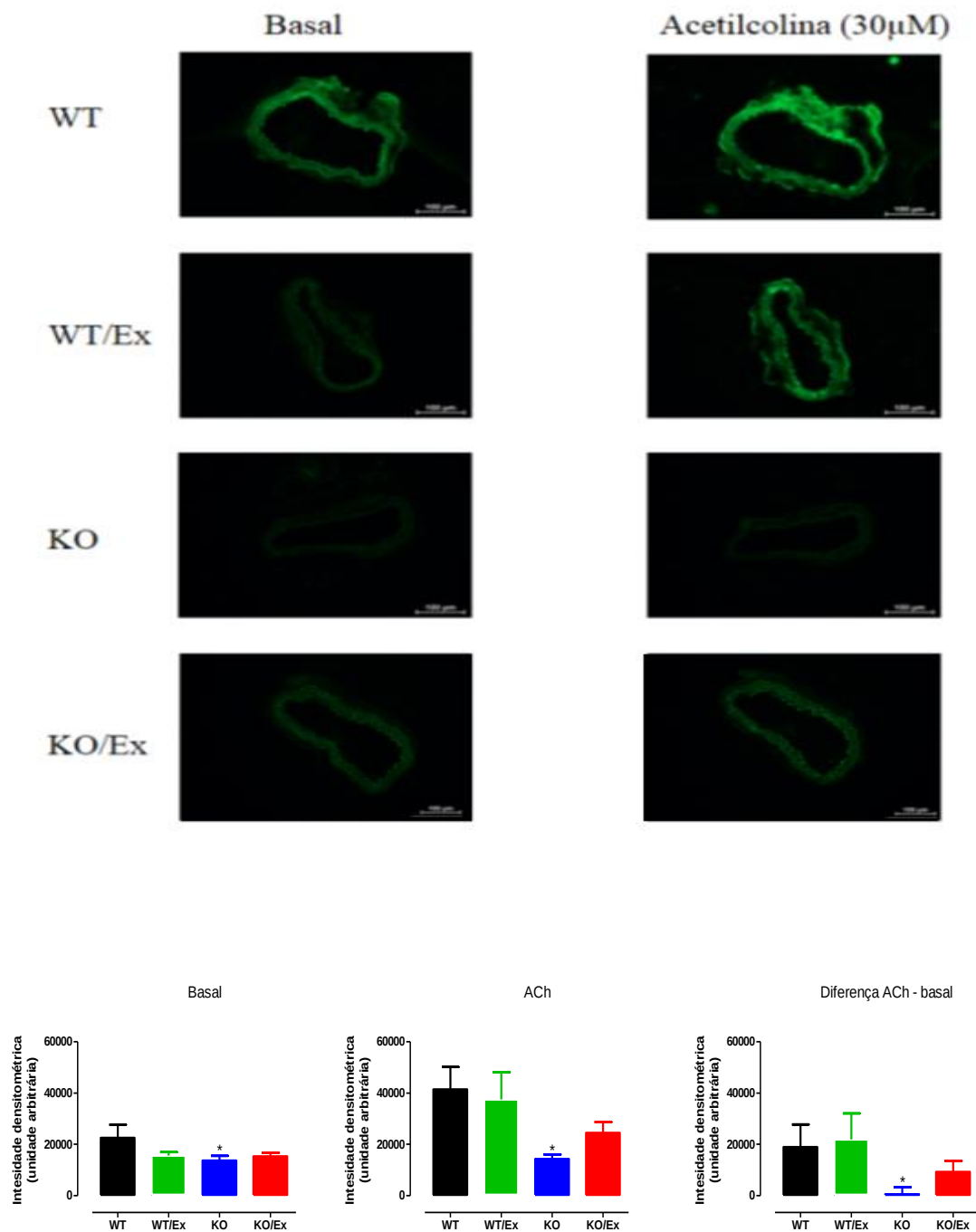


Figura 8. Representação da fluorescência ao 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2), marcador da produção de óxido nítrico em artérias de camundongos dos grupos *wild type* sedentário (WT), *wild type* treinado (WT/Ex), *knockout* sedentário (KO) e *knockout* treinado (KO/Ex). Nos painéis à esquerda está mostrada a produção no estado basal e nos painéis à direita a produção estimulada por 30μM de acetilcolina. Os gráficos de coluna mostram a quantificação da fluorescência nos estados basal, estimulado por ACh e a diferença entre os dois. Mediu-se a densidade integrada em 7 regiões aleatórias de cada corte com área fixa (camada de músculo liso) e a média desses valores foi considerada a medida final de cada amostra. Os dados estão expressos como média ± EPM para um *n* experimental de WT=9, WT/Ex=9, KO=8 e KO/Ex=7. *diferente de WT; para $p < 0,05$ (ANOVA two-way)

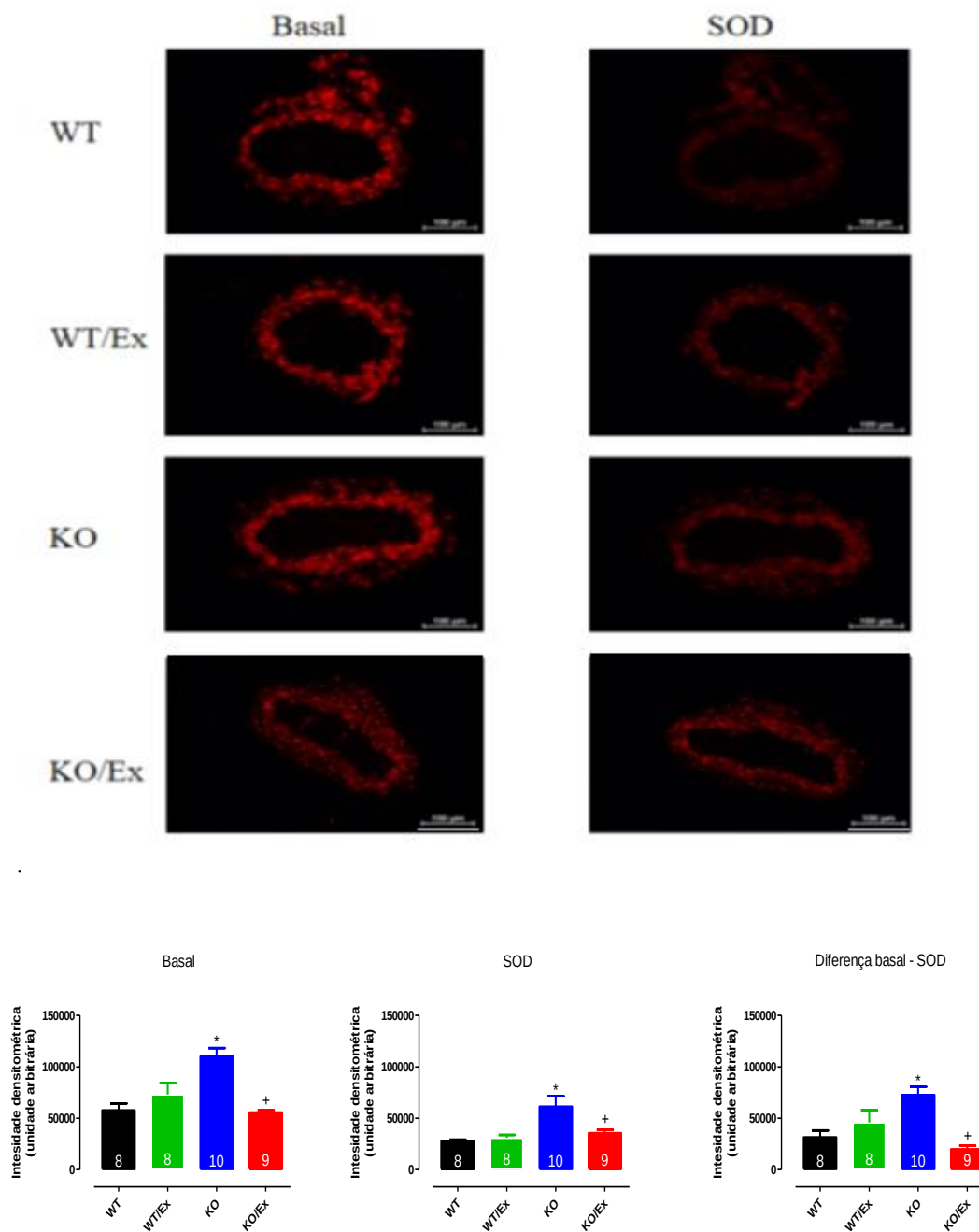


Figura 9. Representação da fluorescência induzida por dihidroetidina (DHE) para a produção de espécies reativas de oxigênio na ausência (painéis a esquerda) e na presença de agente mimético à SOD (painéis a direita) em artérias de camundongos dos grupos *wild type* sedentário (WT), *wild type* treinado (WT/Ex), *knockout* sedentário (KO) e *knockout* treinado (KO/Ex). Os gráficos de coluna mostram a quantificação da fluorescência nos estados basal, na presença de SOD e a diferença entre os dois. Mediu-se a densidade integrada em 7 regiões aleatórias de cada corte com área fixa (camada de músculo liso) e a média desses valores foi considerada a medida final de cada amostra. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM para um n experimental de WT=8, WT/Ex=7, KO=10 e KO/Ex=9. *diferente de WT; +diferente de KO, para $p < 0,05$ (ANOVA two-way).

