

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Lis Pierucetti Souza Louro

**Efeitos do treinamento aeróbico em camundongos
ateroscleróticos**

Vitória

2008

LIS PIERUCETTI SOUZA LOURO

**EFEITOS DO TREINAMENTO AERÓBICO EM
CAMUNDONGOS ATEROSCLERÓTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez.

Vitória
2008

LIS PIERUCETTI SOUZA LOURO

EFEITOS DO TREINAMENTO AERÓBICO EM CAMUNDONGOS ATEROSCLERÓTICOS

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 09 de maio de 2008.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof^a. Dr^a. Margareth Ribeiro Moyses
Universidade Federal do Espírito Santo
(Examinador interno)

Prof. Dr. Eliudem Galvão Lima
Universidade Federal do Espírito Santo
(Examinador externo)

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

L875e Louro, Lis Pieruceti Souza.
Efeitos do treinamento aeróbico em camundongos
ateroscleróticos. / Lis Pierucetti Souza Louro. – 2008.
65f. : ilus.

Orientador: Elisardo Corral Vasquez.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito
Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Aterosclerose. 2. Senescência. 3. Exercício físico. I.
Vasquez, Elisardo Corral. II. Universidade Federal do Espírito
Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU:61

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

A Deus pela constante presença em minha vida.

Ao meu amado marido Marcel e aos meus preciosos filhos Arthur, Breno e Caio pela compreensão, paciência e muito apoio nesses dois anos de muita ausência.

A todos os colegas de laboratório que, de diferentes maneiras, me ajudaram a concluir este curso.

A professora Silvana pela receptividade e cortesia com que me recebeu no laboratório. Obrigada pela confiança e credibilidade.

Ao professor Vasquez, meu orientador, que com seu conhecimento, apoio e serenidade me fez sentir muito melhor em longos momentos de desespero. Sem a sua ajuda tudo seria muito mais difícil.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 PROCESSO ATEROSCLERÓTICO.....	13
1.2 CAMUNDONGO apoE <i>knockout</i> (^{-/-}).....	15
1.3 SENESCÊNCIA CELULAR.....	17
1.4 SENESCÊNCIA CELULAR VASCULAR, ESTRESSE OXIDATIVO E ATEROSCLEROSE.....	19
1.5 EXERCÍCIO FÍSICO.....	21
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	27
3.2 PROTOCOLO DE TESTE MÁXIMO DE ESFORÇO.....	28
3.3 PROTOCOLO DE TREINAMENTO AERÓBICO.....	29
3.4 MEDIDAS HEMODINÂMICAS.....	30
3.5 ANÁLISE DE SENESCÊNCIA VASCULAR.....	31
3.6 ANÁLISE DE LESÃO ATEROSCLERÓTICA.....	32
3.7 MEDIDA DE COLESTEROL PLASMÁTICO E TRIGLICÉRIDES.....	33
3.8 MEDIDA DE PESO VENTRICULAR.....	33
3.9 PESO CORPORAL E CONTROLE ALIMENTAR.....	33
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
4 RESULTADOS.....	35
4.1 DADOS PONDERAIS E CONSUMO DE RAÇÃO E ÁGUA.....	35

4.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMODINÂMICOS.....	35
4.3 VELOCIDADE MÁXIMA ALCANÇADA PELOS ANIMAIS NO TESTE DE ESFORÇO ANTES E APÓS O PERÍODO DE TREINAMENTO.....	36
4.4 DISTÂNCIA DE MÁXIMA ALCANÇADA PELOS ANIMAIS NO TESTE DE ESFORÇO ANTES E APÓS O PERÍODO DE TREINAMENTO.....	37
4.5 ÁREA DE LESÃO ATEROSCLERÓTICA.....	38
4.6 ANÁLISE DE SENESCÊNCIA VASCULAR.....	39
4.7 FOTOS REPRESENTATIVAS DAS ÁREAS DE SENESCÊNCIA E LESÃO ATEROSCLERÓTICA.....	40
5 DISCUSSÃO.....	42
6 CONCLUSÃO.....	53
7 REFERÊNCIAS.....	55

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Esteira Ergométrica	28
Figura 2 - Seqüência temporal do protocolo de treinamento	29
Figura 3 - Registro animal acordado	31
Figura 4 - Sistema de perfusão sob pressão controlada	32
Figura 5 - Velocidade máxima alcançada no teste de esforço antes e após o período de treinamento	37
Figura 6 - Distância máxima alcançada no teste de esforço antes e após o período de treinamento	38
Figura 7 - Área de coloração SA β -gal da artéria aorta	39
Figura 8 - Área de lesão de placa aterosclerótica	39
Figura 9 - Fotos representativas de senescência vascular e lesão aterosclerótica	40
Tabela 1 - Médias ponderais e consumo de água e ração	35
Tabela 2 - Medidas bioquímicas e hemodinâmicas	36
Organograma - Grupos experimentais	27

LISTA DE ABREVIATURAS

DCV: Doenças Cardiovasculares

LDL: lipoproteína de baixa densidade- *low density protein*

HDL: lipoproteína de alta densidade- *high density protein*

C57BL/6: linhagem de camundongo C57 black/6

apoE^{-/-}: camundongo deficiente (*knockout*) homocigoticamente
para apolipoproteína E

VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade- *very low density protein*

SA β -gal: senescência associada com a atividade da β -galactosidase em pH 6.0
(*senescence-associated β -galactosidase*)

NO: óxido nítrico

TG: triglicérides

eNOS: NO sintase endotelial

PAM: Pressão Arterial Média

FC: Frequência Cardíaca

CT: Colesterol total

ROS: Espécies reativas de oxigênio

ecSOD: superóxido dismutase extra-celular

LDL^{-/-}: camundongo deficiente (*knockout*) dos receptores de LDL

RESUMO

A doença aterosclerótica é caracterizada por um processo inflamatório crônico que, por sua vez, pode acelerar a senescência de células vasculares e agravar a instalação de placas. O exercício aeróbico moderado melhora a função vascular prevenindo o agravamento do processo aterosclerótico. Camundongo apoE^{-/-}, modelo experimental de aterosclerose espontânea, tem se mostrado uma valiosa ferramenta no estudo dessa doença. O objetivo deste estudo foi verificar a capacidade de treinamento dos camundongos apoE^{-/-} e verificar a influência do treinamento físico na senescência de células vasculares e na lesão aterosclerótica.

Camundongos apoE^{-/-} (n=16) e C57BL/6 (n=16) machos de 4 ½ meses de idade foram divididos em grupo treinado e sedentário. O treino correspondeu a: 1 hora/dia, 50-70% da velocidade máxima de corrida, 5 vezes/semana, 5 semanas. Foram realizadas medidas de colesterol, pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC). Após o treino os animais foram eutanasiados, a aorta retirada e incubada em uma solução X-gal (pH 6.0) para caracterização colorimétrica (cor azul) da senescência e posterior quantificação de área de placa. Os dados estão expressos como média ± EPM. Para análise estatística foi usado ANOVA 2-vias, seguida do *post hoc* de Fisher, **p< 0,05.

Foi encontrada senescência vascular nos animais apoE^{-/-} e o treinamento aeróbico não reduziu a área de lesão aterosclerótica, embora observou-se uma tendência de redução de área de senescência de células vasculares. A capacidade de corrida dos grupos C57 e apoE^{-/-} não foi diferente antes do programa de treinamento, no entanto, o mesmo aumentou a capacidade máxima de corrida dos animais quando comparado aos sedentários, com ganho percentual de 36 e 42% na velocidade máxima alcançada nos grupos C57 e apoE^{-/-} treinados, respectivamente. Os animais apoE^{-/-} apresentaram hipercolesterolemia (sedentário: 646±75^{###}, treinado: 664±66^{###} mg/dL) em relação aos C57 (sedentário: 161±16, treinado: 102±12 mg/dL), e o treino não influenciou o colesterol, FC e PA.

Os camundongos apoE^{-/-} apresentaram o mesmo ganho de performance física com o treino que os animais C57. Apesar da área de lesão de placa não ter sido reduzida com o treino, observou-se uma tendência de redução de senescência nos animais ateroscleróticos, sugerindo um possível efeito do treinamento aeróbico na redução do desenvolvimento precoce de senescência vascular.

ABSTRACT

Atherosclerotic disease is a chronic inflammatory disease that can accelerate vascular cells senescence and aggravate lesions formation. Moderate aerobic exercise improves vascular function and prevents the aggravation of the atherosclerotic process. ApoE^{-/-} mice, an atherosclerotic experimental model, have been an useful tool to understand the process involved in the progression of this disease. The objectives of this study were to verify the performance capacity of apoE^{-/-} mice as well to verify the influence of an exercise program on the vascular cells senescence and the atherosclerotic lesion.

ApoE^{-/-} (n=16) and C57BL/6 (n=16) male mice with 4 ½ months old were divided in trained and sedentary groups. Exercise program corresponded: 1hour/day, 50-70% maximal running speed, 5 days/week for 5 weeks. Cholesterol and hemodynamic parameters were also measured. At the end of the exercise protocol, the animals were euthanized; the aorta was removed and incubated in X-gal solution (ph 6.0) for colorimetric assay for senescence, and later for plaque quantification. Results are expressed as mean ± SEM. 2 way-ANOVA with Fisher *post hoc* was used to statistical analyses, *p< 0,05.

Vascular senescence was observed in both groups of apoE^{-/-} mice; and the training did not reduce the atherosclerotic lesion area, although we observed a tendency to reduction in the senescence area. The physical performance of C57 and apoE^{-/-} was not different before the training protocol, but it increased the maximal running speed after the training program, with 36 and 42% increases in the trained C57 and apoE^{-/-}, respectively. ApoE^{-/-} mice were hypercholesterolemic (sedentary: 646±75^{###}, trained: 664±66^{###} mg/dL) compared to C57 (sedentary: 161±16, trained: 102±12 mg/dL), and the training did not modified the cholesterol and the hemodynamic parameters.

ApoE^{-/-} mice showed the same capacity of C57 to improve the physical performance. Despite the atherosclerotic lesion area were not reduce with the training protocol, we observed a tendency in the reduction of the senescence area with the training, suggesting a possible effect in the aerobic training in the prevention of the premature senescence.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) figuram entre as doenças que mais acometem homens e mulheres do mundo ocidental, sendo responsáveis por mais de 40% das mortes em nações industrializadas (SMITH, 2001), causando uma preocupação mundial nos tempos atuais, segundo o *American Heart Association-Heart Disease and Stroke Statistics* (2006). No Canadá as DCV são responsáveis por aproximadamente 35% das mortes e cerca de 20 milhões de dólares são gastos diretos e indiretamente em saúde (RUSH *et al.*, 2005).

No entanto, nos últimos 30 anos, países desenvolvidos e industrializados como os Estados Unidos tiveram um razoável declínio no índice de mortalidade por doenças cardiovasculares, ao contrário de países em desenvolvimento como o Brasil, em que as projeções, segundo a Organização Mundial de Saúde, revelam grandes preocupações (IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose, 2007). No Brasil em 2004, o número de mortes por doenças cardiovasculares representou aproximadamente 28% do total de mortes ocorridas, segundo dados publicados no Saúde Brasil 2006 (Saúde Brasil, 2006).

A doença aterosclerótica é uma das principais doenças cardiovasculares (LIBBY *et al.*, 2002), e acomete mais vidas do que todos os tipos de câncer juntos, além do alto custo econômico envolvido (STOCKER & KEANER Jr., 2004). Resulta da interação complexa de fatores genéticos e ambientais (JÁWIËN *et al.*, 2004); que pode ser fortemente potencializado quando em sinergismo com alguns desses fatores (IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose, 2007). Por ser uma doença multifatorial, sua prevenção deve abranger não só as dislipidemias como também os fatores de risco envolvidos com a doença (SANTOS *et al.*, 2001).

A inatividade física, juntamente com outros fatores de risco como hipercolesterolemia, hábitos alimentares, tabagismo, entre outros, contribui significativamente para o desenvolvimento das doenças crônicas (Doenças crônico-degenerativas e obesidade: Estratégia Mundial sobre Alimentação Saudável, Atividade Física e Saúde, 2003). Pesquisas têm revelado que a prática de atividade física regular em homens e mulheres correlaciona-se inversamente à taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares (SHEPHARD & BALADY, 1999; THOMPSON *et al.*, 2007; SMITH, 2001).

Paradoxalmente à sobrecarga oxidativa que o exercício físico promove, há o aumento das defesas antioxidantes (FUKAI *et al.*, 2000; IGNARRO *et al.*, 2006) que, por sua vez, melhora o *status* oxidativo do tecido, condição essa prejudicada na doença aterosclerótica (HARRINSON *et al.*, 2003). Da mesma forma, o stress oxidativo e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio têm uma importante função na indução da senescência (BEN PORATH & WEINBERG, 2005), condição essa encontrada em placas ateroscleróticas (MATTHEWS *et al.*, 2006).

1.1 PROCESSO ATEROSCLERÓTICO

A doença aterosclerótica é uma doença inflamatória resultante da interação de uma série de respostas celulares e moleculares que se desenvolvem de forma silenciosa ao longo da vida. É caracterizada pelo acúmulo de lipídios e elementos fibrosos na íntima do vaso, que progride em lesões avançadas ou placas fibróticas que avançam para o lúmen do mesmo, podendo desencadear em ruptura da placa e desfechos trombóticos, com complicações agudas clínicas de infarto do miocárdio e derrame cerebral (OHASHI *et al.*, 2004; GLASS & WITSTUM, 2001; ROSS, 1999).

As lesões ocorrem principalmente nas artérias musculares, elásticas de médio e grande porte (ROSS, 1999), em sítios preferenciais como áreas de bifurcações e curvaturas dos vasos; locais esses de grande fluxo turbilhonar e com reduzido estresse de cisalhamento endotelial (CHATZIZISIS *et al.*, 2007; LUSIS, 2000; LIBBY *et al.*, 2002) e que levam ao desenvolvimento das doenças clínicas (SOLBERG & EGGEN, 1971).

Dentre fatores genéticos e ambientais determinantes da aterosclerose, elevados níveis de colesterol de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c), parecem ser determinantes no desencadeamento da doença, mesmo na ausência dos demais fatores de risco (GLASS & WITSTUM, 2001).

Os LDL-c, em excesso na circulação, entram em contato com as células endoteliais mais permeáveis das paredes dos vasos, células essas modificadas pelo elevado fluxo turbilhonar e menor estresse de cisalhamento, e penetram na camada sub-endotelial. Uma vez nesta camada, os LDL-c sofrem alterações conformacionais, principalmente a oxidação proveniente dos radicais livres,

formando LDL oxidado (LDLox), que por sua vez, vão ser reconhecidos e captados por macrófagos (Lusis, 2000), iniciando o evento aterosclerótico.