7. DISCUSSÃO

Foi demonstrado neste estudo que camundongos LDLR^{-/-} sedentários e alimentados com dieta hiperlipídica (grupo KO), apresentaram alterações significativas nos parâmetros metabólicos, bioquímicos e vasculares. Houve um aumento do ganho de peso e da gordura epididimal, bem como um aumento das concentrações circulantes de glicose, colesterol total e triglicerídeos. A reatividade do vaso também está alterada, com redução do relaxamento dependente do endotélio, aumento da contratilidade mediada por agonista α -adrenérgico e aumento do diâmetro do vaso (remodelamento arterial para fora). Foi observada ainda menor produção de NO, concomitante à maior produção de ERO na artéria ilíaca desses animais. O exercício físico foi eficaz para prevenir o dano vascular, mantendo o relaxamento dependente do endotélio, reestabelecendo a resposta contrátil e diminuindo o diâmetro da artéria ilíaca. Esses resultados ocorreram na ausência de modificação do perfil bioquímico (glicose, triglicerídeos e colesterol total). Entretanto, animais KO exercitados apresentaram redução da produção de ERO arterial e discreto aumento na produção de NO induzido por acetilcolina.

Diferentes estudos realizados com camundongos LDLR^{-/-} e apoE^{-/-}, alimentados com dieta hiperlipídica, mostraram que esses animais apresentaram maior ganho de peso corporal e de gordura epididimal, elevadas concentrações de colesterol total e de triglicerídeos comparado à animais WT (CESAR et al., 2010; STEFANIA et al., 2012; LU et al., 2015). Resultado semelhante foi observado no presente estudo, corroborando os achados de Funke et al. (2014) que também mostraram aumento de gordura epididimal em camundongos LDLR^{-/-}, após quinze semanas sendo alimentados com dieta hiperlipídica (21% de gordura, 0,2% de colesterol) e de Niebauer et al. (1999) em que camundongos apoE^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica (21% de gordura, 0,15% de colesterol) durante 4 semanas apresentaram aumento do ganho de peso corporal e do colesterol total comparados aos animais WT.

A glicemia dos animais do grupo KO estava aumentada em 23%. Achados da literatura esclarecem que a dislipidemia pode causar problemas no metabolismo da glicose, e que este resultado estaria relacionado à ação deletéria dos ácidos graxos livres sobre a sinalização celular da insulina e/ou a função da célula β pancreática, resultando em resistência à insulina e disfunção da célula β (BRIAUD et al., 2001; CARVALHEIRA et al., 2002). Estudo de Ghosh et al (2014) confirmou este achado mostrando que animais LDLR^{-/-} alimentados com dieta ocidental desenvolvem intolerância à glicose.

Desordens metabólicas como as observadas nos animais LDLR^{-/-} podem contribuir para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, que são a principal causa de morte no mundo (OMS, 2010) e a disfunção endotelial desempenha o papel principal no desenvolvimento das complicações vasculares (MONTERO et al., 2012). Sendo assim, a manutenção da função endotelial é fundamental para o controle vasomotor, tanto em artérias de condutância como em artérias de resistência (GREEN et al., 2004). Por sua vez, a aterosclerose é uma doença inflamatória crônica associada com a disfunção endotelial que resulta no desequilíbrio da produção de agentes vasodilatadores e vasoconstritores por células endoteliais e diminuição da luz do vaso (BARTER, 1996).

O remodelamento arterial é uma das consequências do processo de aterosclerose e foi pioneiramente descrito por Glagov et al. (1987) quando observaram o remodelamento arterial para fora em artéria coronária de humanos, um mecanismo compensatório para a manutenção da luz do vaso que ocorria quando as placas de ateroma ocupavam aproximadamente 40% da área de secção transversa do vaso.

No presente estudo, o grupo KO apresentou aumento do diâmetro do vaso da artéria ilíaca quando comparado ao grupo controle (WT), demonstrando um possível remodelamento arterial para fora. Esta hipótese se apoia em achados da literatura nos quais o remodelamento arterial estaria associado ao desenvolvimento de lesão aterosclerótica em animais (macacos, porcos, camundongos apoE^{-/-}, camundongos LDLR^{-/-}), indicando um possível mecanismo de compensação devido a obstrução da luz do vaso (AIKAWA et al., 1998; VERHAMME et al., 2002; ZHAO et al., 2011). Além disso, o remodelamento arterial para fora parece ocorrer para evitar a disfunção endotelial, o que promoveria maior acúmulo de lipídeos, de macrófagos e maior vulnerabilidade para ruptura da placa (SCHOENHAGEN, 2001; VARNAVA et al., 2002; BENTZON, 2003; NISSEN, 2004).

A disfunção endotelial está fortemente relacionada com a aterosclerose e desempenha papel principal no desenvolvimento de complicações vasculares (MONTERO et al., 2012). É caracterizada por uma menor biodisponibilidade de NO, que além de potente vasodilatador, também inibe diferentes componentes do processo de aterogênese, tais como: proliferação das células musculares lisas, agregação plaquetária e adesão/infiltração dos monócitos (BUSSE; FLEMING, 1996; KOJDA; HARRISON, 1999). Sendo assim, a redução do relaxamento dependente do endotélio poderia ser um indicador de que há lesão endotelial e menor produção de

NO, o que contribuiria para o início e a progressão da aterosclerose. No presente estudo, os camundongos do grupo KO apresentaram menor relaxamento dependente do endotélio na artéria ilíaca, concomitantemente, reduzida produção de NO e aumentada produção de ERO, levando à diminuição da biodisponibilidade de NO.

As ERO tem papel importante na patogênese da aterosclerose, sendo o ânion superóxido um dos mais potentes oxidantes que desempenha função central neste processo (DHALLA et al., 2000). Foi demonstrado que camundongos *LDLR^{-/-}* e/ou *apoE^{-/-}* apresentam estresse oxidativo vascular e alterações no tamanho da placa de ateroma, enrijecimento arterial, disfunção endotelial (OZAKI et al., 2002, TEODORO et al., 2012). Outros estudos que investigaram processos de aterosclerose induzida por dieta hiperlipídica na aorta de camundongos *LDLR^{-/-}* ou *apoE^{-/-}* também demonstraram diminuição da resposta relaxante dependente do endotélio, diminuição da produção de NO e aumento na produção de ERO (BARTON et al., 1998; DECKERT et al., 1999; D'USCIO et al., 2001; CRAUWELS et al., 2003; MOMI, 2012). Além da modulação pelo estresse oxidativo, a biodisponibilidade de NO também é afetada por desequilíbrio na concentração de cofatores para a produção deste agente relaxante. Jiang et al. (2000) demonstraram que a administração combinada de L-arginina e de tetra-hidrobipterina (BH_4), cofatores para a produção de NO, foi eficaz para reestabelecer o relaxamento dependente do endotélio na aorta torácica de camundongos *LDLR^{-/-}*.

A menor produção de NO na artéria ilíaca dos animais KO também pode estar diretamente relacionada à maior concentração de glicose e de lipídios circulantes, uma vez que além de apresentarem deleção do gene *LDLR* ainda foram alimentados com dieta hiperlipídica. Foi demonstrado que a ingestão de alta quantidade de açúcares e de lipídios culmina em elevada produção de ERO no endotélio vascular, que oxida o cofator BH_4 e o transforma em produtos biologicamente inativos. Assim, a estabilização dos dímeros ativos que constituem a enzima eNOS é perdida (WERNER et al., 1998; FÖRSTERMANN; MÜNZEL, 2006) e esta passa a produzir ânion superóxido em detrimento da produção de NO (FORTUÑO et al., 2005).