O recrutamento de monócitos e a captação de LDLox nos sítios de lesões na camada sub-endotelial é desencadeado pela ativação de moléculas de adesão leucocitárias e quimiotáticas, além do próprio LDLox, em resposta ao estímulo inflamatório (GLASS & WITZTUN, 2001; LIBBY *et al.*, 2002).

Na íntima, os monócitos adquirem propriedades de macrófago tecidual, através do fator estimulante de colônia de macrófagos, expressando receptores removedores (*scavengers*) e gerando internalização de lipoproteínas modificadas. A princípio, a captação de lipoproteínas por macrófagos caracteriza-se pela remoção protetora de partículas citotóxicas e pró-inflamatórias e de células apoptóticas. No entanto, acúmulo progressivo dessas partículas leva a formação de células espumosas, alterando todo o micro ambiente tecidual (GLASS & WITZTUN, 2001).

A formação das células espumosas nas placas ateroscleróticas é decorrente da incapacidade de remoção do colesterol, tanto pelo excesso do mesmo quanto pela falta de habilidade de excreção do colesterol pelos macrófagos, possivelmente pela baixa disponibilidade de HDL (SCHIJVERS *et al.*, 2007), sendo a característica principal tanto de lesões iniciais quanto avançadas (GLASS & WITZTUN, 2001).

O desenvolvimento de lesões mais avançadas é determinado pela migração de células musculares lisas provenientes da camada média para a íntima e região sub-endotelial do vaso, que se proliferam e que participam da contínua captação de partículas lipídicas, contribuindo ainda mais para a formação de células espumosas e matriz extracelular, e que levam ao desenvolvimento de cápsula fibrosa (LIBBY *et al.*, 2002).

As lesões estáveis levam décadas para se tornarem lesões avançadas e instáveis. Estudos sugerem que a evolução de placas mais avançadas, caracterizadas por placa fibrosa fina, decorre de repetidos ciclos de micro hemorragias, trombose e apoptose de macrófagos, linfócitos T e células musculares lisas, com formação de tecido necrótico na camada sub-endotelial, que se expande e estreita o lúmen do vaso provocando eventos isquêmicos agudos, geralmente pela ruptura da placa (GLASS & WITZTUN, 2001; SCHRIJVERS *et al.*, 2007).

1.2 CAMUNDONGO apoE *knockout* (apoE^{-/-})

O uso de animais experimentais em pesquisas científicas é bem referido na literatura, e as primeiras evidências com animais e aterosclerose data do ano de 1908, em que pesquisadores usando coelhos demonstraram espessamento da íntima da aorta desses animais alimentados com dieta rica em proteína animal (JAWIËN *et al.*, 2004).

Desde então, tentativas com outras espécies animais foram realizadas com o objetivo de se estudar os mecanismos da doença aterosclerótica, como porcos e primatas não-humanos; no entanto, o coelho foi o que mais permitiu responder os questionamentos a respeito da doença (JAWIËN *et al.*, 2004).

Os primeiros estudos da doença aterosclerótica em camundongos foram feitos no início da década de 60, com dieta altamente rica em colesterol e ácido cólico na linhagem isogênica C57BL/6 (C57) (OHASHI *et al.*, 2004). A dieta então usada era muito tóxica e embora desenvolvessem a doença, as lesões não representavam as caracterizadas em humanos (JAWIËN *et al.*, 2004). Posteriormente, Paigen *et al.* (1990) modificaram essa dieta tornando-a menos tóxica e mais viável aos animais.

Em geral, os camundongos são altamente resistentes a desenvolver doença aterosclerótica, pois o metabolismo hepático desses animais é muito eficiente. O padrão do metabolismo desses animais é diferente do ser humano, tendo a maior fração do colesterol carregado pelo HDL, ao contrário do humano no qual a maioria do colesterol plasmático é carregada pelo LDL, fração aterogênica. A exceção são os camundongos C57 em que na presença de dieta com alto conteúdo de colesterol (PAIGEN *et al.*, 1990) apresentam a manifestação da doença aterosclerótica, embora modesta e não característica da desenvolvida em seres humanos. (MEIR & LEITERSDORF, 2004; JAWIËN *et al.*, 2004).

No intuito de se entender melhor a natureza e progressão da doença aterosclerótica, pesquisadores de dois diferentes laboratórios desenvolveram, quase simultaneamente, em 1992, animais geneticamente modificados para a apolipoproteína E, gene diretamente relacionado com o metabolismo hepático do colesterol. Esses animais deficientes para apolipoproteína E (apoE^{-/-}) foram gerados pela recombinação homóloga do gene de animais embrionários da linhagem isogênica C57, apresentando uma severa alteração no perfil das

lipoproteínas, com elevado conteúdo de VLDL, que causa extrema susceptibilidade à aterosclerose (PIEDRAHITA *et al.*, 1992; PLUMP *et al.*, 1992).

A apoE é uma glicoproteína de 34 Kd produzida principalmente no fígado e no cérebro, sendo constituinte de todas as lipoproteínas (quilomícrons, VLDL e HDL) com exceção do LDL, atuando como um ligante de receptores hepáticos LDL que medeiam a limpeza do colesterol circulante (KNOWLES & MAEDA, 2000; HARTLEY *et al.*, 2000; MEIR & LEITERSDORF, 2004; PLUMP *et al.*, 1992). A apoE também participa no transporte reverso de colesterol, redistribuição local do colesterol nos tecidos, imuno-regulação, proliferação celular e diferenciação (PLUMP *et al.*, 1992). É também produzida por monócitos e macrófagos e acredita-se que tenha ação local na homeostasia do colesterol e no processo inflamatório dos vasos (CURTISS & BOISVERT, 2000), além de participar na absorção dietética e excreção biliar (SEHAYEK *et al.*, 2000).

Os animais apoE Knockout (apoE^{-/-}), na ausência dessa apolipoproteína, tornam-se hipercolesterolêmicos e desenvolvem lesões similares à de seres humanos (ROSS, 1999; REDDICK & MAEDA, 1994; KNOWLES & MAEDA, 2000; LUSIS, 2000), representando um excelente modelo nos estudos fisiopatológicos e genéticos da doença aterosclerótica.

O perfil lipídico desses animais é bem elevado com valores médios de colesterol total de 600mg/dL enquanto que os seus precursores, os animais C57, apresentam em média 110mg/dL. O HDL reduz substancialmente e há um elevado aumento, principalmente das frações de VLDL e LDL (JAWIËN *et al.*, 2004; MEIR & LEITERSDORF, 2004).

As características anatômicas das lesões nos animais apoE^{-/-} correspondem às encontradas em outros animais e humanos. Inicialmente as lesões se desenvolvem na curvatura interna do arco aórtico, tronco braquiocefálico e carótida direita, local de fluxo alterado, expandindo-se pelas principais bifurcações ao longo do vaso no decorrer do desenvolvimento da doença, finalizando em toda a árvore arterial afetada pela doença em animais com idade mais avançada (NAKASHIMA *et al.*, 1994; JAWIËN *et al.*, 2004).

O curso temporal da doença é bem precoce nos animais, com presença de leucócitos aderidos (monócitos e linfócitos T) no endotélio do vaso em animais de somente 5 e 6 semanas de idade. Estrias gordurosas são observadas em animais de 10 semanas e a partir de 20 semanas de idade já podem apresentar formação

de placas fibróticas ricas em células musculares lisas que se desenvolvem progressivamente ao longo da árvore arterial (NAKASHIMA *et al.*, 1994; JAWIËN *et al.*, 2004). Esse modelo, no entanto, não apresenta ruptura da placa fibrótica, divergindo do desfecho em seres humanos, no qual, em muitos casos, há extravasamento do líquido para o interior do vaso, culminando num evento cardiovascular agudo (JAWIËN *et al.*, 2004).

O uso de camundongos apoE^{-/-} justifica-se pelas vantagens que o animal apresenta em relação aos demais, pois são animais de fácil manipulação gênica (Hartley *et al.*, 2004), curto período reprodutivo e maturação sexual (total de 9 semanas), reproduzem o padrão de desenvolvimento de placa do ser humano mesmo sem adição de dieta aterogênica (JAWIËN *et al.*, 2004; REDDICK *et al.*, 1994), o que o torna o modelo, entre os mamíferos, com a genética mais bem estudada (PAIGEN *et al.*, 1990).

1.3 SENESCÊNCIA CELULAR

Senescência celular ou senescência replicativa é um fenômeno no qual células somáticas normais humanas perdem o potencial replicativo após determinado número de divisões celulares, previamente estabelecidos, quando cultivadas *in vitro* (CHEN QIN, 2000; CAMPISI *et al.*, 1996; SMITH & PEREIRA-SMITH, 1996).

Originalmente descrito por Hayflick e seu grupo na década de 60, as células senescentes entram em estado irreversível de capacidade de crescimento (MINAMINO & KOMURO, 2007), com presença de alterações fenotípicas na morfologia, expressão gênica e função (MINAMINO *et al.*, 2003), mudanças essas associadas com o envelhecimento humano (HAYASHI *et al.*, 2006). As células senescentes adquirem aspecto achatado e alargado e expressam diferentes pares de genes, que incluem reguladores negativos do ciclo celular como p53 e p16 (MINAMINO & KOMURO, 2007).

Inúmeras linhas de evidências demonstram uma relação entre senescência replicativa *in vitro* com o envelhecimento *in vivo*, dentre elas: a relação inversa entre idade do doador e o potencial proliferativo do fibroblasto; presença de telômero pequeno em síndromes de envelhecimento precoce como Síndrome de Werner ou Hutchinson-Gilford, relação direta do tamanho do telômero e a

longevidade da espécie; expressão de determinados genes envolvidos com o envelhecimento *in vivo* e também a presença de biomarcadores de senescência celular *in vivo* (CHEN QIN, 2000), o que facilitou o estudo do processo de senescência e sua relação com doenças relacionadas com a idade e doenças correlatas.

Desde então, inúmeros pesquisadores vêm estudando o processo de senescência replicativa em diferentes tecidos, no entanto as células mais bem caracterizadas são fibroblastos de humanos e roedores e tecido epitelial humano (SERRANO & BLASCO, 2001), células com alto potencial proliferativo (FENTON *et al.*, 2001).

Basicamente existem duas principais teorias que tentam explicar o fenômeno da senescência celular. A primeira e original linha de evidências se apóia na teoria telomérica do envelhecimento. Os cromossomos de células eucarióticas apresentam, em seu final, telômeros, que são seqüências repetidas de nucleotídeos TTAAGGG que se estendem por vários pares de bases, e que são responsáveis pela estabilização da cadeia cromossomal. Pela ausência ou reduzida quantidade da enzima telomerase da maioria das células somáticas normais humanas, enzima essa responsável em manter o comprimento do telômero com as repetidas divisões celulares, a célula se torna incapaz de manter o comprimento dos telômeros (HAYASHI *et al.*, 2006; ZAKIAN, 1995; VAZIRI *et al.*, 1994).

Conseqüentemente a senescência das células somáticas humanas é determinada pela incapacidade de manter o comprimento dos telômeros nas divisões celulares, sendo inversamente relacionada com o tamanho do telômero. O número de replicações da célula em cultura é o grande determinante do processo de senescência, e não a idade cronológica da célula propriamente dita, pois estudos têm mostrado que células relativamente novas em cultura e na presença de ambiente inadequado apresentam características de senescência (CHEN QIN, 2000), sugerindo, com isso, outros fatores determinantes do mesmo.

A segunda hipótese, e mais recente, baseia-se na Teoria do Radical Livre (HAYASHI *et al.*, 2006) em que estímulos estressantes, persistentes, possam ser fortes candidatos na indução de um estado de senescência celular precoce (SERRANO & BLASCO, 2001; ERUSALIMSKY & KURZ, 2005; CHEN QIN, 2000). Estudos têm mostrado uma forte relação entre senescência e patologias

relacionadas com o envelhecimento tecidual precoce como a aterosclerose (MATTEWS *et al.*, 2006), podendo ser dependente ou não da proliferação natural da célula e do dano do telômero (CHEN *et al.*, 2001).

A descoberta da técnica SA- β gal (*senescence-associated β -galactosidase*) por Dimri e colaboradores promoveu um grande avanço nos estudos das doenças relacionadas com a idade. Ao observarem um aumento da atividade da β -galactosidase (SA- β gal) em pH 6.0 de células em cultura e tecidos obtidos de doadores com idade mais avançada, eles interpretaram os seus resultados como uma provável ligação entre senescência replicativa de células em cultura com o envelhecimento *in vivo* (DIMRI *et al.*, 1995).

Desde então, inúmeros trabalhos utilizando essa técnica vêm sendo realizados em diferentes tecidos de mamíferos e em diversas condições de cultura, sendo considerado um dos mais utilizados marcadores de senescência *in vivo* disponíveis (ERUSALIMSKY & KURZ, 2005).

Células incubadas com o substrato cromogênico 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactosidase (Xgal) em pH 6.0 expressam a coloração azul em células com características fenotípicas de senescência (DIMRI *et al.*, 1995), provavelmente pela manifestação do aumento da massa lisossomal das mesmas (KURZ *et al.*, 2000). Ao contrário, a exposição das células com mesmo substrato, porém em pH 4.0, identifica a atividade lisossomal de células normais, ou seja, todas as células são coradas (DIMRI *et al.*, 1995).

1.4 SENESCÊNCIA CELULAR VASCULAR, ESTRESSE OXIDATIVO E ATEROSCLEROSE

O envelhecimento é um processo de deteriorização de muitas funções do corpo ao longo da vida, apesar de ser um processo inevitável em qualquer ser vivo. Porém, raramente o envelhecimento por si só é responsável por mortes em seres humanos; geralmente está associada com fatores relacionados à idade, como a doença aterosclerótica (CHEN QIN, 2000).

Inúmeros trabalhos têm demonstrado que alterações observadas em células vasculares senescentes representam as encontradas na aterosclerose (MINAMINO *et al.*, 2003; CHANG & HARLEY, 1995), sugerindo uma inter-relação entre o processo aterosclerótico e senescência.

O desenvolvimento da aterosclerose é determinado por múltiplos fatores como: o estresse oxidativo, LDL oxidado e citocinas nas áreas vasculares, que podem induzir apoptose e senescência em células endoteliais vasculares e células musculares lisas (IKUSHIMA *et al.*, 2006;); e, por sua vez, levarem ao agravamento das placas ateroscleróticas (KUNIEDA *et al.*, 2006).