Com relação à resposta contrátil, foi demonstrado em macacos (HEISTAD et al. 1984) e em coelhos (MACLEAN et al. 1993) alimentados com dieta hiperlipídica, além de camundongos *apoE^{-/-}* alimentados com dieta padrão (FRANSEN et al., 2008; MORI-KAWABE et al., 2009) um aumento da resposta contrátil ao agonista α -adrenérgico fenilefrina, resultado observado também no presente estudo. Alterações na resposta contrátil podem ocorrer por aumento na produção de

ERO (SILVA, 2013), diminuição da produção de NO endotelial (CASINO et al. 1993; HIRATA et al., 1995) ou por alterações no perfil lipídico que poderiam levar a oxidação das LDL (PARK; PARK 2015) caracterizando o marco inicial do processo aterogênico (SCHMIDT et al., 1992).

A contribuição do NO para a redução da contratilidade do vaso foi mostrada por Fransen et al. (2008). Utilizando camundongos apoE^{-/-} alimentados com dieta padrão estes autores demonstraram que os animais apresentavam maior resposta à fenilefrina quando comparados aos animais WT e a remoção do endotélio ou a adição de inibidor da eNOS fizeram desaparecer esta diferença.

Interessante notar que a resposta constritora ao análogo do tromboxano A₂ não foi estatisticamente diferente entre animais WT e KO. Não foram encontrados estudos com animais LDLR^{-/-} que avaliaram a resposta constritora ao agente em questão. Aortas de camundongos apoE^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram resposta máxima ao U46619 semelhante à dos animais WT (MAGUIRE et al., 2005). A possível explicação para a diferença de resposta constritora entre os agentes utilizados no presente estudo (fenilefrina e U46619) pode estar na adaptação dos receptores α -adrenérgicos. Evangelho et al. (2011) demonstraram que a hipercolesterolemia induz, de maneira diretamente proporcional, aumento da modulação simpática vascular e redução da sensibilidade baroreflexa em camundongos LDLR^{-/-}. O possível mecanismo que levaria a estas modificações seria a menor distensibilidade vascular provocada pelo aumento da concentração de lipídios circulantes em camundongos LDLR^{-/-} (CAMPOS et al., 2008).

Estudo em humanos mostrou que a infusão de lipídios, provocou redução da distensibilidade arterial e aumento do limiar para ativação dos baroreceptores. Os autores atribuíram estes achados à maior atividade simpática (sem modificação do tônus vagal) e a possível alteração eletrofisiológica com aumento da atividade da bomba de sódio, o que aumentaria o limiar de pressão necessário para ativação dos baroreceptores (GADEGBE KU et al., 2002).

O protocolo de oito semanas de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada foi eficiente para prevenir parte das desordens metabólicas apresentadas pelos animais KO. Mais especificamente, os animais KO/Ex apresentaram menor ganho de peso e depósito de gordura epididimal comparado ao seu respectivo par sedentário. Tais resultados corroboram com estudos prévios realizados com camundongos LDLR^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica que realizaram corrida voluntária por 12 ou por 20 semanas e apresentaram menor ganho de peso e de gordura

epididimal, sem alteração no colesterol total e nos triglicerídeos (MEISSNER et al., 2011; LANGBEIN et al., 2015).

Assim como nos estudos anteriormente citados que utilizaram corrida voluntária, nenhuma modificação foi observada no colesterol total e nos triglicerídeos de animais KO/Ex do presente estudo. Resultado semelhante foi observado quando camundongos fêmeas LDLR^{-/-} alimentadas com dieta hiperlipídica realizaram exercício intenso (85% da capacidade máxima, corrida a 22 m/min, com 8° graus de inclinação) realizado por 4 semanas (2 vezes/ dia, 30 min/sessão, 5 dias/semana) falhou em modificar o colesterol total (NIEBAUER et al., 2003).

Mesmo na ausência de modificação do perfil lipídico, o exercício físico tem se mostrado eficaz para prevenir lesão aterosclerótica em modelo animal. No estudo de Ramachandran et al. (2005) em que camundongos LDLR^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica foram submetidos a corrida na esteira (15 m/min, 30 min/dia, por 12 semanas) e apresentaram lesão aterosclerótica na aorta 50% menor do que o grupo não exercitado, mesmo sem alteração no colesterol total. Este resultado foi atribuído à maior atividade da catalase e da óxido nítrico sintase observada em animais treinados. Camundongos apoE^{-/-} alimentados com dieta padrão que realizaram corrida em esteira de intensidade moderada (15 m/min, 4 x 15 min com 2 min de intervalo entre eles, por 24 semanas) não apresentaram modificação na concentração de colesterol total quando comparado ao seu par sedentário, no entanto, o grupo exercitado teve atenuada a formação de placa de ateroma na carótida, sugerindo que o exercício físico pode modular o remodelamento vascular, independente de alterações no perfil lipídico (PYNN et al., 2004). Mesmo um protocolo de corrida voluntária durante 10 semanas foi eficaz em atenuar a formação de placa de ateroma e preservar a função endotelial de camundongos apoE^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica (FUKAO et al. 2010).

Estudo utilizando camundongos diabéticos *db/db* alimentados com dieta padrão e submetidos a corrida na esteira (intensidade correspondente a 50% do VO_{2max}, 60 min/dia, 5 dias/semana, durante 10 semanas) não mostrou modificação na glicemia e no colesterol total, quando comparados ao seu par sedentário. Entretanto, o protocolo de exercício físico foi eficaz em restaurar o relaxamento dependente do endotélio da artéria coronária, devido ao aumento da biodisponibilidade de NO, assim como a redução da inflamação e aumento da atividade da SOD (LEE et al., 2011).

O mecanismo pelo qual o exercício físico exerce influência sobre a morfofuncionalidade do vaso está relacionado à elevação da força de estiramento nas paredes das artérias (*shear stress*), o que estimula mecanossensores presentes nas células endoteliais. A capacidade das células endoteliais de perceber e responder às mudanças no fluxo sanguíneo é um fator essencial na regulação do tônus vascular e, em longo prazo, promove o remodelamento da parede arterial através da ativação de fatores de crescimento celular (GREEN et al. 2004, JOYNER; GREEN, 2009).

O aumento do diâmetro da artéria observado em animais do grupo KO foi considerado como um ajuste compensatório para manutenção da luz do vaso como descrito na literatura (GLAGOV et al., 1987; NOGUEIRA, 2005). Os animais do grupo KO/Ex não apresentaram este padrão, mostrando que o exercício físico pode realmente ter amenizado a formação de placa de atheroma nestes animais. Os mecanismos desta resposta envolvem ações que aumentam a biodisponibilidade de NO em consequência do *shear stress* (CLARKSON et al., 1999; BALLINGER et al., 2002; MCALLISTER; LAUGHLIN, 2006).

Além da manutenção no diâmetro da artéria ilíaca, os animais do grupo KO/Ex apresentaram relaxamento induzido por acetilcolina (dependente do endotélio) e resposta contrátil à fenilefrina semelhante às apresentadas por animais dos grupos WT e WT/Ex. O provável mecanismo envolvido nestas repostas estaria relacionado à preservação parcial da produção de NO e, principalmente, a sua ação antioxidante no tecido vascular consequentemente diminuindo a produção de ERO dos animais do grupo KO/Ex. Diante destes resultados, podemos inferir que o treinamento físico proporcionou um aumento na biodisponibilidade do NO.

Uma das vias para o aumento da biodisponibilidade do NO é o aumento da sua produção, por aumento da expressão e/ou da atividade da eNOS observada em artérias de animais que realizaram exercício físico. Estes resultados encontrados foram no estudo de Meilhac et al. (2001) em que camundongos LDLR^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica realizaram exercício contínuo de corrida na esteira (15m/min, 30 min/dia, 5 dias/semana por 12 semanas) e no estudo de Matsumoto et al. (2010) em que camundongos LDLR^{-/-} alimentados com dieta hipercolesterolêmica realizaram exercício intervalado de corrida na esteira (5° de inclinação, 15 m/min, 4 x 15 min com 2 min de intervalo entre eles, 5 dias/semana por 16 semanas).

Outro aspecto importante relacionado ao aumento da biodisponibilidade do NO é o aprimoramento do aparato antioxidante observado em indivíduos treinados. Esta é uma resposta

adaptativa à maior formação de ERO que ocorre durante o exercício físico em função da maior demanda de energia proveniente das mitocôndrias. Por outro lado, o sistema é hábil em promover mecanismos de adaptação, como o aumento da expressão ou atividade de agentes antioxidantes, capazes de prevenir ou minimizar dano oxidativo causado pela ação de tais agentes (BARBOSA et al., 2010). Esta adaptação tem especial importância para a manutenção da biodisponibilidade de NO, pois, o ânion superóxido formado no tecido vascular reage com o NO formando peroxinitrito (ONOO^-) que não apresenta potencial vasodilatador, mas as características de ação como as do radical hidroxila. Ainda, o ONOO^- pode induzir remodelamento arterial e disfunção endotelial por dano celular (FORTUÑO et al., 2005).

Os resultados do presente estudo estão em consonância com achados da literatura que realizaram protocolos experimentais com camundongos $\text{LDLR}^{-/-}$ submetidos ao treinamento físico e mostraram aprimoramento do aparato antioxidante e/ou menor produção de espécies reativas de oxigênio. Estudo realizado por Napoli et al. (2006) com camundongos $\text{LDLR}^{-/-}$ alimentados com dieta hiperlipídica e submetidos ao exercício físico (natação, por 2 a 4 meses) mostrou aumento da expressão de eNOS na aorta, além do aumento da atividade da superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase. Ramachandran et al. (2005) utilizando a mesma linhagem de animais e exercício físico (corrida, 15m/min, 30 min/dia, 5 dias/semana por 12 semanas) observaram aumento da expressão da SOD e aumento da biodisponibilidade de NO. Aumento da expressão da eNOS, da catalase e da glutatona peroxidase também foi observado em aorta de camundongos $\text{LDLR}^{-/-}$ submetidos ao exercício físico aeróbico (corrida, 15m/min, 30 min/dia, 5 dias/semana por 12 semanas) (MEILHAC et al., 2001).

Em estudos com camundongos $\text{apoE}^{-/-}$ o exercício físico aeróbico de moderada intensidade aumentou a expressão vascular de enzimas antioxidantes como a SOD, CAT e GPx e reduziu a expressão e a atividade da NADPH oxidase e da xantina oxidase (DURRANT et al., 2009; YANG, 2009). O sistema antioxidante é importante na prevenção da aterosclerose, uma vez que este processo pode ser iniciado e agravado pela entrada, no endotélio, de lipoproteínas modificadas por espécies reativas (TEODORO et al. 2010). Além disso, camundongos $\text{apoE}^{-/-}$ manipulados para superexpressão de glutatona peroxidase diminuíram a evolução da aterosclerose, sendo essa redução justificada pela menor peroxidação lipídica na parede arterial e diminuição da expressão das proteínas das moléculas de adesão VCAM e ICAM na aorta desses animais (GUO et al., 2008).

Dessa forma, adaptações vasculares em resposta ao exercício físico reduzem as ERO e, conseqüentemente, aumentam a biodisponibilidade de NO, melhorando a função endotelial (DURRANT et al., 2009; LESNIEWKI et al., 2011). Outros estudos em que animais LDLR^{-/-} e apoE^{-/-} foram alimentados com dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico de moderada intensidade também verificaram os efeitos benéficos do exercício sobre a função endotelial, não associados à reversão da dislipidemia exibida por estes animais (MATSUMOTO et al., 2010; NIEBAUER et al., 2003), assim como encontrado no presente estudo.

Com relação a resposta contrátil induzida pela fenilefrina, que estava aumentada em animais do grupo KO, observou-se que o exercício físico pode ter modulado para baixo a sensibilidade dos receptores α -adrenérgicos, uma vez que a resposta à este agente em animais KO/Ex não foi diferente da verificada em animais dos grupos WT e WT/Ex. Provavelmente a manutenção da função endotelial nestes animais tem participação nesta resposta.

Além disso, em resposta ao exercício físico crônico há redução da atividade simpática e aumento da sensibilidade baroreflexa, ajustes que ocorreriam via redução das ERO (CAMPOS et al., 2008). O estudo de Heeren et al. (2009) mostrou aumento da pressão arterial e redução da sensibilidade baroreflexa em camundongos LDLR^{-/-} sedentários, o que não foi observado no grupo treinado que realizou corrida na esteira em intensidade leve-moderada (50-70% da velocidade máxima, 60min/dia, 5 dias/semana, por 4 semanas). Assim, a alteração na sensibilidade dos receptores α -adrenérgicos observada em animais KO poderia ser reflexo de uma hiperatividade simpática que foi prevenida pelo exercício físico em animais KO/Ex.

8. CONCLUSÃO

O protocolo de exercício físico utilizado neste estudo, preveniu a disfunção endotelial na artéria ilíaca de camundongos LDLR^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica. Este achado está relacionado à menor produção de espécies reativas de oxigênio, o que poderia aumentar a produção de NO, uma vez que não foi observada modificação no perfil lipídico dos animais treinados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIKAWA, M; RABKIN, E; OKADA, Y; VOGLIC, S.J; CLINTON, S.K; BRINCKERHOFF, C.E; SUKHOVA, G.K et al. Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma: a potential mechanism of lesion stabilization. **Circulation**, v. 97, p. 2433–2444, 1998.

ALONSO, R; MATA, P; DE ANDRES, R; VILLACASTIN, B.P; MARTINEZ-GONZALEZ, J; BADIMON, L. Sustained long-term improvement of arterial endothelial function in heterozygous familial hypercholesterolemia patients treated with simvastatin. **Atherosclerosis**, v 157, p. 423–9, 2001.

ANTONIADES, C; SHIRODARIA, C; CRABTREE, M, RINZE R; ALP, N; CUNNINGTON, C; DIESCH, J; TOUSOULIS, D et al. Altered Plasma Versus Vascular Biopterins in Human Atherosclerosis Reveal Relationships Between Endothelial Nitric Oxide Synthase Coupling, Endothelial Function, and Inflammation. **Circulation**, v. 116, p. 2851-2859, 2007.

BAHIA, L; KRAEMER, L.G.A; VILLELA, N.R; BOTTINO, D; BOUSKELA, E. Endotélio e aterosclerose. **Revista da SOCERJ**, v. 17, n. 1, 2004.

BAHIA, L; KRAEMER, L.G.A; VILLELA, N.R; RIBEIRO, N; BOTTINO, D; BOUSKELA, E. O Endotélio na Síndrome Metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, n. 2, 2006.

BALLINGER, S.W; PATTERSON, C; KNIGHT-LOZANO, C.A; BUROW, D.L; CONKLIN, C.A; HU, Z; REUF, J et al. Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. **Circulation**, v. 106, p. 544–549, 2002.

BARBOSA, K.B.F; COSTA, N.M.B; ALFENAS, DE CÁSSIA, R.G; DE PAULA, S.O; MININ, V.P.R; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARTER, P.J; RYE, K.A. High density lipoproteins and coronary heart disease. **Atherosclerosis**, v. 121, n. 1, p. 1-12, 1996.

BARTON, M;HAUDENSCHILD, C.C;D'USCIO, L.V;SHAW, S; MÜNTER, K;LÜSCHER, T.F. Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 14367–14372, 1998.

BENTZON, J.F; PASTERKAMP, G; FALK, E. Expansive remodeling is a response of the plaque-related vessel wall in aortic roots of apoE-deficient mice: an experiment of nature. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 23, p. 257–262, 2003.

BRANDÃO, DE FREITAS, A; MARLI CARDOSO MARTINS PINGE, M.C.M. Alteração do óxido nítrico na função cardiovascular pelo treinamento físico. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 28, n. 1, p. 53-68, 2007.

BRIAUD, I; HARMON, J.S; KELPE, C.L; SEGU, V.B; POITOUT, V. Lipotoxicity of the pancreatic beta-cell is associated with glucose-dependent esterification of fatty acids into neutral lipids. **Diabetes**, v. 50, p. 315–321, 2001.

BROOKS, G.A; WHITE, T.P. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. **Journal of Applied Physiology Respiratory Environmental and Exercise Physiology**, v. 45, n. 6, p. 1009-15, 1978.

BROWN, M.S; GOLDSTEIN, J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, v. 232, n. 4746, p. 34-47, 1986.

BUSSE, R; FLEMING, I. Endothelium dysfunction in atherosclerosis. **Journal of Vascular Research**, v. 33, p. 181–189, 1996.

CAMPOS, C; BERTAGNOLLI, M; EVANGELHO, J; TUSSET, C; BELLÓ-KLEIN, A; IRIGOYEN, M.C; RIGATTO, K. Baroreflex sensitivity and oxidative stress in the LDL receptor knockout mice. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 60, n. 4-5, p. 329-35, 2008.

CAMPOS, W; NETO, A.S; BOZZA, R. et al. Atividade física, consumo de lipídios e fatores de risco para aterosclerose em adolescentes. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, p. 601-7, 2010.

CARVALHEIRA, J.B.C; ZECCHIN, H.G; SAAD, M.J.A. Vias de sinalização da insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419-425, 2002.

CASINO, P.R; KILCOYNE, C.M; QUYYMI, A.A; HOEG, J.M; PANZA, J.A. The role of nitric oxide in endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic patients. **Circulation**, v. 88, p. 2541-2547, 1993.