Células vasculares endoteliais sujeitas a forças hemodinâmicas podem envelhecer precocemente, iniciando ou exacerbando o processo aterosclerótico (DIMRI *et al.*, 1995). Parece que o estímulo aterogênico aumenta a divisão celular em locais de aterosclerose, região de grande fluxo turbilhonar, acelerando o encurtamento do telômero e possivelmente ativando sinais proliferativos que podem induzir senescência; além do próprio estresse oxidativo e dano no DNA aumentarem esse processo, contribuindo para disfunção endotelial e promoção da aterosclerose (MINAMINO & KOMURO, 2007; ROSS, 1999).

Tanto células musculares lisas (MINAMINO *et al.*, 2003; MATTHEWS *et al.*, 2006) quanto células endoteliais (MINAMINO *et al.*, 2002) de áreas de lesões ateroscleróticas humanas exibem níveis elevados de atividade SA- β gal, indicando presença de senescência celular vascular, o que pode ser acelerado em presença de estresse oxidativo crônico (MATTHEWS *et al.*, 2006).

Dados indicam que a senescência celular endotelial está relacionada com um balanço entre a produção de radicais livres e biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), que por sua vez afeta a atividade da telomerase (HAYASHI *et al.*, 2006), condição essa encontrada na aterosclerose.

Embora existam inúmeros trabalhos que correlacionem a presença de senescência de células vasculares com áreas de lesões ateroscleróticas, modelos experimentais utilizando camundongos apoE^{-/-} ainda são escassos na literatura. Kunieda e colaboradores demonstraram que angiotensina II induz senescência precoce de células de músculo liso vascular de camundongos apoE^{-/-} de 6 meses de idade, o que acelera o desenvolvimento da aterosclerose (KUNIEDA *et al.*, 2006).

Animais apoE^{-/-}, por serem um excelente modelo de aterosclerose (NAKASHIMA *et al.*, 1994), que desenvolvem características da doença de seres humanos, são fortes candidatos em estudos que objetivam verificar os efeitos terapêuticos, como a prática da atividade física, envolvidos com o desenvolvimento do processo aterosclerótico e de senescência vascular (PALINSK *et al.*, 1994).

1.5 EXERCÍCIO FÍSICO

O exercício físico, além do seu conhecido e antigo objetivo esportivo e recreacional, é um importante aliado na manutenção da qualidade de vida e na prevenção e tratamento de inúmeras doenças. A sua participação é de extrema importância como tratamento não-medicamentoso ou como recurso alternativo e adicional junto a terapias farmacológicas, sendo muito estudada no meio científico.

Evidências substanciais básicas, clínicas e epidemiológicas sugerem que atividade física regular constitui medida auxiliar no controle das dislipidemias, desenvolvimento da aterosclerose e incidência de eventos coronarianos agudos, além de influenciar fatores de risco ateroscleróticos como a hipertensão arterial, resistência à insulina e obesidade (THOMPSON *et al.*, 2007; THOMPSON *et al.*, 2003).

Em geral o efeito do exercício físico nos fatores de risco ateroscleróticos é substancialmente menor que o alcançado por terapias farmacológicas, no entanto, pode ser significativamente potencializado por mudanças em outros fatores de risco como composição dietética e perda de peso (THOMPSON *et al.*, 2003).

Recente estudo prospectivo com 2357 homens (de idade média de 72 anos) demonstrou que mudanças no estilo de vida, como a prática regular de atividade física, associada ao controle de peso corporal e de pressão arterial e da ausência de uso de cigarro, estão associados não somente ao aumento de excepcional longevidade desses homens quanto à sua qualidade de envelhecimento (YATES *et al.*, 2008).

A prática de atividade física regular promove em seres humanos redução dos níveis plasmáticos de TG e aumento dos níveis de HDL-c; no entanto, não é capaz de promover reduções significativas nas concentrações de LDL-c (SPOSITO *et al.*, 2007).

Estatísticas demonstram que o risco relativo de doenças coronarianas associadas com a inatividade física quase duplica; o que representa fator de risco importante comparado aos observados com o colesterol alto, hipertensão e fumo (Heart Disease and Stroke Statistics, 2006), tendo um importante impacto na saúde pública. Ao contrário, indivíduos ativos chegam a economizar, em média, quinhentos dólares por ano em saúde nos EUA (Doenças crônico-degenerativas e obesidade: Estratégia Mundial sobre Alimentação Saudável, 2003).

Segundo as recomendações do *American Heart Association* (AHA) e *American College of Sports Medicine* (ACSM) de 2007 todos adultos saudáveis entre 18 e 65 anos precisam se engajar em atividade física aeróbica moderada por no mínimo 30 minutos, cinco vezes por semana, ou intensidade vigorosa por no mínimo vinte minutos, três vezes por semana; podendo mesclar as intensidades com o objetivo de alcançar as recomendações (HASKELL *et al.*, 2007).

Evidências experimentais e clínicas sugerem que além dos conhecidos benefícios promovidos pelo exercício físico aeróbico na modificação de vários fatores de risco, como melhora na distribuição da gordura corporal e controle da obesidade, aumento da sensibilidade à insulina, melhora no perfil lipídico e redução da pressão arterial em hipertensos; outros mecanismos diretamente relacionados com a homeostasia vascular têm sido sugeridos.

Trabalhos realizados com animais experimentais e humanos demonstram que o exercício físico moderado é capaz de melhorar o balanço do *status* oxidativo da célula, pelo aumento da expressão de enzima como a NO sintase endotelial (eNOS) (PYNN *et al.*, 2004), aumento das defesas antioxidantes (IGNARRO *et al.*, 2006), com conseqüente aumento da biodisponibilidade de agentes vasodilatadores importantes na homeostasia vascular, como o NO (NIEBAUER *et al.*, 2003; LEWIS *et al.*, 1999; NAPOLI *et al.*, 2004).

Paradoxalmente à sobrecarga oxidativa que o exercício físico promove (LEAF *et al.*, 1999), trabalhos têm demonstrado, em animais experimentais (MEILHAC *et al.*, 2001; LEEUWENBURGH & HEINECKE, 2001) e em humanos (FINAUD *et al.*, 2006; GÓMEZ-CABRERA *et al.* 2008), que as defesas antioxidantes são aumentadas pelo exercício físico moderado e regular.

Estudos em camundongos apoE^{-/-} têm demonstrado que apesar do exercício aeróbio ser capaz de modificar vários fatores de risco cardiovasculares, como redução da atividade inflamatória e melhora no *status* oxidativo do vaso, o perfil lipídico não é muito influenciado com treinos moderados de esforço (PYNN *et al.*, 2004; PELLEGRIN *et al.*, 2007; OKABE *et al.*, 2007).

Visto que o desenvolvimento de aterosclerose e senescência vascular relacionam-se, em parte, por um desequilíbrio da atividade oxidativa do vaso sanguíneo, e que o treinamento aeróbico moderado favorece o aumento das defesas antioxidantes, com redução do estresse oxidativo em longo prazo, espera-se que o treinamento aeróbico moderado possa influenciar no desenvolvimento do

processo aterosclerótico nos animais apoE^{-/-}, retardando o desenvolvimento precoce de senescência vascular desses animais.



OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

- Verificar a capacidade de treinamento e os efeitos do mesmo em camundongos ateroscleróticos (apoE^{-/-}).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Comparar a capacidade física de camundongos apoE^{-/-} aos seus controles C57;
- Comparar a senescência de células vasculares de camundongos apoE^{-/-} com os animais C57;
- Verificar a influência do treinamento físico na evolução da senescência celular vascular de camundongos apoE^{-/-};
- Verificar a influência do treinamento físico na área de lesão aterosclerótica dos animais apoE^{-/-} sedentários e controles;
- Verificar a influência do treinamento aeróbio nas medidas hemodinâmicas, perfil lipídico, peso corporal e peso ventricular dos animais.

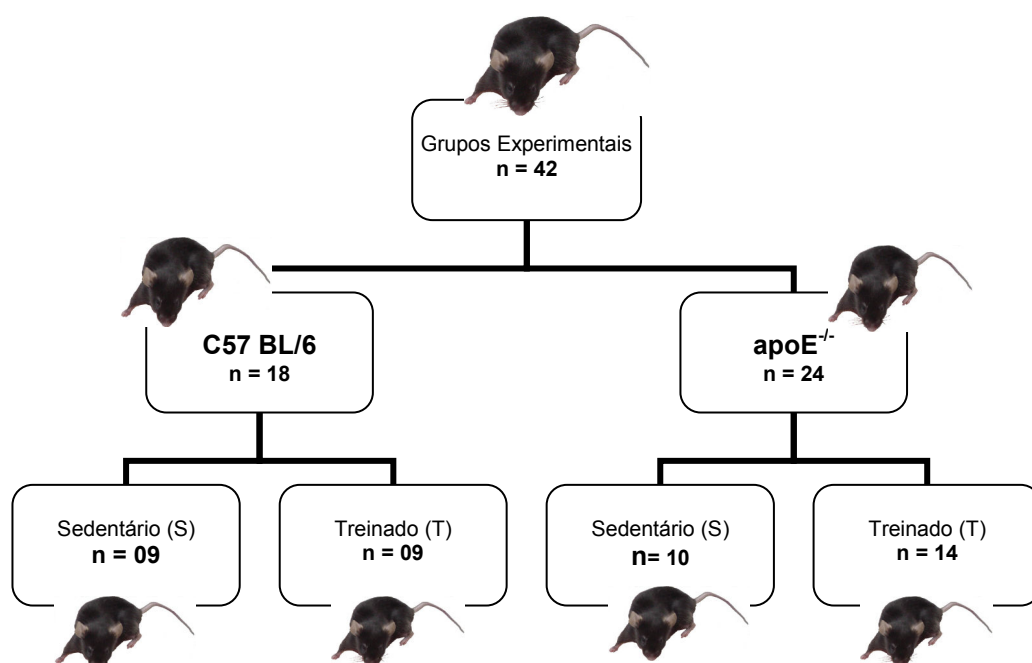
MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados camundongos isogênicos C57BL/6 e transgênicos *Knockout* para apolipoproteína E ($apoE^{-/-}$) machos adultos de 4 ½ meses de idade. Os animais eram provenientes de uma colônia de criação de responsabilidade do Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular (LTCC) do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas no Centro de Ciências da Saúde da UFES. Os animais recebiam água e ração (Labina[®]) *ad libitum*, e permaneciam em ambiente com controle de ciclo de 12 horas claro/escuro, bem como controle de temperatura ($22\pm 2^{\circ}C$) e umidade (70%). A utilização, manuseio e o protocolo experimental dos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais Experimentais (CEUA).

Para o protocolo experimental, os animais foram divididos aos 4 ½ meses de idade em quatro grupos experimentais (Organograma abaixo), sendo dois grupos submetidos a treinamento aeróbico e dois grupos sedentários, alocados em gaiolas individuais.



Organograma: O organograma dos grupos experimentais mostra a subdivisão dos grupos sedentários (S) e treinados (T) nas respectivas linhagens de camundongos.

3.2 PROTOCOLO DE TESTE MÁXIMO DE ESFORÇO

Os protocolos de teste de esforço máximo e programa de treino foram realizados em esteira ergométrica própria para roedores (Insight- figura 1) com 6 baias individuais, cujas dimensões de altura, largura e comprimento correspondem a 15x10x50cm, respectivamente.



Figura 1: Esteira Ergométrica

O protocolo de teste de esforço máximo foi realizado em três momentos distintos: previamente às sessões de treinamento, com o propósito de calcular a intensidade de esforço a ser realizado no treinamento; após a 3^a semana de treino, com o objetivo de redimensionar a intensidade de esforço; e ao fim de cinco semanas de treino para se medir o efeito do treinamento alcançado com o protocolo de treino. O teste foi iniciado com velocidade de 5 m/min e a cada 3 minutos havia um incremento de 2,5 m/min até a exaustão do animal. A angulação da esteira foi fixada em 5° e a velocidade máxima alcançada foi determinada pelo momento em que o animal passou a recusar a correr, independente do estímulo aversivo da placa de choque liberado pelo aparelho, permanecendo mais de 10 segundos consecutivos em contato com a placa (adaptado de DESAI *et al.* 1997).

3.3 PROTOCOLO DE TREINAMENTO AERÓBICO

O protocolo experimental está apresentado na figura 2.

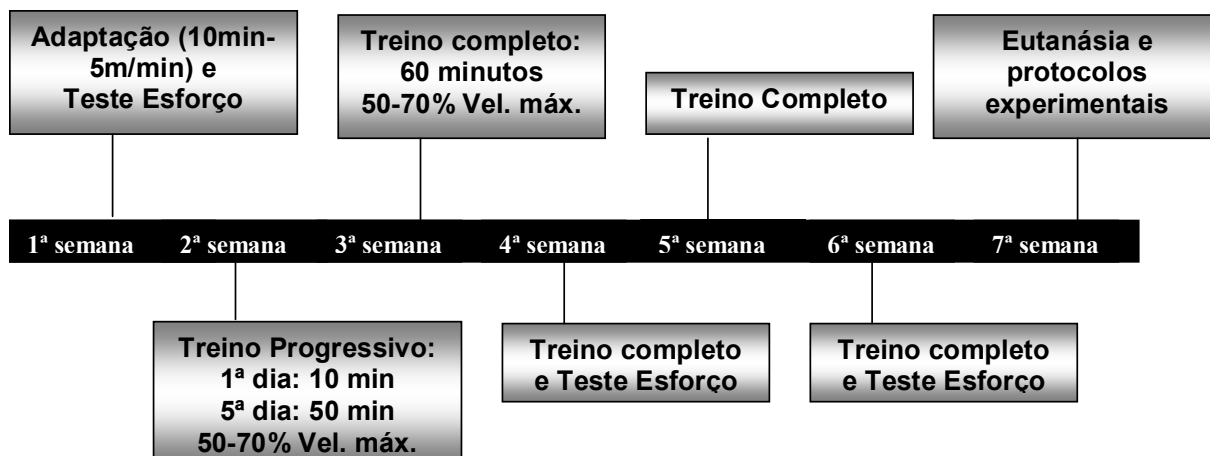


Figura 2: Seqüência temporal do protocolo de treinamento.

Inicialmente, todos os animais tiveram um período de adaptação ao ambiente da esteira ergométrica. Esse período correspondeu a quatro dias consecutivos, 10 minutos por dia em velocidade de 5m/min.

O protocolo de treinamento de corrida correspondeu a sessões de 60 minutos diários, 5 vezes por semana durante 5 semanas. Os treinos eram realizados preferencialmente por volta das 10h da manhã, horário que os animais se encontram mais propensos à atividade dentro da fase diurna do ciclo circadiano dos mesmos (LI *et al.*, 1999). O treino foi realizado em intensidade de 50 a 70% da velocidade máxima alcançada no teste de esforço previamente realizado, o que correspondeu a uma intensidade moderado-baixa (De ANGELIS *et al.*, 2004). Nos primeiros 5 minutos do treino a velocidade de corrida era incrementada de forma gradual até se chegar à velocidade desejada de treino.