CESAR, L; SUAREZ, S.V; ADI, J; NIKHIL ADI; VAZQUEZ-PADRON, R; HONG YU, QI MA et al. An Essential Role for Diet in Exercise-Mediated Protection against Dyslipidemia, Inflammation and Atherosclerosis in ApoE^{-/-} Mice. **PLoS One**, v. 6, p. 17263, 2010.

CHI, Y.W; JAFF, M.R. Optimal risk factor modification and medical management of the patient with peripheral arterial disease. **Catheterization and Cardiovascular Interventions**, v. 71, p. 475-89, 2008.

CLARKSON, P; MONTGOMERY, H.E; MULLEN, M.J; DONALD, A.E; POWE, A.J; BULL, T; JUBB, M; WORLD, M; et al. Exercise training enhances endothelial function in young men. **Journal of American College of Cardiology**, v. 33, p. 1379–1385, 1999.

COHEN, R. A; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization: beyond nitric oxide and cyclic GMP. **Circulation**, v. 92, p. 3337-3349, 1995.

CRAUWELS, H.M; VAN HOVE, C.E; HOLVOET, P. et al. Plaque-associated endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice on a regular diet. Effect of human apolipoprotein AI. **Cardiovascular Research**, v. 59, p. 189–99, 2003.

CZARKOWSKA-PACZEK, B; ZENDZIAN-PIOTROWSKA, M; BARTLOMIEJCZYK, I; PRZYBYLSKI, J; GORSKI, J. The effect of acute and prolonged endurance on transforming cgrwth factor- β generation in rat skeletal and heart muscle. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 6, p. 157-62, 2009.

D'USCIO, L.V; BAKER, T.A; MANTILLA, C.B; SMITH, L; WEILER, D; SIECK, G.C; KATUSIC, Z.S. Mechanism of endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 21, p. 1017–1022, 2001.

DECKERT, V; LIZARD, G; DUVERGER, N. et al. Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by high-fat feeding in apo-E-deficient mice. Toward normalization by human apoA-I expression. **Circulation**, v. 100, p. 1230 – 1235, 1999.

DELBIN, M.A; DAVEL, A.P; COUTO, G.K. et al. Interaction between advanced glycation and products formation and vascular responses in femoral and coronary arteries from exercise rats. **PLoS One**, v.7, 2012.

DHALLA, N.S; TEMSAH, R.M; NETTICADAN, T. Role of oxidant stress in cardiovascular diseases. **Journal of Hypertension**, v. 18, p. 655–673, 2000.

DURAZZO, A.E; SITRÂNGULO, C.D; PRESTI, C; DA SILVA, E.S; DE LUCCIA, N. Doença arterial obstrutiva periférica: que atenção temos dispensado à abordagem clínica dos pacientes? **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 4, p. 255-64, 2005.

DURRANT, J.R; SEALS, D.R; CONNELL, M.L; RUSSELL, M.J; LAWSON, B.R; FOLIAN, B.J; DONATO, A.J; LESNIEWSKI, L.A. Voluntary wheel running restores endothelial function in conduit arteries of old mice: direct evidence for reduced oxidative stress, increased superoxide dismutase activity and downregulation of NADPH oxidase. **Journal of Physiology**, v. 587, p. 3271-3285, 2009.

EVANGELHO, J.S; CASALI, K.R; CAMPOS, C; DE ANGELIS, K; VEIGA, A.B.G; RIGATTO, K. Hypercholesterolemia magnitude increases sympathetic modulation and coagulation in LDLr knockout mice. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 159, p. 98–103, 2011.

FERNANDES, S.A.T; NATALI, A.J; DA MATTA, S.L.P, TEODORO, B.G; CALDONCELLI, F.S; LATERZA, MC; PELUZIO, M.C.G. Efeito da dieta hiperlipídica e do treinamento aeróbico na aterosclerose em camundongos apo-E^{-/-}. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 19, n. 6, 2013.

FERREIRA, A.L.A; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-8, 1997.

FERREIRA, JC; BACURAU, A.V; BUENO, C.R JR; CUNHA, T.C, TANAKA, L.Y; JARDIM, M.A; RAMIRES, P.R; BRUM, P.C. Aerobic exercise training improves Ca²⁺ handling and redox status of skeletal muscle in mice. **Experimental Biology and Medicine**, v. 235, n. 4, p. 497-505, 2010.

FÖRSTERMANN, U; MÜNZEL, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. **Circulation**, v. 113, n. 13, p. 1708-14, 2006.

FORTUÑO, A; GORKA, S.J; MORENO, M.U. et al. Oxidative stress and vascular remodeling. **Experimental Physiology**, v. 90, n. 4, p. 457–462, 2005.

FRANSEN, P; ASSCHE, T.V; PIETER-JAN GUNS, P.J; VAN HOVE, C.E; DE KEULENAER, G.W; HERMAN, A.G; BULT, H. Endothelial function in aorta segments of apolipoprotein E-deficient mice before development of atherosclerotic lesions. **European Journal of Physiology**, v. 455, p. 811–818, 2008.

FUKAI, T; SIEGFRIED, M.R; USHIO-FUKAI, M. et al. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. **Journal Clinical Investigation**, v. 105, p. 1631–9, 2000.

FUKAO, K; SHIMADA, K; NAITO, H; SUMIYOSHI, K; INOUE, N; IESAKI, T; KUME, A et al., Voluntary exercise ameliorates the progression of atherosclerotic lesion formation via anti-inflammatory effects in apolipoprotein E-deficient mice. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 17, p. 1226-1236, 2010.

FUNKE, A; SCHREURS, M; APARICIO-VERGANA, M; SHEEDFAR F; GRUBEN N, KLOOSTERHUIS, N. J; SHIRI-SVERDLOV, R et al. Cholesterol-induced hepatic inflammation does not contribute to the development of insulin resistance in male LDL receptor knockout mice. **Atherosclerosis**, v. 232, p. 390-396, 2014.

FURCHGOTT, R.F; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 27, p. 288, n. 5789, p. 373-6, 1980.

GADEGBEKU, C.A; DHANDAYUTHAPANI, A; SADLER, Z.E; EGAN, B.M. Raising lipids acutely reduces baroreflex sensitivity. **American Journal of Hypertension**, v. 15, p. 479-485, 2002.

GARCIA, L.A. Epidemiology and pathophysiology of lower extremity peripheral arterial disease. **Journal of Endovascular Therapy**, v. 13, n. 2, p. 3-9, 2006.

GARCIA-REDONDO, A.B; BRIONES, A.M; BELTRÁN, A.E; ALONSO, M.J; SIMONSEN, U; SALAICES, M. Hypertension increase contractile responses to hydrogen peroxide in resistance arteries through increased thromboxano A₂, Ca²⁺ and superoxide anion levels. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 328, p. 19-27, 2009.

GIMBRONE, J.R, M.A; GARCIA-CARDEÑA, G. Vascular endothelium, hemodynamics and the pathobiology of atherosclerosis. **Cardiovascular Pathology**, v, 22, p. 9–15, 2013.

GHOSH, S.S; BIE, J; WANG, J; GHOSH, S. Oral supplementation with non-absorbable antibiotics or curcumin attenuates western diet-induced atherosclerosis and glucose intolerance in LDLR^{-/-} mice - role of intestinal permeability and macrophage activation. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e:108577, 2014.

GLAGOV, S; WEISENBERG, E; ZARINS, C.K; STANKUNAVICIUS, R; KOLETTIS, G.J. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. **New England Journal of Medicine**, v. 316, n. 22, p. 1371-5, 1987.

GREEN, D.J; MAIORANA, A; O'DRISCOLL, G; TAYLOR, R. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. **Journal of Physiology**, v. 56, p. 1-25, 2004.

GUEDES, D.P; GUEDES, J.E.R.P; BARBOSA, D.S, DE OLIVEIRA, J.A; STANGANELLI, L.C.R. Fatores de risco cardiovasculares em adolescentes: indicadores biológicos e comportamentais. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 86, p. 439-5, 2006.

GUO, Z; RAN, Q; ROBERTS, L.J; LICHUN ZHOU; ARLAN RICHARDSON; CHAKRADHARI, SHARAN; DONGFAN WU; HONG YANG. Suppression of Atherogenesis by. Overexpression of Glutathione Peroxidase-4 in Apolipoprotein E-Deficient Mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, p. 343-52, 2008.

GUZZETTI S, COGLIATI C, TURIEL M; CREMA C; LOMBARDI, F; MALLIANI, A. Sympathetic predominance followed by functional denervation in the progression of chronic heart failure. **European Heart Journal**, v. 16, p.1100–7, 1995.

HEEREN, M.V; DE SOUSA, L.E; MOSTARDA, C; MOREIRA, E; MACHERT, H; RIGATTO, K.V; WICHI, R.B et al. Exercise improves cardiovascular control in a model of dislipidemia and menopause. **Maturitas**, v. 62, p. 200-4, 2009.

HEISTAD, D.D; ARMSTRONG, M.L; MARCUS, M.L; PIEGORS, D.J; MARK, A.L. Augmented responses to vasoconstrictor stimuli in hypercholesterolemic and atherosclerotic monkeys. **Circulation Research**, v. 54, p. 711–718, 1984.

HERNANZ, R; BRIONES, A.M; ALONSO, M.J; VILA, E; SALAICES, M. Hypertension alters role of iNOS, COX-2, and oxidative stress in bradykinin relaxation impairment after LPS in rat cerebral arteries. **American Journal of Physiology Heart and Circulation Physiology**, v. 287, p. 225-234, 2004.

HIGASHI, Y; YOSHIZUMI, M. Exercise and endothelial function: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 102, p. 87-96, 2004.

HIRATA, K; MIKI, N; KURODA, Y; SAKODA, T; KAWASHIMA, S; YOKOYAMA M. Low concentration of oxidized low-density lipoprotein and lysophosphatidylcholine upregulate constitutive nitric oxide synthase mRNA expression in bovine aortic endothelial cells. **Circulation Research**, v. 76, p. 958-962, 1995.

INEU, M.L; MANENTI, E; COSTA, J.L.V; MORIGUCHI, E. Manejo da HDL: avanços recentes e perspectivas além da redução de LDL. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, n. 6, p. 788-794, 2006.

IN VIVO COMMUNICATIONS INC, 2011. Disponível em: <http://www.21stcentech.com/biomedicine-part-3-medical-simulation-at-the-beginning-of-the-21st-century/>. Acesso em 8 out. 2015.

ISHIBASHI, S; BROWN, M.S; GOLDSTEIN, J.L; GERARD, R.D; HAMMER, R.E; HERZ, J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. **Journal of Clinical Investigation**, v. 92, p. 883–893, 1993

ISHIBASHI, S; HERZ, J; MAEDA, N; GOLDSTEIN, J.L; BROWN, M.S. The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in “knockout” mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**, v. 91, p. 4431–4435, 1994.

JIANG, J; VALEN, G; TOKUNO, S; THORÉN P; PERNOW, J. Endothelial dysfunction in atherosclerotic mice: improved relaxation by combined supplementation with l-arginine-tetrahydrobiopterin and enhanced vasoconstriction by endothelin. **British Journal of Pharmacology**, 131, 1255 – 1261, 2000.

JORGE, P.A; OSAKI, M.R; DE ALMEIDA, E; CREDIDIO NETO, L; METZE, K. Effects of vitamin E on endothelium-dependent coronary flow in hypercholesterolemic dogs. **Atherosclerosis**, v. 126, p. 43–51, 1996.

JOYNER, M.I; GREEN, D. J. Exercise protects the cardiovascular system: effects beyond traditional risk factors. **Journal of Physiology**, v. 587, n. 23, p. 5551–5558, 2009.

KINGWELL, B.A. Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease. **FASEB Journal**, v. 14, p. 1685-96, 2000.

KLEINBONGARD, P; DEJAM, A; LAUER, T; JAX T; KERBER S; GHARINI, P; BALZER, J et al. Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 40, n. 2, p. 295-302, 2006.

KOJDA, G; HARRISON, D. Interaction between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. **Cardiovascular Research**, v. 43, p. 562–571, 1999.

KOJDA, G; HAMBRECHT, R. Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? **Cardiovascular Research**, v. 67, n. 2, p.187-97, 2005.

KROON, A.A; AENGEVAEREN, W.R; VAN DER WERF, T; UIJEN, G.J; REIBER, J.H; BRUSCHKE, A.V. et al. LDL-Apheresis Atherosclerosis Regression Study (LAARS). Effect of aggressive versus conventional lipid lowering treatment on coronary atherosclerosis. **Circulation**, v. 93, p.1826–35, 1996.

LANGBEIN, H; HOFMANN, A; BRUNSEN, C; GOETTSCHE, W; MORAWIETZ, H. Impact of high-fat diet and voluntary running on body weight and endothelial function in LDL receptor knockout mice. **Atherosclerosis Supplements**, v. 18, p. 59 - 66, 2015.

LANGILLE, B.L. Arterial remodeling relation to hemodynamics. **Canadian Journal Physiology Pharmacology**, v. 74, p. 834-841, 1996.

LEE, S; PARK, Y; ZHANG, C. Exercise Training Prevents Coronary Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetic Mice. **American Journal of Biomedical Sciences**, v. 3, n. 4, p. 241–252, 2011.

LESNIEWKI, L.A; DURRANT, J.R; CONNELL, M.L; HENSON, G.D; BLACK, A.D; DONATO, A.J; SEALS, D.R. Aerobic exercise reverses arterial inflammation with aging in mice. **American Journal of Physiology Heart Circulation Physiology**, v. 30, n. 1, p. 7-10, 2011.

LOTTENBERG, A.M.P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.53, n. 5, 2009.

LU, Z; ZHANG, X; LI, Y; LOPES-VIRELLA, M.F; HUANG, Y. TLR4 antagonist attenuates atherogenesis in LDL receptor-deficient mice with diet-induced type 2 diabetes. **Immunobiology**, v. 220, n. 11, p. 1246-54, 2015.

MACLEAN, M.R; MC CULLOCH, K.M; MC GRATH, J.C. Influences of the endothelium and hypoxia on α_1 e α_2 – adrenoceptor – mediated responses in the rabbit isolated pulmonary artery. **British Journal of Pharmacology**, v. 108, p. 155-161, 1993.

MADAMANCHI, N.R; HAKIM, Z.S; RUNGE, M.S. Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 2, p. 254–267, 2005.

MAGUIRE, J.J; WILEY, K.E; KUC, R.E; STONEMAN, V.E.A; BENNETT, M.R; DAVENPOR, A.P. Endothelin-mediated vasoconstriction in early atherosclerosis is markedly

increased in apoe $\neg$ mouse but prevented by atorvastatin. **Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 231, n. 6, p. 806-12, 2005.

MAGWENZI, S; WOODWARD, C; WRAITH, K.S; ABURIMA, A; RASLAN Z; JONES, H; MCNEIL, C. et al. Oxidized LDL activates blood platelets through CD36/NOX2-mediated inhibition of the cGMP/protein kinase G signaling cascade. **Blood**, v. 125, n. 17, p. 2693-2703, 2015.

MARAIS, A.D. Familial Hypercholesterolaemia. **Clinical Biochemistry Reviews**, v.25, p. 49-68, 2004.

MATSUMOTO, Y; ADAMS, V; JACOB, S; MANGNER, N; SCHULER, G; LINKE, A. Regular exercise training prevents aortic valve disease in low-density lipoprotein-receptor-deficient mice. **Circulation**, v. 121, n. 6, p. 759-67, 2010.

MATSUZAWA, Y; LERMAN, A. Endothelial dysfunction and coronary artery disease: assessment, prognosis, and treatment. **Coronary Artery Disease**, v. 25, p. 713-24, 2014.

MCALLISTER, R.M; LAUGHLIN, M.H. Vascular nitric oxide: effects of physical activity, importance for health. **Essays in Biochemistry**, v. 42, 119–131, 2006.

MCARDLE, W.D; KATCH, F.L; KATCH, V.L. **Fisiologia do Exercício Energia, Nutrição e Desempenho Humano**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 7º ed, 2011.

MEILHAC, O; RAMACHANDRAN, S; CHIANG, K; SANTANAM, N; PARTHASARATHY, S. Role of arterial wall antioxidant defense in beneficial effects of exercise on atherosclerosis in mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 21, p. 1681-8, 2001.

MEISSNER, M; LOMBARDO, E; HAVINGA, R; TIETGE U.J; KUIPERS F; GROEN, A.K. Voluntary wheel running increases bile acid as well as cholesterol excretion and decreases atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. **Atherosclerosis**, v. 218, p. 323-329, 2011.

MILLER, J.D; CHU, Y; CASTANEDA, L.E; SERRANO, K.M; BROOKS, R.M; HEISTAD, D.D. Vascular function during prolonged progression and regression of atherosclerosis in mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 33, n.3, p.459-65, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis no Brasil 2011-2012**. Brasília, 2012.

MOMBOULI, J.V; VANHOUTTE, P.M. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 31, p. 61-74, 1999.