A primeira semana de treino foi realizada de forma que no primeiro dia o tempo de corrida foi de 10 minutos de duração, e a cada sessão consecutiva esse tempo era acrescido em 10 minutos, finalizando no 5º dia com sessão de 50 minutos. As demais quatro semanas corresponderam a sessões de 60 minutos

diários de treinamento. Após a 3ª semana de treino, foi realizado novamente um teste de esforço máximo para redimensionar a carga de trabalho.

Foi utilizado como incentivo de corrida o contato do próprio pesquisador e uma espuma localizada atrás da esteira; com isso, evitando o contato dos animais com as barras de choque, com voltagem de 150 v e que emitem estímulos aversivos de no máximo 3 mA. Esses foram minimamente usados durante o período de aclimação e nos testes máximos (DESAI *et al.*, 1997).

O grupo controle, com exceção dos períodos de adaptação e dos testes de esforço inicial e final, permaneceu contido numa caixa de mesmas dimensões à da esteira ergométrica, próxima à mesma e no mesmo período do treinamento, promovendo, com isso, o mesmo ambiente de estudo dos animais de treino.

3.4 MEDIDAS HEMODINÂMICAS

Procedimento Cirúrgico

Ao fim do treinamento e do teste de esforço máximo pós-treino, os animais foram anestesiados com mistura de Ketamina (91 mg/kg) e Xilazina (9,1 mg/Kg), i.p para inserção de um cateter na artéria carótida para realização de medidas de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). Com o auxílio de uma lupa cirúrgica (Opto Eletrônica S/A, modelo 2002, Brasil), a artéria carótida direita foi separada do tecido conectivo e inserida um cateter de microrrenathane 040.D x 025l.D esticada por aquecimento para redução do lúmem (Braintree Scientific, USA). O cateter foi preenchido com solução salina a 0,9% heparinizada e ocluído com pino de metal.

Protocolo Experimental

Após 48 h do procedimento cirúrgico, o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão ligado a um sistema de aquisição de dados (BIOPAC Systems, USA) para medida de PAM e FC no animal acordado.

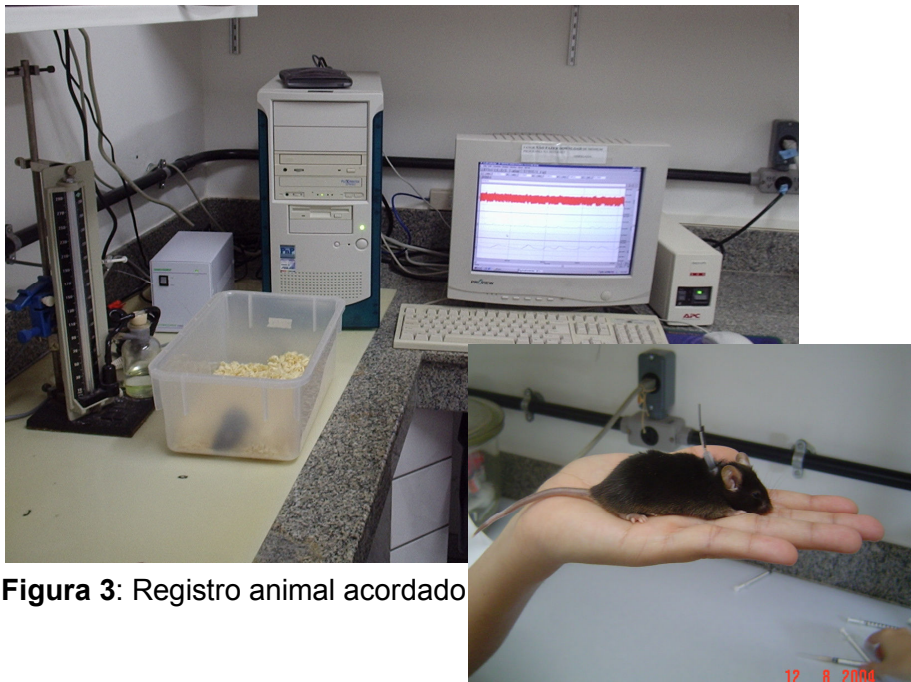


Figura 3: Registro animal acordado

3.5 ANÁLISE DE SENESCÊNCIA VASCULAR

Após a realização das medidas hemodinâmicas, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (100mg/Kg, ip), e posteriormente realizada uma incisão torácica de forma a expor o coração para a retirada de sangue e realização da perfusão tecidual. Para execução da perfusão fez-se uma incisão no átrio direito e em seqüência infundiu-se 40 ml de salina tampão fosfato (PBS: 0,1 M; pH 7,4) no ventrículo esquerdo, seguido de 20 ml de formaldeído (4%). Ao término da perfusão, o coração, a árvore aórtica, e seio carotídeo foram removidos cuidadosamente e armazenados em recipientes contendo formaldeído a 4% até o momento da preparação dos tecidos (NOGUEIRA *et al.*, 2007).

O arco aórtico foi, então, aberto longitudinalmente, com o auxílio de uma lupa cirúrgica (Opto Eletrônica S/A, modelo 2002, Brasil) e fixado em placas de E.V.A. com cliques de aço (produzidos artesanalmente), de forma a expor a parte íntima do vaso, permitindo o contato com a solução X-gal.

A solução X-gal, pH 6.0 (SA β -gal) consistiu de: 150mM de NaCl, 2mM de MgCl₂, 5mM de K₃, 5mM de K₄, 40mM de Ácido Cítrico, 12mM de Na₂HPO₄, 1mg/mL X-gal (IKUSHIMA *et al.*, 2006), preparada imediatamente ao procedimento. Os vasos, previamente preparados, foram então incubados, em estufa a 37° C, na

solução por tempo médio de 18 horas. Em seguida, os vasos foram lavados por duas vezes em PBS, e foram feitas capturas das imagens com câmera digital Cannon Rebel XTI, 10.1 *megapixels*, com auxílio de um tripé, para posterior análise. Foi utilizado o *software* de análise de imagem *Image J* que determinou a área corada (coloração azul) da área senescente ao longo da aorta até a região próxima das artérias renais.

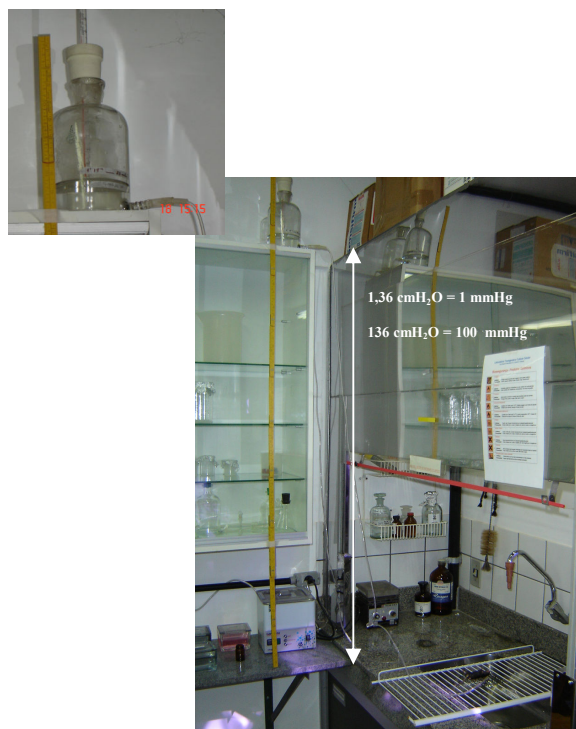


Figura 4: Sistema de perfusão sob pressão controlada de acordo com a variação da altura da coluna hidrostática (1,36 cm H₂O = 1 mmHg). No alto vemos em maior detalhe o frasco de Mariotti.

3.6 ANÁLISE DE LESÃO ATEROSCLERÓTICA

Após o protocolo da senescência vascular, as amostras foram coradas com *Oil-red* para verificação de presença de lipídios no vaso, e então feita capturas das imagens e quantificação da área corada do arco aórtico pelo *software* de análise de imagem *Image J*

3.7 MEDIDA DE COLESTEROL PLASMÁTICO E TRIGLICÉRIDES

Ao término do protocolo experimental, o sangue do animal foi coletado pelo plexo orbital ou por sangria do átrio direito, em *eppendorf* heparinizado, centrifugado em 4000 rpm por 10 minutos e o plasma congelado para posterior análise de colesterol e triglicérides total pelo Kit Bioclin (MG, Brasil).

3.8 MEDIDA DE PESO VENTRICULAR

Após a remoção do arco aórtico para a análise da senescência, o coração foi então limpo e removido os átrios e pesado somente os ventrículos úmido e seco, e corrigido pelo peso corporal.

3.9 MEDIDA DE PESO CORPORAL E CONTROLE ALIMENTAR

Foi realizado semanalmente um acompanhamento de peso corporal e consumo médio de ração e água ao longo de todo o protocolo de treinamento. Os animais eram pesados em balança (OHAUS, capacidade 310g) no último dia de cada semana, antes da sessão de treino. As medidas de ingestão de ração e água eram realizadas 3 vezes por semana, e posteriormente feita uma média de consumo diário.

4.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos com média \pm EPM. Para análise estatística, foi usada ANOVA de 2 vias, seguida do *post hoc* de Fisher, com * $p < 0,05$ vs apoE S e # $p < 0,05$ vs C57.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 DADOS PONDERAIS E CONSUMO DE RAÇÃO E ÁGUA

A tabela 1 apresenta os valores de peso corporal antes (Pré-treino) e depois (Pós-treino) do protocolo de treinamento, peso ventricular seco e razão peso corporal/ventricular, além da média de consumo diário de ração e água.

Como observado, o peso corporal dos animais não foi diferente entre os quatro grupos, tanto no início quanto ao fim do protocolo de estudo; e não houve diferença no peso seco dos ventrículos e nem na razão deste pelo peso corporal nos animais treinados comparados aos controles sedentários, provavelmente pelo protocolo utilizado ter sido de exercício moderado.

A média diária de consumo de ração e água também foi similar entre os grupos, não sendo influenciado pelo programa de treinamento.

Grupo	Peso Corporal (g)		Peso Ventricular (mg)	Peso Ventricular/ peso corporal (mg /kg)	Consumo de Ração (g/dia)	Consumo de Água (ml/dia)
	Pré-treino	Pós Treino				
C57 S	31,4 ± 0,6 (n=12)	29,7 ± 0,6 (n=12)	29,4 ± 1,3 (n=10)	0,98 ± 0,04 (n=10)	3,6 ± 0,1 (n=6)	8,4 ± 0,4 (n=6)
C57 T	30,5 ± 0,7 (n=13)	29,5 ± 0,5 (n=13)	27,4 ± 0,8 (n=10)	0,93 ± 0,03 (n= 10)	3,6 ± 0,2 (n=7)	9,0 ± 0,2 (n=7)
apoE S	30,7 ± 0,5 (n=12)	29,7 ± 0,4 (n=12)	28,3 ± 1,0 (n= 9)	0,96 ± 0,03 (n=9)	3,9 ± 0,3 (n=7)	8,8 ± 0,3 (n=7)
apoE T	29,9 ± 0,4 (n=17)	29,6 ± 0,2 (n=17)	28,5 ± 1,3 (n= 12)	0,95 ± 0,04 (n=12)	3,9 ± 0,2 (n=10)	8,5 ± 0,2 (n=10)

Tabela 1: Médias do peso corporal, peso ventricular, razão peso ventricular/peso corporal, consumo de água e ração dos animais apoE^{-/-} e C57 sedentários e treinados. Os valores estão expressos como média ± EPM.

4.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMODINÂMICOS

Os animais ateroscleróticos apresentaram níveis plasmáticos de colesterol total significativamente superior aos animais C57, confirmando a validade do modelo experimental. Os níveis de triglicérides estão aumentados nos animais apoE^{-/-} e o exercício físico os reduziu para valores próximos dos animais controles.

Os níveis de FC e PAM também não foram diferentes entre os grupos, e o protocolo de treino realizado não influenciou esses parâmetros, mantendo valores similares nos quatro grupos.

Parâmetro	C57 S	C57 T	apoE S	apoE T
CT	161 ± 16 (n=4)	102 ± 12 (n=7)	646 ± 75### (n=4)	664 ± 66### (n=8)
TG	52 ± 9 (n=4)	69 ± 10 (n=7)	143 ± 5### (n=4)	86 ± 12** (n=8)
PAM	107 ± 3 (n=3)	114 ± 2 (n=6)	109 ± 3 (n=5)	102 ± 4 (n=5)
FC	503 ± 3 (n=3)	543 ± 18 (n=6)	617 ± 33 (n=5)	628 ± 47 (n=5)

** p < 0,01 vs apoE S

p < 0,01 vs C57 S e T

Tabela 2: Medidas de colesterol total (CT), triglicérides (TG), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) dos animais C57 e apoE^{-/-} sedentários e treinados. Os valores estão expressos como média ± EPM.

4.3 VELOCIDADE MÁXIMA ALCANÇADA PELOS ANIMAIS NO TESTE DE ESFORÇO ANTES E APÓS O PERÍODO DE TREINAMENTO

A velocidade máxima alcançada, pelos animais de 4 ½ meses de idade, no teste de esforço antes do período de treinamento (pré-treino) foi similar entre os dois grupos, com valores de 27 ± 2 m/min e 25 ± 1m/min para os animais C57 sedentários (S) e treinados (T), respectivamente; e 29 ± 1 m/min e 26 ± 1 m/min, para os animais apoE^{-/-} S e T, respectivamente.

Após as sessões de treinamento, a velocidade máxima alcançada (pós-treino) pelos animais foi significativamente aumentada nos animais submetidos ao treinamento aeróbico comparado com o grupo controle. Os animais C57 alcançaram velocidade de 27 ± 1,0 m/min e 34 ± 1,7 m/min nos grupos sedentários e treinados, respectivamente; e os animais apoE^{-/-} alcançaram velocidade de 29 ± 1,2 m/min e 37 ± 1 m/min nos grupos sedentários e treinados, respectivamente; com ganhos percentuais de 36 e 42% para o grupo C57 e apoE^{-/-} treinados, respectivamente.

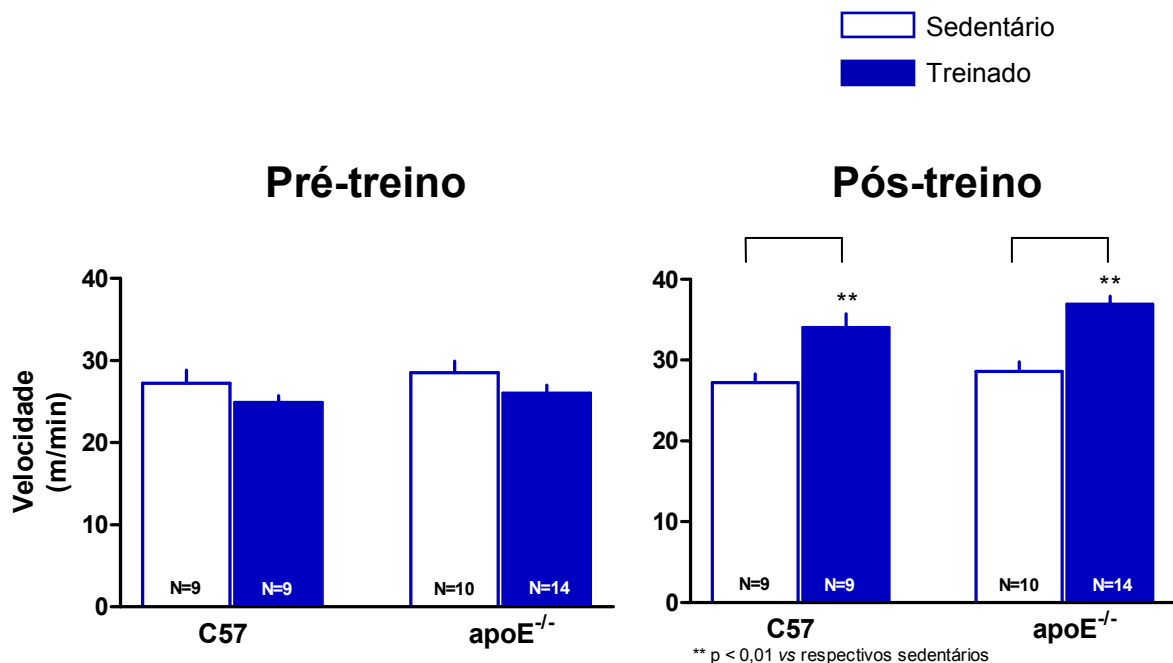


Figura 5: Valores de velocidade (m/min) máxima alcançada no teste de esforço antes (pré-treino) e após (pós-treino) o período de treinamento, de camundongos C57 e apoE^{-/-} sedentários e treinados. Os valores indicam média ± EPM.

4.4 DISTÂNCIA MÁXIMA ALCANÇADA PELOS ANIMAIS NO TESTE DE ESFORÇO ANTES E APÓS O PERÍODO DE TREINAMENTO

Assim como a velocidade, a distância máxima percorrida pelos animais no teste de esforço antes do período de treinamento (pré-treino) foi similar entre os grupos, com valores de 455 ± 47 m e 391 ± 19 m para os animais C57 S e T, respectivamente; e 515 ± 43 m e 429 ± 31 m para os animais apoE^{-/-} S e T, respectivamente.

Com o treinamento, a distância máxima percorrida pelos animais também foi aumentada nos grupos treinados, com valores de 448 ± 32 m e 689 ± 67 m para os animais C57 sedentários e treinados, respectivamente; e valores de 493 ± 40 m e 786 ± 33 m para os animais apoE^{-/-} sedentários e treinados, respectivamente.

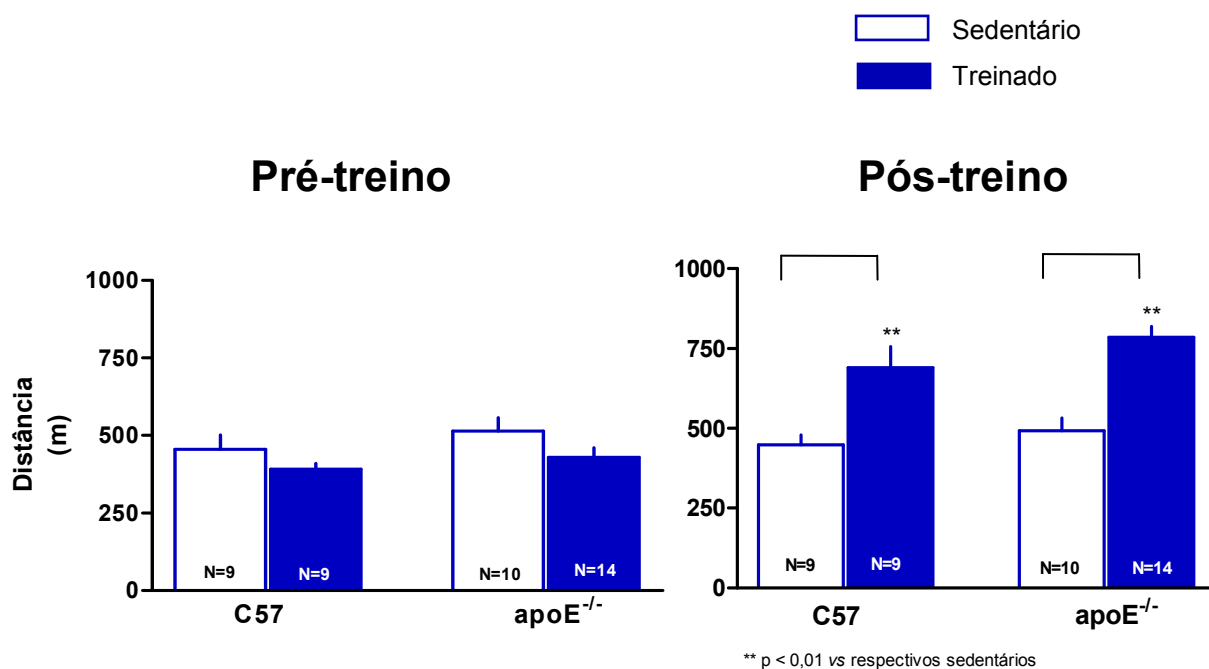


Figura 6: Valores de distância (m) máxima alcançada no teste de esforço antes (pré-treino) e após (pós-treino) o período de treinamento, de camundongos C57 e apoE^{-/-} sedentários e treinados. Os valores indicam média ± EPM.

Esses resultados demonstram que os animais apoE^{-/-} machos de 4 ½ de idade, antes do protocolo de treinamento, apresentaram a mesma capacidade de corrida dos animais C57; e que o incremento de *performance* física obtida pelos animais treinados C57 e apoE^{-/-} foi similar, com ganho percentual na velocidade máxima (36 e 42% para os animais C57 e apoE^{-/-}, respectivamente) e distância máxima (75 e 90% para os animais C57 e apoE^{-/-}, respectivamente) alcançados no teste de esforço pós-treino.

Interessante observar que além do condicionamento físico inicial ser similar entre os animais C57 e apoE^{-/-}, o treinamento foi eficaz em ambos os grupos, com um aproveitamento até maior dos animais apoE^{-/-}, demonstrando a boa treinabilidade dos animais ateroscleróticos comparado aos controles.

4.5 ÁREA DE LESÃO ATEROSCLERÓTICA

A área de lesão placa aterosclerótica foi estatisticamente superior nos animais apoE^{-/-} comparados com os animais controle C57 (apoE^{-/-} sedentário : 4,5

$\pm 0,5$ e treinado: $5,1 \pm 0,7$ x C57 sedentário: $1,3 \pm 0,2$ e treinado: $1,8 \pm 0,3$); confirmando o modelo experimental de aterosclerose. No entanto, o programa de treinamento utilizado não reduziu a área de lesão aterosclerótica dos animais treinados.

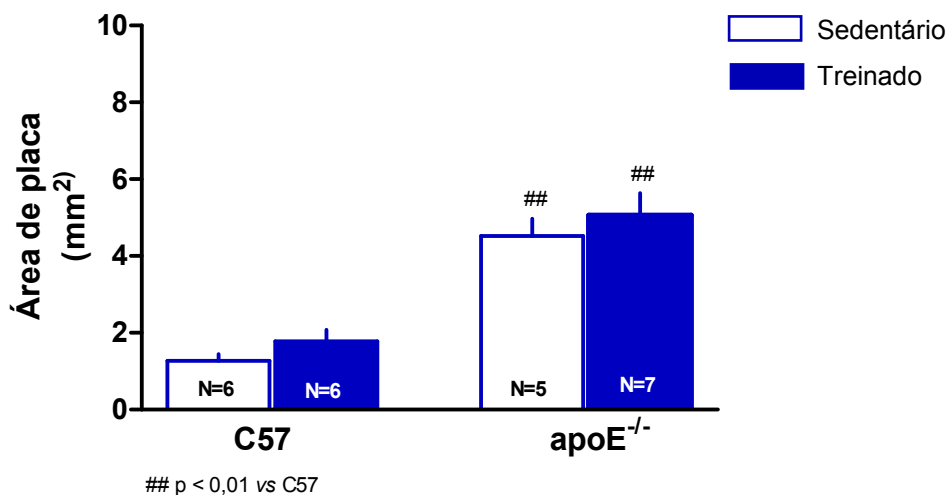


Figura 7: Área de lesão de placa aterosclerótica no arco aórtico de animais C57 e apoE^{-/-} sedentários e treinados. Valores expressos como média \pm EPM.

4.6 ANÁLISE DE SENESCÊNCIA VASCULAR

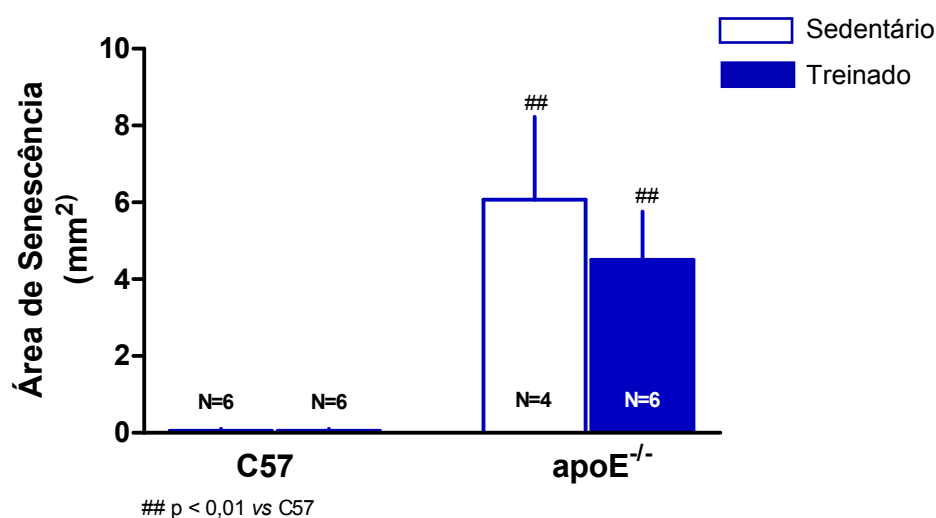


Figura 8: Área de coloração SA β -gal da artéria aorta de camundongos apoE^{-/-} e C57 sedentários e treinados. Valores expressos como média \pm EPM.

Assim como a área de placa presente nos animais apoE^{-/-}, a área de senescência celular na artéria aorta foi significativamente maior comparado com os animais C57 (apoE sedentário: 4,9 ± 2,1 e treinado: 3,9 ± 1,2 x C57 sedentário: 0 ± 0 e treinado: 0,05 ± 0,05), sendo mais evidenciada a área de senescência no arco aórtico, coincidentemente o local de maior incidência de lesão aterosclerótica (fig. 7) encontrada em animais apoE^{-/-} de 6 meses de idade.

O programa de treinamento utilizado no presente estudo não reduziu a área de senescência vascular nos animais apoE^{-/-} treinados, embora possamos observar uma tendência de redução.

4.7 FOTOS REPRESENTATIVAS DAS ÁREAS DE SENESCÊNCIA E LESÃO ATEROSCLERÓTICA

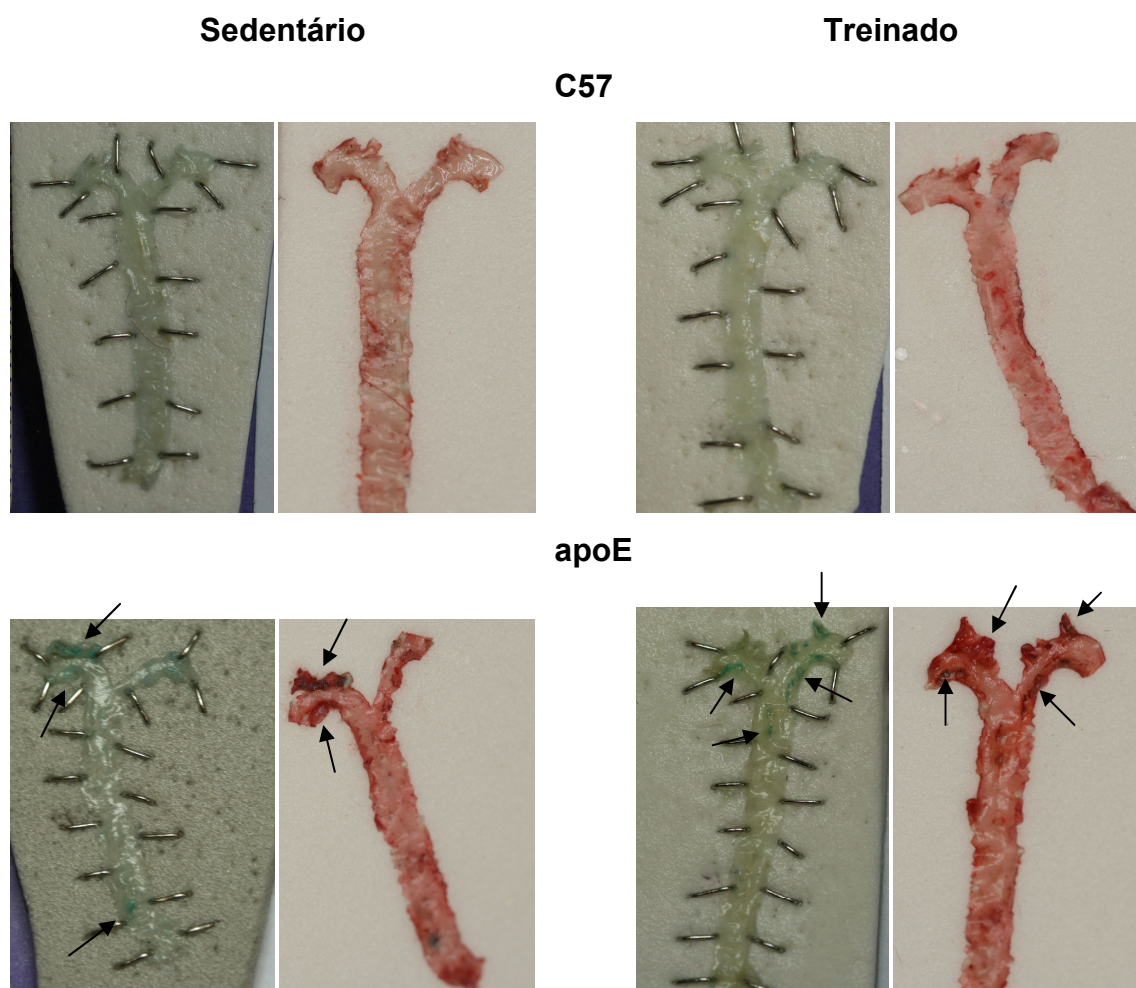


Figura 9: Fotos representativas de senescência vascular e lesão aterosclerótica de animais C57 e apoE^{-/-} sedentários e treinados.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Os principais resultados deste trabalho são: a) os animais apoE^{-/-} apresentaram senescência celular na artéria aorta, coincidentemente na área de lesão aterosclerótica; b) o programa de treino utilizado não alterou a área de senescência vascular assim como não reduziu a área de lesão aterosclerótica, no entanto, observou-se uma tendência de redução de senescência vascular c) os animais apoE^{-/-} apresentaram a mesma capacidade de corrida dos animais C57 aos 4 ½ meses de idade; d) os camundongos apoE^{-/-} tiveram o mesmo ganho de capacidade física com o treinamento na esteira que os animais C57, enfatizando a boa treinabilidade dos animais ateroscleróticos.

Apesar de inúmeros estudos histológicos de lesões ateroscleróticas de seres humanos terem mostrado a presença de células vasculares com características morfológicas de células senescentes (GORGOULIS *et al.*, 2005; MINAMINO *et al.*, 2002; MINAMINO *et al.*, 2007), estudos utilizando animais ateroscleróticos, como o camundongo apoE^{-/-}, ainda são escassos na literatura.

Os resultados aqui apresentados confirmam a presença de senescência em células vasculares de camundongos apoE^{-/-} de 6 meses de idade (KUNIEDA *et al.*, 2006), concomitante com a presença de lesão aterosclerótica. Como observado nas fotos ilustrativas (fig.9), tanto a área de senescência quanto a de lesão aterosclerótica se apresentam preferencialmente na região do arco aórtico, embora possamos também observá-las na bifurcação da artéria renal, locais esses de fluxo sanguíneo alterado.

A localização da senescência em sítios preferenciais de lesão aterosclerótica já é bem demonstrada na literatura. Parece que o número de replicações celulares que ocorre na parede do vaso não está somente relacionado com a idade cronológica do tecido, mas também com o estresse bioquímico e hemodinâmico da árvore arterial (ERUSALIMSKY & KURZ, 2005), de forma que os fatores que participam no desenvolvimento da aterosclerose parecem estar envolvidos com o desenvolvimento da senescência.

Trabalhos demonstram que tanto células musculares lisas (MATTHEWS *et al.*, 2006; KUNIEDA *et al.*, 2006) quanto células endoteliais (MINAMINO *et al.*, 2002) de áreas de lesão aterosclerótica de tecidos humanos apresentam características morfológicas e expressam genes relacionados com a senescência,

demonstrando o envolvimento da mesma no desenvolvimento e progressão da doença. Embora não verificamos o tipo de tecido envolvido na senescência vascular encontrada nos animais apoE^{-/-}, células endoteliais senescentes são freqüentemente encontradas em superfícies de placa aterosclerótica, enquanto que células musculares lisas com características senescentes são geralmente detectadas na íntima de lesões mais avançadas (MINAMINO *et al.*, 2004).

De acordo com o curso temporal do desenvolvimento das lesões nos animais apoE^{-/-}, a partir de 20 semanas de idade pode-se observar início de formação de lesões fibróticas ricas em células musculares lisas (NAKASHIMA *et al.*, 1994; JAWIËN *et al.*, 2004), o que nos permite pensar que as células senescentes encontradas no presente estudo possam ser tanto células endoteliais quanto células de músculo liso vascular. Trabalho já realizado com camundongos apoE^{-/-} de 6 meses de idade mostrou que a maioria das células senescentes, detectada pela maior atividade enzimática da SA β -gal, eram células de músculo liso vascular de áreas de lesão aterosclerótica, embora não descartam a possibilidade de também serem células endoteliais (KUNIEDA *et al.*, 2006).

O endotélio vascular geralmente tem reduzida capacidade replicativa, no entanto, estudos em animais experimentais mostram que em locais de transição vascular, como bifurcações e ramificações vasculares, há aumento da replicação celular, provavelmente no intuito de manter a integridade do vaso (ERUSALIMSKY & KURZ, 2005). Estudo com modelo de desendotelização de artérias carótidas de coelho mostrou que a resposta proliferativa decorrente da injúria intraluminal leva a um acúmulo marcante de células endoteliais e musculares lisas senescentes, fornecendo uma provável implicação deste fenômeno nas fisiopatologias vasculares, como a aterosclerose (FENTON *et al.*, 2001).

Além do mais, o endotélio está constantemente exposto a uma variada sobrecarga oxidativa, proveniente de metabólitos de macrófagos ativos, lipoproteínas modificadas e espécies reativas de oxigênio produzidas no próprio vaso, que podem acelerar o processo de senescência (ERUSALIMSKY & KURZ, 2005), assim como determinar o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas. Apesar de não ter sido determinado o nível de estresse oxidativo no tecido estudado, trabalhos com animais apoE^{-/-} mostram elevados níveis de estresse oxidativo e disfunção endotelial na região do arco aórtico, o que nos permite inferir a sua participação no desenvolvimento da senescência e aterosclerose

encontrados no presente estudo (NIEBAUER *et al.*, 1999; PELLEGRIN *et al.*, 2007; OKABE *et al.*, 2007).

Dados indicam uma ligação entre o estresse oxidativo e redução do telômero em células vasculares (MINAMINO *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2000), assim como manifestação da atividade SA β -gal (MINAMINO *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2000). A homocisteína, um dos fatores de risco para aterosclerose (ROSS R. 1999), aumenta o índice de encurtamento do telômero e acelera a senescência endotelial (XU *et al.*, 2000), assim como já foi mostrado que o LDL oxidado inativa a atividade da telomerase em células endoteliais (BREITSCHOPF *et al.*, 2001).

De fato, estudos recentes têm demonstrado mecanismos dependentes de espécies reativas de oxigênio (ROS) no desenvolvimento da senescência de células endoteliais (HAENDELER *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2000), sendo inibida, contudo, quando tratada essas células com óxido nítrico (HAYASHI *et al.*, 2006) e antioxidantes como a catalase (XU *et al.*, 2000). Do mesmo modo, o desenvolvimento da aterosclerose parece compartilhar dos mesmos mecanismos desencadeadores do processo de senescência induzida por estresse (HARRINSON *et al.*, 2003; HAYASHI *et al.*, 2006); e apesar de não estar claro que função o envelhecimento celular tem no processo de desenvolvimento da aterosclerose, parece que o mesmo participa do desenvolvimento da doença, pois esta aumenta com o avançar da idade (XU *et al.*, 2000).

Considerando a interação do *status* oxidativo no processo de senescência e aterosclerose, e conhecendo-se a importância da prática da atividade física na prevenção e tratamento das doenças cardiovasculares e aterosclerose (SHEPHARD & BALADY, 1999; THOMSON *et al.*, 2003), este trabalho teve o intuito de determinar a capacidade física dos animais apoE^{-/-} e verificar se a realização de exercícios aeróbios em esteira ergométrica era capaz de interferir na homeostasia vascular e no desenvolvimento da doença.

A princípio, a capacidade física dos animais apoE^{-/-} não foi diferente dos animais controles aos 4 ½ meses de idade, o que diverge de estudos já realizados em camundongos apoE^{-/-} fêmeas em que mostraram significativa redução de capacidade de corrida em animais acima de 2 meses de idade (MAXWELL *et al.*, 2001). Dois fatores podem estar influenciando essa diferença: primeiramente, o protocolo de esforço utilizado para avaliar a capacidade de corrida foi ligeiramente

diferente, uma vez que os autores utilizaram uma angulação maior na esteira ergométrica com incremento na velocidade de 1m/min, e segundo que o nível de colesterol plasmático dos animais apoE^{-/-} fêmeas é surpreendentemente superior aos valores encontrados em animais machos sem dieta hipercolesterolêmica, como observado no presente estudo e na literatura em geral (NOGUEIRA *et al.*, 2007; PYNN *et al.*, 2004).

Após o treinamento de 5 semanas, tanto os animais C57 quanto os apoE^{-/-} treinados apresentaram uma melhora na capacidade de corrida comparado aos respectivos sedentários (NIEBAUER *et al.*, 2003; NIEBAUER *et al.*, 1999; De ANGELIS *et al.*, 2004), confirmando a eficiência do protocolo de treino. Interessante notar que o ganho apresentado pelo grupo apoE^{-/-} foi similar ao do grupo C57 (NIEBAUER *et al.*, 1999), mostrando que os animais ateroscleróticos responderam tão bem ao programa de treinamento quanto os animais controles.

A velocidade e a distância máxima alcançada em teste de esforço vêm sendo bastante utilizadas como medidas indiretas da avaliação da capacidade física de animais experimentais (De ANGELIS *et al.*, 2004; MAXWELL *et al.*, 1998; NIEBAUER *et al.*, 1999). Além de ser de mais fácil acesso, apresenta uma boa associação com a medida do consumo máximo de oxigênio em camundongos (FERREIRA *et al.*, 2007; SCHEFER & TALAN, 1996), assim como há uma boa correlação ($r= 0.809$) entre a capacidade de corrida com níveis de citrato sintase (NIEBAUER *et al.*, 1999), indicador esse diretamente relacionado com a capacidade oxidativa muscular (PELLEGRIN *et al.*, 2007; EVANGELISTA *et al.*, 2003).

A bradicardia de repouso e a hipertrofia cardíaca também são indicadores utilizados na avaliação de condicionamento físico de animais experimentais (PELLEGRIN *et al.*, 2007; EVANGELISTA *et al.*, 2003; De ANGELIS *et al.* 2004; KAPLAN *et al.*, 1994). O presente estudo, contudo, não pôde verificar alteração desses parâmetros nos animais ateroscleróticos e controles exercitados (SHIMADA *et al.*, 2007; OKABE *et al.*, 2007; NIEBAUER *et al.*, 1999; NIEBAUER *et al.*, 2003), apesar de se ter observado uma boa treinabilidade desses animais pelo aumento da distância percorrida no teste de esforço.

Dados na literatura são controversos em relação à hipertrofia cardíaca em camundongos, pois este parâmetro depende fortemente do tipo de exercício utilizado, duração e intensidade do treino. Geralmente trabalhos com natação são

mais indicados em induzir hipertrofia cardíaca, principalmente em regimes de treino de maior duração (EVANGELISTA *et al.*, 2003; PELLEGRIN *et al.*, 2007), apesar de existirem trabalhos com natação que não mostrem o mesmo resultado (OKABE *et al.*, 2007; SHIMADA *et al.*, 2007).

A ausência de bradicardia, contudo, nos leva a questionar se a intensidade e o tempo de treino realizado no estudo não foram suficientes em promover adaptações ao nível de sistema nervoso autônomo. Embora programa similar de treino, em animais C57, tenha mostrado redução de FC após 4 semanas de treino (De ANGELIS *et al.*, 2004), a velocidade máxima de treino utilizada por eles foi relativamente superior ao do presente estudo (15-21 m/min) o que correspondeu a 50-70% da velocidade máxima de corrida do teste de esforço. Ao contrário, os animais do presente estudo treinaram no limite inferior da intensidade proposta (14-17 m/min), o que correspondeu a aproximadamente 50-60% da velocidade máxima alcançada nos testes de esforço. No entanto, vale ressaltar que evitamos, ao máximo, o uso da placa de choque como estímulo de corrida, respeitando a progressão natural do condicionamento físico dos animais, o que nos permite afirmar que os animais exercitados no presente estudo realizaram trabalhos dentro do padrão de treinamento desejado.

Recente trabalho publicado com camundongos C57 mostrou bradicardia de repouso e melhora na capacidade física nos animais exercitados com treinamento aeróbico de 8 semanas em esteira ergométrica, em velocidade de 15 a 19 m/min, representando 60% da velocidade máxima alcançada no teste de esforço, (FERREIRA *et al.*, 2007). Apesar da intensidade de treino e a melhora do condicionamento físico dos animais terem sido similares ao presente trabalho, a duração do protocolo por eles utilizado foi relativamente quase o dobro e o método de medida de FC foi indireto, realizado por plestimografia, o que pode ter influenciado na divergência dos resultados. Espera-se que com um protocolo mais longo de treino, as respostas bradicárdicas possam aparecer, mesmo com intensidades mais baixas de treino. Do mais, não podemos desconsiderar que a intensidade de treino realizado no presente estudo não promoveu respostas adaptativas ao nível vascular, pois trabalhos tanto em humanos quanto em animais experimentais mostram que tão logo se inicia um programa de treinamento físico leve-moderado observa-se modificações no funcionamento vascular.

Vale lembrar que as respostas fisiológicas induzidas com treino de natação não são necessariamente observadas em outros tipos de exercício como a esteira ergométrica, devido ao efeito da pressão da água, utilização de diferentes músculos e redução do efeito da gravidade (PELLEGRIN *et al.*, 2007).

O uso da esteira ergométrica no presente estudo justifica-se por ser um modelo padrão de indução controlada de estresse em humanos e animais experimentais, que permite a manipulação, controle e uniformidade da intensidade de treino, além da possibilidade de realização de um teste de esforço. A maior desvantagem, contudo, é a dificuldade de estimulação de corrida dos animais, sendo, geralmente utilizado placas de choques como estímulo aversivo (BERNSTEIN, 2003; Resource book for the design of animal exercise protocol, 2006). No entanto, evitou-se o uso do mesmo no presente estudo, utilizando-se espumas protetoras que impediam o contato constante do animal com a placa de choque, evitando, com isso, um estresse diário para os animais.

O protocolo de treino utilizado não alterou o peso corporal dos animais exercitados (De ANGELIS *et al.*, 2004; NIEBAUER *et al.*, 1999; OKABE *et al.*, 2007; PYNN *et al.*, 2004), assim como os mesmos não alteraram o consumo alimentar nem a ingestão de água ao longo do experimento, comparados aos animais sedentários. Apesar de o treinamento físico aumentar o gasto energético dos animais, o protocolo de treino utilizado foi de baixo-moderada intensidade e os animais não apresentavam perfil de obesidade, de forma que não esperávamos redução significativa desses parâmetros. Do mesmo modo o consumo alimentar e ingestão de água não foi diferente entre os animais C57 e apoE^{-/-} (WOOLLETT *et al.*, 1995).

Como esperado os animais apoE^{-/-} apresentaram níveis elevados de colesterol plasmático (NOGUEIRA *et al.*, 2007; JAWIËN *et al.*, 2004; MEIR & LEITERSDORF, 2004; NAKASHIMA *et al.*, 1994), o que condiz com o modelo experimental; e também níveis elevados de triglicérides (JAWIËN *et al.*, 2004; PLUMP *et al.*, 1992; REDDICK *et al.*, 1994), embora alguns estudos não demonstrem aumento destes nesses animais (PYNN *et al.*, 2004; MAZZOLAI *et al.*, 2006). Treinamento físico em camundongos apoE^{-/-} geralmente não altera os níveis de colesterol plasmático, assim como observado no presente estudo (PELLEGRIN *et al.*, 2007; OKABE *et al.*, 2007; SHIMADA *et al.*, 2007; PYNN *et al.*, 2004; YOUNG *et al.*, 2004), no entanto, o protocolo de treino reduziu significativamente

os triglicérides dos animais apoE^{-/-}, normalizando-os para valores similares aos animais controles.

Trabalhos em humanos demonstram melhora no perfil lipídico, independente de alteração de peso corporal (HALVERSTADT *et al.*, 2007) e em associação a outras intervenções como dieta (VARADY & JONES, 2005; LEON & SANCHES, 2001), sendo capaz de aumentar os níveis de colesterol HDL, e reduzir colesterol total, LDL e TG. No entanto, algumas controvérsias existem em relação ao poder da atividade física aeróbia na modificação do perfil lipídico. Dados de meta-análises com variados tipos de populações divergem entre si, no entanto reafirmam que apesar de variados resultados em relação a alterações do perfil lipídico com a atividade física, os benefícios promovidos pela mesma vão além dessas alterações (KELLEY *et al.*, 2004; KELLEY *et al.*, 2005; KELLEY & KELLEY, 2007).

Parece que em camundongos ateroscleróticos os benefícios promovidos pela atividade física são independentes das alterações lipídicas, embora se tenha observado redução nos triglicérides dos animais apoE^{-/-} treinados. Redução da atividade inflamatória, melhora na função endotelial, aumento da atividade antioxidante, aumento da biodisponibilidade do óxido nítrico e aumento da limpeza (*scavange*) de ânion superóxido são alterações induzidas pelo treinamento aeróbio, que favorece a homeostasia vascular de animais ateroscleróticos (PYNN *et al.*, 2004; PELLEGRIN *et al.*, 2007; NIEBAUER *et al.*, 1999; SHIMADA *et al.*, 2007; NIEBAUER *et al.*, 2003; IGNARRO *et al.*, 2006; NAPOLI *et al.*, 2004).

O programa de treino realizado no presente estudo não alterou a área de lesão aterosclerótica nos animais ateroscleróticos (NIEBAUER *et al.*, 2003; OKABE *et al.*, 2007), mas observou-se uma tendência de redução da senescência da artéria aorta do animal exercitado.

Geralmente os estudos que demonstram redução de área de lesão em animais ateroscleróticos utilizam, preferencialmente, a natação por período mais longo e freqüente de treino; além de utilizarem conjuntamente dieta aterogênica (SHIMADA *et al.*, 2007; OKABE *et al.*, 2007; PELLEGRIN *et al.*, 2007; NAPOLI *et al.*, 2004; NAPOLI *et al.*, 2006; MEILHAC *et al.*, 2001). De fato, Okabe e colaboradores mostraram redução de placa de camundongos apoE^{-/-} exercitados somente no grupo com dieta colesterolêmica com protocolo de natação por 16 semanas, enquanto que os animais sem dieta não tiveram redução de lesão com mesmo protocolo de treino (OKABE *et al.*, 2007).

Parece que a influência do exercício físico na redução da placa aterosclerótica de camundongos depende, de alguma forma, da dieta aterogênica; possivelmente pela mesma acelerar o processo de formação da lesão, permitindo, com isso, verificar os efeitos do treinamento no desenvolvimento da lesão. Isso nos leva a pensar que se o treino fosse realizado por um período bem mais longo de vida dos animais, provavelmente veríamos reduções de área de lesão na ausência de dieta. Estudos com pacientes ateroscleróticos coronarianos demonstram a necessidade de programas de treino mais longo, de 4 a 6 anos, para que se possa observar influência do mesmo em alterações anatômicas, como angiogênese e redução de lesões; embora não se deva esquecer que os benefícios do exercício físico se apresentam tão logo se inicia o programa de treino. (GIELEN *et al.*, 2001).

Evidências demonstram que quatro semanas de treino moderado em indivíduos hipercolesterolêmicos é capaz de aumentar a produção basal de NO, sem, no entanto, alterar o perfil lipídico; modulado, possivelmente, pelo aumento do fluxo sanguíneo e aumento do estresse de cisalhamento durante a realização do exercício (LEWIS *et al.*, 1999). De fato, estudos em humanos mostram que o exercício físico aumenta a perfusão miocárdica pelo aumento da expressão da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e superóxido dismutase extra-celular (ecSOD), o que atenua a degradação prematura do NO pelos radicais livres, favorecendo a homeostasia vascular tão logo se inicia um programa de treino (GIELEN *et al.*, 2001; NEGÃO & BARRETO, 2007).

Adaptações similares são encontradas em estudos com camundongos submetidos a programas de treinamento aeróbio, em que apesar de não se observar reduções de área de placa, se observa melhoras na função endotelial, redução da atividade inflamatória, aumento da expressão e atividade da eNOS, aumento de enzimas antioxidantes, com conseqüente aumento da disponibilidade do NO (MEILHAC *et al.*, 2001; OKABE *et al.*, 2007; NIEBAUER *et al.*, 2003; MAXWELL *et al.*, 2001). Apesar de não termos quantificado nenhum desses parâmetros, o tempo de treino utilizado no presente estudo provavelmente foi suficiente em produzir respostas adaptativas no vaso, o que beneficiou de certa forma a homeostasia do mesmo.

Estudos clínicos mostram que, enquanto atividade física intensa aumenta a geração de mais radicais livres do que o sistema antioxidante pode remover, atividade física moderada melhora a função endotelial e reduz os riscos

cardiovasculares (LEEJWENBURGH & HEINECKE, 2001; LEAF *et al.*, 1999). Estudos, com camundongos LDL^{-/-}, mostram que apesar do exercício agudo aumentar o estresse oxidativo, somente uma semana de treino é capaz de aumentar as defesas antioxidantes, com aumento da expressão da catalase e eNOS (MEILHAC *et al.*, 2001).

Apesar de evidências substanciais na literatura, ainda é precário o corpo literário que explique mecanismos celulares e moleculares dos benefícios da atividade física em doenças vasculares. Parece que as células vasculares podem ser afetadas por múltiplos eventos sinalizadores promovidos pela atividade física, o que nos permite pensar que o exercício aeróbio regular age contra a senescência celular (FINAUD *et al.*, 2006).

Apesar de não termos mostrado menor área de lesão aterosclerótica nos animais exercitados, observamos uma tendência de redução na área de senescência vascular, o que nos leva a pensar que alterações no status oxidativo do vaso possam ter contribuído com essa tendência, visto que protocolos similares de treino utilizados em animais experimentais apontam adaptações favoráveis na homeostasia vascular, como melhora na atividade antioxidante, aumento da disponibilidade de NO, e melhora na função endotelial (PYNN *et al.*, 2004; NIEBAUER *et al.*, 1999; NIEBAUER *et al.*, 2003). Provavelmente utilizando-se um protocolo de treino mais longo, juntamente com uma dieta hipercolesterolêmica nos animais apoE^{-/-}, poderíamos observar reduções mais convincentes na área senescente assim como redução de área de placa, como observado em outros estudos.

Recente estudo realizado em gêmeos demonstrou uma associação entre a quantidade de atividade física despendida e o tamanho do telômero de leucócitos, indicador de senescência celular; demonstrando que quanto mais ativa é a pessoa maior o comprimento do telômero e conseqüentemente, menor o estado de senescência celular. Os autores acreditam que essa relação esteja associada a uma redução da sobrecarga do estresse oxidativo e do estado inflamatório (CHERKAS *et al.*, 2008), condição geralmente associada ao envelhecimento e a doenças correlacionadas.

Concluimos que a prática de exercício regular tem importante função na saúde e no bem-estar. Praticantes regulares de exercício físico apresentam reduções de fatores de risco cardiovasculares, e mortalidade e morbidade

relacionados a esses fatores. A inatividade física, no entanto, leva a um prejuízo das funções fisiológicas, reduz a tolerância ao estresse oxidativo e diminui a expectativa de vida não somente pela predisposição a doenças relacionadas com a idade, como também com o próprio processo de envelhecimento (KADAK *et al.*, 2008); enfatizando, com isso, a importância da prática regular de atividade física na promoção da saúde e no retardo do envelhecimento e desenvolvimento das doenças relacionadas com a idade.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



7. REFERÊNCIAS

- American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics- 2006 Update. Dallas, Texas: American Heart Association; 2006.
- BEN-PORATH I & WEINBERG RA. The signals and pathways activating cellular senescence. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 2005, 37: 961–976.
- BERNSTEIN D. Exercise assessment of transgenic models of human cardiovascular disease. **Physiological Genomics** 2003, 13: 217–226.
- BREITSCHOPF K, ZEIHNER A, DIMMELER S. Pro-atherogenic factors induce telomerase inactivation in endothelial cells through an Akt-dependent mechanism. **FEBS Letters** 2001, 493: 21-25.
- CAMPISI J. Replicative senescence: An old lives' tale? **Cell** 1996, 84: 497–500.
- CHATZIZISIS Y, COSKUN A, JONAS M, EDELMAN E, FELDMAN C, STONE P. Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling. **Journal of the American College Cardiology** 2007, 49: 2379-2393.
- CHANG E & HARLEY C. Telomere length and replicative aging in human vascular tissues. **PNAS** 1995, 92: 11190-11194.
- CHEN Q. Replicative senescence and oxidant-induced premature senescence: beyond the control of cell cycle checkpoints. **Annals of the New York Academy of Sciences** 2000, 908:111-125.
- CHEN Q, PROWSE K, TU V, PURDOM S, LINSKENS M. Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts. **Experimental Cell Research** 2001, 265: 294–303.
- CHERKAS L, HUNKIN J, KATO B, RICHARDS J, GARDNER J, SURDULESCU G, KIMURA M, LU X, SPECTOR T, AVIV A. The Association between physical activity in leisure time and leukocyte telomere length. **Archives of Internal Medicine** 2008, 168 (2):154-158.

- CURTIS L & BOISVERT W. Apolipoprotein E and atherosclerosis. **Current Opinion in Lipidology** 2000, 11: 243-251.
- De ANGELIS K, WICHI R, JESUS W, MOREIRA E, MORRIS M, KRIEGER E, IRIGOYEN M. Exercise training changes autonomic cardiovascular balance in mice. **Journal of Applied Physiology** 2004, 96:2174-2178.
- DESAI K, SATO R, SCHAUBLE E, BARSH G, KOBILKA B, BERNSTEIN D. Cardiovascular indexes in the mouse at rest and with exercise: new tools to study models of cardiac disease. **American Journal of Physiology- Heart Circulatory Physiology** 1997, 272 (41): H1053-H1061.
- DIMRI GP, LEE X, BASILE G, ACOSTA M, SCOTT G, ROSKELLEY C, MEDRANO EE, LINSKENS M, RUBELJ I, PEREIRA-SMITH O, PEACOCKE M, CAMPISI J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. **PNAS** 1995, 92: 9363-9367.
- Doenças crônico-degenerativas e obesidade: Estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde. **Organização Pan-Americana da Saúde**, Brasília 2003.
- ERUSALIMSKY J & KURZ D. Cellular senescence in vivo: Its relevance in ageing and cardiovascular disease. **Experimental Gerontology** 2005, 40: 634–642.
- EVANGELISTA F, BRUM P, Krieger J. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 2003, 36(12): 1751-1759.
- FENTON M, BARKER S, KURZ D, ERUSALIMSKY J. Cellular senescence after single and repeated balloon catheter denudations of rabbit carotid arteries. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology** 2001, 21:220-226.
- FERREIRA J, ROLIM N, BARTHOLOMEU J, GOBATTO C, KOKUBUN E, BRUM P. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** 2007, 34: 760–765.
- FINAUD J, LAC G and FILAIRE E. Oxidative Stress Relationship with Exercise and Training. **Sports Medicine** 2006; 36 (4): 327-358.

- FUKAI T, SIEGFRIED M, USHIO-FUKAI M, CHENG Y, KOJDA G, HARRISON D. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. **Journal of Clinical Investigation** 2000, 105:1631–1639.
- GIELEN S, SCHULER G, HAMBRECHT R. Exercise training in coronary artery disease and coronary vasomotion. **Circulation** 2001, 103: e1-e6.
- GLASS C & WITZTUM J. Atherosclerosis: The road ahead. **Cell** 2001, 104: 503–516.
- GOMEZ-CABRERA M, DOMENECH E, VIÑA J. Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training. **Free Radical Biology & Medicine** 2008, 44: 126–131.
- GORGOULIS V, PRATSINIS H, ZACHARATOS P, DEMOLIOU C, SIGALA F, ASIMACOPOULOS P, PAPAVALASSILOU A, KLETSAS D. p53-Dependent ICAM-1 overexpression in senescent human cells identified in atherosclerotic lesions. **Laboratory Investigation** 2005, 85: 502–511.
- HAENDELER J, HOFFMANN J, DIEHL FJ, VASA M, SPYFIDOPOULOS I, ZEIHNER A, DIMMELER S. Antioxidants inhibit nuclear export of telomerase reverse transcriptase and delay replicative senescence of endothelial cells. **Circulation Research** 2004, 94: 768-775.
- HALVERSTADT A, PHARES D, WILUND K, GOLDBERG A, HAGBERG J. Endurance exercise training raises high-density lipoprotein cholesterol and lowers small low-density lipoprotein and very low-density lipoprotein independent of body fat phenotypes in older men and women. **Metabolism Clinical and Experimental** 2007, 56: 444– 450.
- HARRISON D, GRIENGLING K, LANDMESSER U, HORNIG B, DREXLER H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. **American Journal of Cardiology** 2003, 91(suppl):7A–11A.
- HARTLEY C, REDDY A, MADALA S, MARTIN-MCNULTY B, VERGONA R, SULLIVAN M, HALKS-MILLER M, TAFFET G, MICHAEL L, ENTMAN M, WANG Y. Hemodynamic changes in apolipoprotein E-knockout mice. **American Journal Physiology- Heart Circulatory Physiology** 2000, 279: H2326–H2334.

- HARTLEY C, REDDY A, MADALA S, ENTMAN M, MICHAEL L, TAFFET G. Noninvasive ultrasonic measurement of arterial wall motion in mice. **American Journal of Physiology- Heart Circulatory Physiology** 2004, 287: H1426–H1432.
- HASKELL W, LEE I, PATE R, POWELL K, BLAIR S, FRANKLIN B, MACERA C, HEATH G, THOMPSON P, BAUMAN A. Physical activity and public health- updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. **Circulation** 2007, 116:1081-1093.
- HAYASHI T, MATSUI-HIRAI H, MIYAZAKI-AKITA A, FUKATSU A, FUNAMI J, DING Q, KAMALANATHAN S, HATTORI Y, IGNARRO LJ, IGUCHI A. Endothelial cellular senescence is inhibited by nitric oxide: Implications in atherosclerosis associated with menopause and diabetes. **PNAS** 2006, 103 (45): 17018-17023.
- IGNARRO L, BALESTRIERI M, NAPOLI C. Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: An update. **Cardiovascular Research** 2006, 73 (2): 326-340.
- IKUSHIMA M, RAKUGI H, ISHIKAWA K, MAEKAWA Y, YAMAMOTO K, OHTA J, CHIHARA Y, KIDA I, OGIHARA T. Anti-apoptotic and anti-senescence effects of Klotho on vascular endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 2006, 339: 827–832.
- JAWIËN J, NASTALEK P, KORBUT R. Mouse models of experimental atherosclerosis. **Journal of Physiology and Pharmacology** 2004, 55(3): 503-517.
- KAPLAN M, CHESLOW Y, VIKSTROM K, MALHOTRA A, GEENEN D, NAKOUZI A, LEINWAND L, BUTTRICK T. Cardiac adaptations to chronic exercise in mice. **American Journal of Physiology- Heart Circulatory Physiology** 1994, 267 (36): H1167-H1173.
- KELLEY G, KELLY K, TRAN Z. Walking, lipids, and lipoproteins: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Preventive Medicine** 2004, 38: 651–661.

- KELLEY G, KELLY K, TRAN Z. Aerobic exercise, lipids and lipoproteins in overweight and obese adults: a meta-analysis of randomized controlled trials. **International Journal of Obesity** 2005, 29: 881–893.
- KELLEY G & KELLY K. Effects of aerobic exercise on lipids and lipoproteins in adults with type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized-controlled trials. **Public Health** 2007, 121(9): 643–655.
- KNOWLES J & MAEDA N. Genetic modifiers of atherosclerosis in mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology** 2000, 20: 2336-2345.
- KUNIEDA T, MINAMINO T, NISHI J, TATENO K, OYAMA T, KATSUNO T, MIYAUCHI H, ORIMO M, OKADA S, TAKAMURA M, NAGAI T, KANEKO S, KOMURO I. Angiotensin II induces premature senescence of vascular smooth muscle cells pathway and accelerates the development of atherosclerosis via a p21-dependent. **Circulation** 2006, 114: 953-960.
- KURZ D, DECARY S, HOHG Y, ERUSALIMSKY J. Senescence-associated b-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. **Journal of Cell Science** 2000, 113: 3613-3622.
- LEAF D, KLEINMAN M, HAMILTON M, DEITRICK R. The exercise-induced oxidative stress paradox: The Effects of Physical Exercise Training. **The American Journal of the Medical Sciences** 1999. 317 (5): 295-300.
- LEEWENBURGH C & HEINECKE J. Oxidative stress and antioxidants in exercise. **Current Medicinal Chemistry** 2001, 8: 829-838.
- LEON A & SANCHEZ O. Response of blood lipids to exercise training alone or combined with dietary intervention. **Medicine & Science in Sports & Exercise** 2001, 33 (6): S502–S515.
- LEWIS T, DART A, CHIN-DUSTING J, KINGWELL B. Exercise training increases basal nitric oxide production from the forearm in hypercholesterolemic patients. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology** 1999, 19: 2782-2787.

- LI P, SUR SH, MISTLBERGER RE, MORRIS M. Circadian blood pressure and heart rate rhythms in mice. **American journal of physiology-Regulatory Integrate and Comparative Physiology** 1999, 45: R500-R504.
- LIBBY P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature** 2002, 402: 868-874.
- LUSIS A J. Atherosclerosis. **Nature** 2000, 40 (407): 233-241.
- MATHEWS C, GORENNE I, SCOTT S, FIGG N, KIRKPATRICK P, RITCHIE A, GODDARD M BENNETT M. Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: Effects of telomerase and oxidative stress. **Circulation Research** 2006, 99:156-164.
- MAXWELL A, SCHAUBLE E, BERNSTEIN D, COOKE J. Cooke. Limb blood flow during exercise is dependent on nitric oxide. **Circulation** 1998, 98: 369-374.
- MAXWELL A, HO H, LE C, LIN P, BERNSTEIN D, COOKE J. L-Arginine enhances aerobic exercise capacity in association with augmented nitric oxide production. **Journal of Applied Physiology** 2001, 90: 933–938.
- MAZZOLAI L, KORBER M, BOUZOURENE K, AUBERT J, NUSSBERGER J, STAMENKOVIC I, HAYOZ D. Severe hyperlipidemia causes impaired renin–angiotensin system function in apolipoprotein E deficient mice. **Atherosclerosis** 2006, 186: 86–91.
- MEIR K & LEITERSDORF E. Atherosclerosis in the apolipoprotein E–deficient mouse: A decade of progress. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology** 2004, 24: 1006-1014.
- 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** 2001, 21:1681-1688.
- MINAMINO T & KOMURO I. Vascular cell senescence: Contribution to atherosclerosis. **Circulation Research** 2007, 100:15-26.
- MINAMINO T, YOSHIDA T, TATENO K, MIYAUCHI H, ZOU Y, TOKO H, KOMURO I. Ras induces vascular smooth muscle cell senescence and inflammation in human atherosclerosis. **Circulation** 2003, 108: 2264-2269.

- MINAMINO T, MIYAUCHI H, YOSHIDA T, ISHIDA Y, YOSHIDA H, KOMURO I. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: Role of telomere in endothelial dysfunction. **Circulation** 2002, 105: 1541-1544.
- MINAMINO T, MIYAUCHI H, YOSHIDA T, TATENO K, KOMURO I. The role of vascular cell senescence in atherosclerosis: Antisenescence as a novel therapeutic strategy for vascular aging. **Current Vascular Pharmacology** 2004, 2: 141-148.
- NAKASHIMA Y, PLUMP A, RAINES E, BRESLOW J, ROSS R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology** 1994, 14: 133-140.
- NAPOLI C, WILLIAMS-IGNARRO S, NIGRIS F, LERMAN L, ROSSI L, GUARINO C, MANSUETO G, DI TUORO F, PIGNALOSA O, ROSA G, SICA V, IGNARRO L. Long-term combined beneficial effects of physical training and metabolic treatment on atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. **PNAS** 2004, 101 (23): 8797-8802.
- NEGRÃO & BARRETO. *Cardiologia do Exercício- Do atleta ao cardiopata*. 2ª edição, Editora Manole, 2006.
- NIEBAUER J, MAXWELL A, LIN P, WANG D, TSAO P, COOKE J. NOS inhibition accelerates atherogenesis: reversal by exercise. **American Journal of Physiology- Heart Circulatory Physiology** 2003, 285: H535–H540.
- NIEBAUER J, MAX, MAXWELL A, LIN P, TSAO P, KOSEK J, BERNSTEIN D, COOKE J. Impaired aerobic capacity in hypercholesterolemic mice: partial reversal by exercise training. **American Journal of Physiology- Heart Circulatory Physiology** 1999, 276 (45): H1346–H1354.
- NOGUEIRA B, PEOTTA V, MEYRELLES S, VASQUEZ E. Evaluation of aortic remodeling in apolipoprotein E-deficient mice and renovascular hypertensive mice. **Archives of Medical Research** 2007, 38: 816-821.
- OHASHI R, MU H, YAO Q, CHEN C. Cellular and molecular mechanisms of atherosclerosis with mouse models. **Trends in Cardiovascular Medicine** 2004, 14:187–190.

- OKABE T, SHIMADA K, HATTORI M, MURAYAMA T, YOKODE M, KITA T, KISHIMOTO C. Swimming reduces the severity of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice by antioxidant effects. **Cardiovascular Research** 2007, 74: 537–545.
- PAIGEN B, ISHIDA B, VERSTUYFT J, WINTERS R, ALBEE D. Atherosclerosis susceptibility differences among progenitors of recombinant inbred strains of mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology** 1990; 10: 316-323.
- PALINSKI W, ORK V, PLUMP A, BRESLOW J, STEINBERG D, WITZRUM J. ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. **Arteriosclerosis & Thrombosis** 1994, 14: 605-616.
- PELLEGRIN M, BERTHELOT A, HOUDAYER C, GAUMEA V, DECKERT V, LAURANT P. New insights into the vascular mechanisms underlying the beneficial effect of swimming training on the endothelial vasodilator function in apolipoprotein E-deficient mice. **Atherosclerosis** 2007, 190: 35–42.
- PIEDRAHITA J, ZHANG S, HAGAMAN J, OLIVER P, MAEDA N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. **PNAS** 1992, 89: 4471-4475.
- PYNN M, SCHÄFERE K, KONSTANTINIDES S, HALLE M. Exercise training reduces neointimal growth and stabilizes vascular lesions developing after injury in apolipoprotein E-deficient mice. **Circulation** 2004, 109: 386-392.
- PLUMP A, SMITH J, HAYEK T, AAITO-SETLLIL K, WALSH A, VERSTUFT J, RUBIN E, BRESLOW J. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. **Cell** 1992, 71: 343-353.
- RAMACHANDRAN S, PENUMETCHA M, MERCHANT N, SANTANAM N, RONG R, PARTHASARATHY S. Exercise reduces preexisting atherosclerotic lesions in LDL receptor Knock out mice. **Atherosclerosis** 2005, 178: 33-38.
- REDDICK R, ZHANG S, Maeda N. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology** 1994, 14: 141-147.

- Resource book for the design of animal exercise protocols. **American Physiological Society** 2006.
- ROSS R. Atherosclerosis- an inflammatory disease. **The New England journal of medicine** 1999, 340 (2): 115- 126.
- RUSH J, DENNISS S, GRAHAM D. Vascular nitric oxide and oxidative stress: determinants of endothelial adaptations to cardiovascular disease and to physical activity. **Canadian Journal of Applied Physiology** 2005, 30(4): 442-474.
- SANTOS & colaboradores. Prevenção da Aterosclerose – Dislipidemia. **Projeto Diretrizes Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina**, 2001.
- SCHEFER V & TALAN M. Oxygen consumption in adult and aged C57BL/6J mice during acute treadmill exercise of different intensity. **Experimental Gerontology** 1996, 31 (3): 387-392.
- SCHRIJVERS D, DE MEYER G, HERMAN A, MARTINET W. Phagocytosis in atherosclerosis: Molecular mechanisms and implications for plaque progression and stability. **Cardiovascular Research** 2007, 73: 470–480.
- SEHAYEK E, SHEFER S, NGUYEN L, ONO J, MERKEL M, BRESLOW J. Apolipoprotein E regulates dietary cholesterol absorption and biliary cholesterol excretion: Studies in C57BLy6 apolipoprotein E knockout mice. **PNAS** 2000, 97: 3433-3437.
- SERRANO M & BLASCO M. Putting the stress on senescence. **Current Opinion in Cell Biology** 2001, 13:748–753.
- SHEPHARD R & BALADY G. Exercise as cardiovascular therapy. **Circulation** 1999, 99:963-972.
- SMITH J & PEREIRA-SMITH O. Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression. **Science** 1996, 273 (5271): 63-67.
- SMITH JK. Exercise and Atherogenesis. **Exercise and Sport Sciences Reviews** 2001, 29 (2): 49–53.

- SOLBERG L & EGGEN D. Localization and sequence of development of atherosclerotic lesions in the carotid and vertebral arteries. **Circulation** 1971, 43:711-724.
- SPOSITO A, CARAMELLI B, FONSECA F, BERTOLAMI M. IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose-departamento de aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** 2007, 88(I): 1-18.
- STOKER R & KEANER JFJ. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiology Review** 2004, 84: 1381–1478.
- THOMPSON P, BUCHNER D, PIÑA I, BALADY G, WILLIAMS M, MARCUS B, BERRA K, BLAIR S, COSTA F, FRANKLIN B, FLETCHER G, GORDON N, PATE R, RODRIGUEZ B, YANCEY A, WENGER N. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. **Circulation** 2003, 107: 3109-3116.
- THOMPSON P, FRANKLIN B, BALADY G, BLAIR S, CORRADO D, ESTES III N, FULTON J, GORDON N, HASKELL W, LINK M, MARON B, MITTLEMAN M, PELLICCIA A, WENGER N, WILLICH S, COSTA F. Exercise and acute cardiovascular events placing the risks into perspective: A Scientific statement from the American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism and the Council on Clinical Cardiology. **Circulation** 2007, 115: 2358-2368.
- VARADY K & JONES P. Combination diet and exercise interventions for the treatment of dyslipidemia: an effective preliminary strategy to lower cholesterol levels? **Journal of Nutrition** 2005, 135: 1829–1835.
- VASIRI H, DRAGOWSKA W, ALLSOPP R, THOMAS T, HARLEY C, LANSDORP P. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: Loss of telomeric DNA with age. **PNAS** 1994, 91: 9857-9860.
- WOOLLET L, OSONO Y, HERZ J, DIETSCHY J. Apolipoprotein E competitively inhibits receptor-dependent low density lipoprotein uptake by the liver but has no effect on cholesterol absorption or synthesis in the mouse. **PNAS** 1995, 92: 12500-12504.

- XU D, NEVILLE R, FINKELA T. Homocysteine accelerates endothelial cell senescence. **FEBS Letters** 2000, 470: 20-24.
- YATES L, DJOUSSE L, KURTH T, BURING J, GAZIANO JM. Exceptional longevity in men modifiable factors associated with survival and function to age 90 Years. **Archives of Internal Medicine** 2008, 168(3): 284-290.
- YOUNG C, KNIGHT C, VICKERS K, WESTBROOK D, MADAMANCHI N, RUNGE M, ISCHIROPOULOS H, BALLINGER S. Differential effects of exercise on aortic mitochondria. **American Journal of Physiology- Heart Circulatory Physiology** 2005, 288: H1683–H1689.
- ZAKIAN V. Telomeres: Beginning to understand the end. **Science** 1995, 270 (5242): 1601-1607.