MOMI, S; MONOPOLI, A; ALBERTI, P.F; FALCINELLI, E; CORAZZI, T; CONTI, V; MIGLIETTA, D. et al. NO-donating atorvastatin reduces atherogenesis in mice. **Cardiovascular Research**, v. 94, p. 428–438, 2012.

MONCADA, S. Nitric Oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 811, p. 60-7, 1997.

MONCADA, S. Physiological effects of nitric oxide. **Journal of Hypertension**, v. 12: 35-9, 1994.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 193-201, 2006.

MONCADA, S; PALMER, R.M; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, p. 109-42, 1991.

MONTERO, D; WALTHER, G; PEREZ-MARTIN, A; ROCHE, E; VINET, A. Endothelial dysfunction, inflammation and oxidative stress in obese children and adolescents: markers and effect of lifestyle intervention. **Obesity Reviews**, v. 13, n. 5, p. 441-55, 2012.

MOREIRA E.L.G; AGUIAR JR., A.S; DE CARVALHO, C.R; SANTOS, D.B; DE OLIVEIRA, J; DE BEM, A.F; XIKOTA, J.C; WALZ, R. et al. Effects of lifestyle modifications on cognitive impairments in a mouse model of hypercholesterolemia. **Neuroscience Letters**, v. 541, p. 193–198, 2013.

MORGAN, K. The role of calcium in the control of vascular tone as assessed by the Ca^{2+} indicator aequorin. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 4, p. 1355-1362, 1990.

MORI-KAWABE, M; TSUSHIMA, H; FUJIMOTO, S; TADA, T; ITO, J. Role of Rho/Rho-kinase and NO/cGMP signaling pathways in vascular function prior to atherosclerosis. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 16, p.722–732, 2009.

MORTARA, A; LA ROVERE, M.T; SIGNORINI, M.G; PANTALEO, P; PINNA, G; MARTINELLI, L; CECONI, C et al. Can power spectral analysis of heart rate variability identify a high risk subgroup of congestive heart failure patients with excessive sympathetic activation? A pilot study before and after heart transplantation. **British Heart Journal**, v. 71, p. 422–30, 1994.

MUELLER, C.F; LAUDE, K; MCNALLY, J.S; HARRISON, D.G. Redox mechanisms in blood vessels. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 2, p. 274–278, 2005.

MULVANY, M.J; HALPERN, W. contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circulation Research**, v. 41, n. 1, 1977

NABEL, E.G. Cardiovascular Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 349, p. 60-72, 2003.

NAGAO, T; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor and endothelium-dependent relaxation. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 1993.

NAKASHIMA, Y; PLUMP, A.S; RAINES, E.W; BRESLOW, J.L; ROSS, R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 14, p. 133–140, 1994.

NAPOLI, C; IGNARRO, S.W; DE NIGRIS, F; LERMAN, L.O; ROSSI L; GUARINO, C; MANSUETO, G et al. Long-term combined beneficial effects of physical training and metabolic treatment on atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 8797-802, 2004.

NAPOLI, C; WILLIAMS-IGNARRO, S; DE NIGRIS, F; LERMAN, L.O; D'ARMIENTO, F.P; CRIMI, E; BYRNS, R.E; CASAMASSIMI, A; et al. Physical training and metabolic supplementation reduce spontaneous atherosclerotic plaque rupture and prolong survival in hypercholesterolemic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 27, 2006.

NASCIMENTO, C.A; PATRIARCA, G; HEIMANN, J.C. Estrutura orgânica do endotélio vascular. In: **Endotélio e doenças Cardiovasculares**. Da Luz PL, Laurindo FRM, Chagas ACP. São Paulo: Atheneu, p. 1-16, 2003.

NETO, S.S; NASCIMENTO, J.L. Doença arterial obstrutiva periférica: novas perspectivas de fatores de risco. **Revista Paraense de Medicina**, v. 21, p. 35-9, 2007.

NIEBAUER, J; MAXWELL, A.J LIN, P.S; TSAO, P.S; KOSEK, J; BERNSTEIN, D;COOKE, J.P. Impaired aerobic capacity in hypercholesterolemic mice: partial reversal by exercise training. **American Journal of Physiology**, v. 276, p. 1346–1354, 1999.

NIEBAUER, J; MAXWELL, A.J; LIN, P.S; WANG, D; TSAO, P.S; COOKE, J.P. NOS inhibition accelerates atherogenesis: reversal by exercise. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 285, n.2, p. 535-40, 2003.

NISHIMURA, S; SEKIGUCHI, M; KANO, T; ISHIWATA, S; NAGASAKI, F; NISHIDE, T; OKIMOTO, T et al. Effects of intensive lipid lowering by low-density lipoprotein apheresis on regression of coronary atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolemia: Japan Low-density Lipoprotein Apheresis Coronary Atherosclerosis Prospective Study (L-CAPS). **Atherosclerosis**, v. 144, p. 409–17, 1999.

NISSEN, S.E; TUZCU, E.M; SCHOENHAGEN, P; BROWN, B.G; GANZ, P; VOGEL, R.A; CROWE, T et al. Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. **Journal of the American Medical Association**, v.29, p.1071–1080, 2004.

NOGUEIRA, B.V. **Remodelamento vascular em camundongos ateroscleróticos na coexistência de hipertensão renovascular 2R1C**. 2005. 141f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Ciências Fisiológicas do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Global recommendations on physical activity for healthy**. World Health Organization, Geneva, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Relatório mundial da saúde 2013: pesquisa para a cobertura universal de saúde**, World Health Organization, Geneva, 2013.

OZAKI, M; KAWASHIMA, S; YAMASHITA, T; HIRASE, T; NAMIKI, M; INOUE, N; HIRATA, K; et al. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 3, 2002.

PARANHOS, M.L.S; MIGUEL, S. **Disfunção sexual**. Barueri, SP: Manole, 2007.

PARK, K-H; PARK, W.J. Endothelial Dysfunction: Clinical Implications Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches, **Journal of Korean Medical Science**, v. 30, p. 1213-1225, 2015.

PEARSON, J.D. Normal endothelial cell function. **Lupus**, v. 9, n. 3, p. 183-8, 2000.

PEDRON, C; RISTOW, A.V; FILHO, J.M.C; MARTIN, H.C; PEIXOTO, C.C; DA FONSECA, L.M.B. Tratamento endovascular da oclusão das artérias ilíacas. **Radiologia Brasileira**, v. 34, n.5, p. 261–265, 2001.

PIECH, A; DESSY, C; HAVAUX, X; FERON, O; BALLIGAND, J.L. Differential regulation of nitric oxide synthases and their allosteric regulators in heart and vessels of hypertensive rats. **Cardiovascular Research**, v. 57, p. 456-467, 2003.

PIEDRAHITA, J.A; ZHANG, S.H; HAGAMAN, J.R. et al. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, p. 4471–4475, 1992

PITSAVOS, C.E; AGGELI, K.I; BARBETSEAS, J.D; SKOUMAS, I.N; LAMBROU, S.G; FROGOUDAKI, A.A. et al. Effects of pravastatin on thoracic aortic atherosclerosis in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. **American Journal of Cardiology**, v. 82, p. 1484–8, 1998.

PLUMP, A.S; SMITH, J.D; HAYEK, T; AALTO-SETÄLÄ, K; WALSH, A; VERSTUYFT, J.G; RUBIN, E.M et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. **Cell**, v. 71, p. 343–353, 1992.

PONIKOWSKI, P.T; CHUA, P.T; PIEPOLI, M; ONDUSOVA, D; WEBB-PEPLOE, K; HARRINGTON, D; ANKER, S.D et al. Augmented peripheral chemosensitivity as a potential input to baroreflex impairment and autonomic imbalance in chronic heart failure. **Circulation**, v. 96, p. 2586–94, 1997.

PYNN, M; SCHÄFER K; KONSTANTINIDES, S; HALL, M. Exercise Training Reduces Neointimal Growth and Stabilizes Vascular Lesions Developing After Injury in Apolipoprotein E-Deficient Mice. **Circulation**, v. 109, n.3, p. 386-92, 2004.

RABELO, L.A; CORTES, S.F; ALVAREZ-LEITE, J.I; LEMOS, V.S. Endothelium dysfunction in LDL receptor knockout mice: a role for H₂O₂. **British Journal of Pharmacology**, v.138, p. 1215–1220, 2003.

RAMACHANDRAN, S; PENUMETCHA, M; MERCHANT, N.K; SANTANAM, N; RONG R; PARTHASARATHY, S. Exercise reduces preexisting atherosclerosis lesions in LDL receptor knockout mice. **Atherosclerosis**, v. 178, p. 33-38, 2005.

RODRIGUES, B; IRIGOYEN, M.C; DE ANGELIS, K. Correlation between speed and oxygen consumption (VO_2) in rats submitted to maximum exercise test. **The FIEP Bulletin. Foz do Iguaçu**, v. 76; p. 231-233, 2006.

ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. **Nature**, v. 362, p. 801-809, 1993.

RUSH, A.J; TRIVEDI, M.H; CARMODY, T.J; IBRAHIM, H.M; MARKOWITZ, J.C; KEITNER, G.I; KORNSTEIN, S.G; et al. Self-reported depressive symptom measures: Sensitivity to detecting change in a randomized, controlled trial of chronically depressed, nonpsychotic outpatients. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, p. 405-416, 2005.

SANTOS, J.R., L.F dos. **O papel do receptor toll-like 4 na aterogênese em modelo experimental de aterosclerose**. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2008.

SANTOS, R.D; GAGLIARDI, A.C.M; XAVIER, H.T; CASELLA FILHO, A; ARAÚJO, D.B; CESENA, F.Y; ALVES, R.J et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (HF). **Arquivos Brasileiro de Cardiologia**, v. 99, p. 1-28, 2012.

SCHMIDT, K; WERNER, E.R; MAYER, B; WACHTER, H; KUKOVETZ, W.R Tetrahydrobiopterin-dependent formation of endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) in aortic endothelial cells. **Biochemical Journal**, v. 281, p. 297-300, 1992.

SCHOENHAGEN, P; ZAIADA, K; VINCE, G, NISSEN, S.E; TUZCU, E.M. Arterial remodeling and coronary artery disease: The concept of “dilated” versus “obstructive” coronary atherosclerosis. **Journal of the American College Cardiology**, v. 38, p. 297–306, 2001.

SCHRAMM, J.M.A; OLIVEIRA, A.F; LEITE, I.C; VALENTE, J.G; GADELHA, A.M.J; PORTELLA, M.C, CAMPOS, M.R. Transição epidemiológica e o estudo de carga de doença no Brasil. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 9, p. 897-908, 2004.

SHAUL, P.W. Endothelial nitric oxide synthase, caveolae and the development of atherosclerosis. **Journal of Physiology**, v. 547, p. 21–33, 2003.

SIASOS, G; TOUSOULIS, D; ANTONIADES, C; STEFANADI, E; STEFANADIS, C. L-Arginine, the substrate for NO synthesis: An alternative treatment for premature atherosclerosis? **International. Journal of. Cardiology**, v. 116, n. 3, p. 300-8, 2006.

SILVA, B.R. **A resposta contrátil induzida pela fenilefrina é modulada pelo peróxido de hidrogênio em aorta de ratos hipertensos renais**. 2013. 224f. 54fig. Tese (Doutorado em Ciências) – Departamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2013.

SMILDE, T.J; VAN WISSEN, S; WOLLERSHEIM, H; TRIP, M.D; KASTELEIN, J.J; STALENHOEF, A.F. Effect of aggressive versus conventional lipid lowering on atherosclerosis progression in familial hypercholesterolaemia (ASAP): a prospective, randomised, double-blind trial. **Lancet**, v. 357, p. 577–81, 2001.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (HF). **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 99, p. 1-28, 2012.

SOMLYO, A.P; WU, X; LALKER, L.A; SOMLYO, A.V. Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases. **Reviews of Physiology Biochemistry Pharmacology**, v. 134, p. 201– 234, 1999.

SORIA, L.F; LUDWIG, E.H; CLARKE, H.R. et al. Association between a specific apoprotein B mutation and familial defective apo B 100. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 2, p. 587-91, 1989.

STEFANIA, M; MONOPOLO, A; ALBERTI, P.F. et al. Nitric oxide enhances the anti-inflammatory and anti-atherogenic activity of atorvastatin in a mouse model of accelerated atherosclerosis. **Cardiovascular Research**, v. 94, p. 428–438, 2012.

TEODORO, B.G; NATALI, A.J; FERNANDES, S.A; SILVA, L.A; PINHO, R.A; MATTA, S.L; PELUZIO MDO, C.. Improvements of atherosclerosis and hepatic oxidative stress are independent of exercise intensity in LDL^{-/-} mice. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 19, p. 904-911, 2012.

TEODORO, B.G; NATALI, A.J; FERNANDES, S.A.T; PELUZIO, M DO CARMO G et al. A influência da intensidade do exercício físico aeróbio no processo aterosclerótico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 16, n. 5, 2010.

VAN DE BORNE, P; MONTANO, N; PAGANI, M; OREN, R; SOMERS V.K. Absence of low-frequency variability of sympathetic nerve activity in severe heart failure. **Circulation**, v. 95, p. 1449–54, 1997.

VAN ROSSUM, J.M. Cumulative dose-response curves. II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. **Archives Internationales Pharmacodynamie et de Thérapie**, v. 143, p. 299-330, 1963.

VANHOUTTE, P.M. Endothelial control of vasomotor function - from health to coronary disease. **Circulation Journal**, v. 67, p. 572-5, 2003.

VARNAVA, A.M; MILLS, P.G, DAVIES, M.J. Relationship between coronary artery remodeling and plaque vulnerability. **American Heart Association**, v. 105, p. 938-943, 2002.

VERHAMME, P; QUARCK, R; HAO, H; KNAAPEN, M; DYMARKOWSKI, S; BERNAR, H; VAN CLEEMPUT, J; JANSSENS, S et al. Dietary cholesterol withdrawal reduces vascular inflammation and induces coronary plaque stabilization in miniature pigs. **Cardiovascular Research**, v. 56, p. 135–144, 2002.

WAJCHENBERG, B.L. Disfunção Endotelial no Diabetes do Tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v, 46 n. 5, 2002.

WEBB, R.C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v. 27, n.4, p. 201-206, 2003.

WEBER, C; ZERNECKE, A; LIBBY, P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n.10, p. 802–15, 2008.

WENCESLAU, C.F; DAVEL, A.P; XAVIER, F.E, ROSSONI LV. Long-term ouabain treatment impairs vascular function in resistance arteries. **Journal Vascular Research**, v. 48, p. 316-326, 2011.

WERNER, E.R; WERNER-FELMAYER, G; MAYER, B. Tetrahydrobiopterin, cytokines, and nitric oxide synthesis. **Proceedings Society Experimental Biology and Medicine**, v. 219, p. 171–182, 1998.

YANG, H; ZHOU, L; WANG, Z.L. et al. Overexpression of antioxidant enzymes. in ApoE-deficient mice suppresses Benzo(a)pyrene-accelerated atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 207, p. 51-8, 2009.

YOSHIDA, R.A; MATIDA, C.K; SOBREIRA, M.L; GIANINI, M; MOURA, R; ROLLO, H.A; YOSHIDA, W.BMAFFEI, F.H DE ABREU. Estudo comparativo da evolução e

sobrevida de pacientes com claudicação intermitente, com ou sem limitação para exercícios, acompanhados em ambulatório específico. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 7, p. 112-22, 2008.

YUN, A.J; DOUX, J.D; BAZAR, K.A, LEE, P.Y. Adventitial dysfunction: an evolutionary model for understanding atherosclerosis. **Medical Hypotheses**, v. 65, n. 5, p. 962-965, 2005.

ZAGO, A.S; ZANESCO, A. Óxido nítrico, doenças cardiovasculares e exercício físico **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 81, p. 264-7, 2006.

ZANESCO, A; ANTUNES, E. Effects of exercise training on the cardiovascular system: pharmacological approaches. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 114, p. 307-17, 2007.

ZHAO, Y; YE, D; WANG, J; CALPE-BERDIEL, L; SAALEHA B.R.N. AZZIS, S.B.R.N; VAN BERKEL, T.J.C; ECK, M.V. stage-specific remodeling of atherosclerotic lesions upon cholesterol lowering in LDL receptor knockout mice. **The American Journal of Pathology**, v. 179, n. 3, 2011.

ANEXO I



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

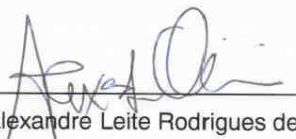
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto **"EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO NA REATIVIDADE VASCULAR DAS ARTÉRIAS ILÍACA E FEMORAL EM MODELO EXPERIMENTAL DE ATEROSCLEROSE"** (protocolo nº **3537-1**), sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Maria Andréia Delbin / Nádia Fagundes Garcia**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

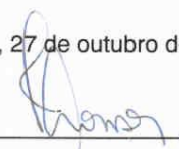
A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **27 de outubro de 2014**.

Campinas, 27 de outubro de 2014.



Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva