

MAYRA EUGENIO RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DO TREINAMENTO FÍSICO COM NATAÇÃO E O TRATAMENTO  
COM NEBIVOLOL NO PROCESSO ATEROSCLERÓTICO DE CAMUNDONGOS  
APOE<sup>-/-</sup>**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Educação Física,  
para obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2013

MAYRA EUGENIO RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DO TREINAMENTO FÍSICO COM NATAÇÃO E O  
TRATAMENTO COM NEBIVOLOL NO PROCESSO  
ATEROSCLERÓTICO DE CAMUNDONGOS APOE<sup>-/-</sup>**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Educação Física,  
para obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

APROVADA: 03 de Abril de 2013

---

Prof. Mateus Camaroti Laterza

---

Prof. Clóvis Andrade Neves  
(Coorientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Maria do Carmo Gouveia Peluzio  
(Orientadora)

*Dedico esta dissertação aos meus pais Nilda e Wilson, à minha irmã Lis, ao meu esposo Leandro, enfim a toda a minha família, com muito amor, admiração e gratidão.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder a vida, sabedoria e saúde para que eu alcançasse mais um objetivo.

À mãe e ao pai, pelo amor incondicional, apoio, ensinamentos e por serem a razão da minha vida.

À Lis, minha querida irmãzinha, por todo o carinho e torcida.

Ao Leandro, meu esposo, pelo seu amor, compreensão, carinho, paciência, encorajamento, companheirismo e incansável apoio.

A todos os demais familiares, vó, tias e tios, primas e primos por todo apoio e torcida.

À minha orientadora, Professora Maria do Carmo Gouveia Peluzio, pela amizade, ensinamentos técnicos e de vida, orientação e confiança depositada em mim. Muitíssimo obrigada.

Ao Professor Clóvis, pelo apoio, disponibilidade e coorientação deste trabalho.

Ao Professor Natali, por toda a atenção, sugestões e colaborações científicas.

Ao Professor Mateus, por ter aceitado o convite, pela disponibilidade e contribuição científica ao avaliar este trabalho.

Ao Professor Lobato, pela amizade, ensinamentos, conselhos e exemplo de conduta profissional.

Ao grupo Laboratório de Bioquímica Nutricional, por terem me recebido com tanto carinho, e participarem diariamente desse trabalho. Luciana, Nathane, Carol e Natália, Flávia, Sandra, Mari, Letícia, Patrícia, Tati, Luiz Fernando, Lisiane e Toninho, vou sentir muita saudade de todos!

À amiga e companheira de laboratório, Damiana, por toda a amizade, paciência, parceria, noites no laboratório, horas no skype e que carinhosamente compartilhou suas estagiárias.

Aos funcionários, membros e parceiros do Laboratório de Nutrição Experimental (DNS/UFV), em especial a Fabiana, por toda atenção.

Aos funcionários, membros e parceiros do Laboratório de Biologia Celular e Estrutural (DBG/UFV), pelo apoio e atenção. Ao Professor Sérgio da Matta, pelas agradáveis conversas e sugestões.

Aos funcionários e membros do Laboratório de Associação de Micorrizas (DMB/UFV) por toda atenção e por terem disponibilizado o microscópio para captura das imagens. Em especial ao Professor Maurício.

A todo o grupo do Laboratório de Biologia do Exercício (DES/UFV).

A todos os professores incentivadores desta minha jornada acadêmica.

À amiga Sol, companheira de tantos anos, pessoa que admiro, com quem aprendo todos os dias e que me salva sempre que preciso. Ao Paulo pela amizade e momentos de alegria.

Às amigas Regi, Márcia, Thaynara, Aline e Renata, pelo carinho, amizade, apoio, momentos de alegria e pelos domingos no açaí.

À amiga Maíra, por toda ajuda, disponibilidade, momentos de descontração, apoio e amizade.

Às companheiras de república, Priscila e Karina pela amizade e apoio.

Ao “Hotel Solange”, meu lar por todos esses anos.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Educação Física, pela excelência em ensino e pela concessão da bolsa de Monitoria Nível II.

Aos funcionários do Departamento de Educação física, em especial à Ritinha, Luiz, José Francisco, Miltinho, e Maisa, sempre tão atenciosos e prestativos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

A Coordenadoria de Educação Aberta e a Distância (CEAD) pela concessão de bolsa para produção e utilização das novas Tecnologias de Informação e Comunicação (TICs).

E a todos, que de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho.

VALEU, GALERA!!!!

## BIOGRAFIA

Mayra Eugenio Rodrigues, filha de Wilson Rodrigues de Souza e Cleonilda Eugenio Rodrigues, nasceu em Nanuque, estado de Minas Gerais, em 07 de março de 1986.

Em maio de 2006, ingressou no curso de Educação Física na Universidade Federal de Viçosa, obtendo seu título de graduação em janeiro de 2010.

Entre março de 2010 e março de 2011, especializou-se em Atividade Física em saúde e Reabilitação Cardíaca na Universidade Federal de Juiz de Fora.

Em março de 2011, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Educação Física, do Departamento de Educação Física - Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Atividade física, esporte e saúde, submetendo-se à defesa de dissertação, requisito indispensável para obtenção do título de *Magister Scientiae*, em abril de 2013.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	7
2.1. Objetivo Geral .....	7
2.2. Objetivos Específicos .....	7
<b>3. METODOLOGIA GERAL</b> .....	8
<b>4. CAPÍTULO I: Histopatologia de fígado, rim e coração de camundongos apoE<sup>-/-</sup> tratados com nebivolol e exercitados aerobicamente</b> .....	21
4.1. Resumo.....	21
4.2. Abstract.....	22
4.3. Introdução .....	23
4.4. Metodologia.....	24
4.5. Resultados .....	30
4.6. Discussão.....	35
4.7. Conclusões .....	38
<b>5. CAPÍTULO II: Expressão de iNOS na adventícia e potencial antioxidante em camundongos apoE<sup>-/-</sup> submetidos a treinamento com natação e tratados com nebivolol.</b> .....	39
5.1. Resumo.....	39

5.2.	Abstract .....	40
5.3.	Introdução .....	41
5.4.	Metodologia.....	42
5.5.	Resultados .....	48
5.6.	Discussão.....	54
5.7.	Conclusões .....	60
<b>6.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>61</b>



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotomicrografia de secção histológica do coração de camundongo apoE <sup>-/-</sup> com sobreposição de uma matriz quadrada padrão. ....	15
Figura 2: Fotomicrografia de secção histológica do fígado de camundongo apoE <sup>-/-</sup> com sobreposição de uma matriz quadrada padrão. ....	16
Figura 3: Atividade da CS no músculo esquelético (sóleo/gastrocnêmio). ...	32
Figura 6: Percentual de esteatose hepática.....	33
Figura 7: Fotomicrografias representativas do fígado.....	33
Figura 8: Percentual de área lesionada ocupando o lúmen.....	48
Figura 9: Fotomicrografia representativas da raiz aórtica. ....	49
Figura 10: Expressão de iNOS detectada por imunofluorescência nos grupos experimentais.....	50
Figura 11: Expressão de iNOS detectada por Imunofluorescência no citoplasma e núcleo celular.....	51
Figura 12: Atividade da enzima CAT (U.mg <sup>-1</sup> de proteína) no fígado. ....	52
Figura 13: Atividade da enzima SOD (U.mg <sup>-1</sup> de proteína) no fígado.....	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Programa progressivo de natação para camundongos apoE <sup>-/-</sup> .....	10
Tabela 2. Evolução dos animais, concentração de lipídeos no soro e indicadores de hepatotoxicidade nos grupos experimentais. ....	31
Tabela 3. Morfometria de glomérulos nos grupos experimentais.....	34
Tabela 4. Conteúdo de colágeno no coração nos grupos experimentais. ....	35
Tabela 5. Atividade da enzima catalase e superóxido dismutase no rim dos animais dos grupos experimentais.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ALT .....	Alanina aminotrasferase
ApoE <sup>-/-</sup> .....	<i>knockout</i> para apolipoproteína E
AST .....	Aspartato aminotrasferase
CAT .....	Catalase
CS .....	Citrato Sintase
CT .....	Colesterol total
DAPI .....	4',6-diamidino-2-phenylindole
DTNB .....	5'5-dithiobis-(2-nitrobenzoato)
FA .....	Fosfatase alcalina
FITC .....	isotiocianato de fluoresceína
G1 .....	Grupo de animais apoE <sup>-/-</sup> sem medicamento e sem exercício
G2 .....	Grupo de animais apoE <sup>-/-</sup> com medicamento e sem exercício
G3 .....	Grupo de animais apoE <sup>-/-</sup> sem medicamento e com exercício
G4 .....	Grupo de animais apoE <sup>-/-</sup> com medicamento e com exercício
HDL .....	lipoproteína de alta densidade
IgG .....	Imunoglobulina G
iNOS .....	Óxido Nítrico Sintase Induzível
iNOS <sup>-/-</sup> .....	<i>knockout</i> para Óxido Nítrico Sintase Induzível
LPS .....	lipopolissacarídeo
NO .....	óxido nítrico
NOS2 .....	Óxido Nítrico Sintase Induzível
SOD .....	Superóxido dismutase
TAG .....	Triacilglicerol

## RESUMO

RODRIGUES, Mayra Eugenio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2013. **Avaliação do treinamento físico com natação e o tratamento com nebivolol no processo aterosclerótico de camundongos apoE<sup>-/-</sup>.** Orientadora: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Coorientadores: Antônio José Natali e Clóvis Andrade Neves.

A doença arterial aterosclerótica é uma das maiores causas de morte no mundo. Medidas farmacológicas e não farmacológicas, são terapias comumente utilizadas e associadas a um decréscimo na incidência de eventos cardiovasculares. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do treinamento físico com natação e o tratamento com nebivolol no processo da aterosclerose em camundongos adultos apoE<sup>-/-</sup>. Foram utilizados 28 camundongos apoE<sup>-/-</sup> com 17 semanas de idade, submetidos a 6 semanas de treinamento com natação (60 min/sessão/dia, 5 dias/semana) e tratamento com 2,0 µmol/kg de peso corporal de nebivolol. Os animais foram divididos em 4 grupos: controle: apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e sem exercício (G1, n = 7); apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e sem exercício (G2, n = 7); apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e com exercício (G3, n = 7); apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e com exercício (G4, n = 7). O peso dos animais foi avaliado semanalmente. Ao final do experimento os animais foram eutanasiados e o sangue coletado foi imediatamente centrifugado para obtenção do soro para análise do perfil lipídico e enzimas indicadoras de hepatotoxicidade. A aorta, parte do fígado, rim e coração foram removidos, lavados em solução fisiológica, conservados em formol neutro a 10% (pH = 7,0) e após 24 horas transferidos para uma solução de 70% de etanol para as análises histopatológicas. Na aorta também foi realizada imunofluorescência. Fragmentos do fígado e do rim foram congelados e mantidos a -80°C até a análise da atividade enzimática da catalase e superóxido dismutase. Os músculos sóleo e gastrocnêmio também foram congelados para análise da atividade da enzima citrato sintase. Não houve diferença estatística entre os grupos para desenvolvimento, perfil lipídico, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase, dessa forma os tratamentos não foram capazes de interferir nesses parâmetros. A fosfatase alcalina foi significativamente maior

nos grupos treinados, podendo ser indicativo de alteração do metabolismo ósseo. A estenose no lúmen da raiz aórtica foi menor no G2 em relação ao G1, demonstrando que o nebivolol foi capaz de inibir a progressão da placa. Nas análises histopatológicas do fígado tanto os grupos treinados quanto os tratados com medicamento apresentaram menor porcentagem de esteatose, indicando um papel importante dos tratamentos em prevenir o acúmulo de gordura hepática. No rim, os tratamentos não demonstraram alterações no número e área dos glomérulos. G1 e G4 apresentaram um percentual maior de colágeno total no coração que os grupos G2 e G3. Em relação à razão colágeno tipo I/III, não houve diferença significativa entre os grupos. A expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) na aorta do animais de todos os grupos ocorreu essencialmente na camada adventícia da artéria, sugerindo um processo inflamatório iniciado nesta camada. A atividade da catalase (CAT) no fígado foi significativamente inferior nos grupos treinados. Já a atividade da superóxido dismutase (SOD) do grupo G3 foi inferior em relação aos grupos não treinados. Não houve diferença significativa na atividade enzimática de SOD e CAT no rim. Este trabalho sugere que o protocolo de exercício proposto não alterou positivamente o processo aterosclerótico neste modelo animal, porém o nebivolol foi capaz de reduzir a área das lesões ateroscleróticas e o conteúdo de colágeno. A expressão da iNOS ocorreu na camada adventícia da artéria de todos os grupos. Além disso, tanto o medicamento quanto o exercício foram capazes de atuar de forma positiva, diminuindo o acúmulo de gordura no fígado, e o exercício atuou reduzindo a atividade antioxidante de SOD e CAT neste órgão nos grupos treinados.

## ABSTRACT

RODRIGUES, Mayra Eugenio, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2013. **Assessment of swimming training and nebivolol treatment in atherosclerotic process of mice apoE<sup>-/-</sup>**. Adviser: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Co-Advisers: Antônio José Natali and Clóvis Andrade Neves..

Atherosclerosis is one of the major causes of worldwide death. Pharmacological and non-pharmacological treatments, are commonly therapies used and are associated with a decreased incidence of cardiovascular events. The aim of this study was to evaluate the effects of swimming training and nebivolol treatment in atherosclerosis process of adult mice apoE<sup>-/-</sup>. Twenty-eight apoE<sup>-/-</sup> mice at the age of 17 weeks were kept on a six weeks of swimming training (60 min / session / day, 5 days / week) and treated with 2.0 mmol / kg body weight of nebivolol. The animals were randomized to the following 4 groups: control: apoE<sup>-/-</sup> without drug and sedentary (G1, n = 7), apoE<sup>-/-</sup> - with drug and sedentary (G2, n = 7), apoE<sup>-/-</sup> - without drug and exercised (G3, n = 7), apoE<sup>-/-</sup> - with drug and exercised (G4, n = 7). Animals' weight was measured weekly. At the end of the experiment the animals were euthanized and blood was collected immediately and centrifuged to obtain serum for lipids and hepatotoxicity enzymes analysis. The aorta, liver, kidney and heart were removed, washed in saline, preserved in 10% neutral formalin (pH 7.0) and transferred after 24 hours to a solution of 70% ethanol for histological analysis. Liver and kidney fragments were frozen and kept at -80 °C until analysis of the catalase and superoxide dismutase enzymatic activity. The soleus and gastrocnemius muscles were also frozen for analysis of the citrate synthase activity. There was no statistical difference between groups for development, lipid profile, AST and ALT, thus treatments are not capable of interfering in these parameters. The ALP was significantly higher in trained groups, that can be indicative of bone metabolism change. The lumen stenosis of the aortic root was lower in G2 compared to G1, demonstrating that nebivolol was able to inhibit the plaque progression. In histopathological analysis, the liver from trained groups and from drug treated groups showed a lower percentage of steatosis, indicating

an important role of treatments in preventing hepatic fat accumulation. In the kidney, the treatments showed no changes in the number and glomeruli area. G1 and G4 had a higher percentage of total collagen in the heart than G2 and G3. Regarding collagen type I / III reason, there was no significant difference between groups. The expression of iNOS in the aorta of animals in all groups occurred primarily in the adventitia layer of the artery, suggesting an inflammatory process initiated in this layer. CAT activity in the liver was significantly lower in the trained groups. SOD activity in G3 group was lower compared to the untrained group. There was no significant difference in SOD and CAT enzymatic activity in the kidney. This study suggests that the proposed exercise protocol did not affect positively the atherosclerotic process in this animal model, but nebivolol reduce the area of atherosclerotic lesions and collagen content. iNOS expression occurred in the adventitia layer of the artery from all groups. Moreover, both drug as exercise were able to act positively, reducing fat accumulation in liver and exercise acted reducing SOD and CAT antioxidant activity in this organ in trained groups.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A aterosclerose é uma das principais causas de morte e de perda de anos de vida produtiva em todo o mundo (Libby et al., 2011). Caracteriza-se em uma doença inflamatória crônica da parede arterial e de origem multifatorial, ocorrendo em resposta à agressão endotelial, e acomete principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre (Sposito et al., 2007).

Apesar dos avanços nas pesquisas sobre a doença, como também sobre a fisiopatologia da formação da lesão, muitas hipóteses foram formuladas envolvendo processos como a oxidação das lipoproteínas (Navab et al., 2004), inflamação (Berliner et al., 1995) e imunidade (Legein et al., 2013) associadas à gênese da aterosclerose humana.

A compreensão da fisiopatologia da aterosclerose sugere que alterações da função endotelial podem desempenhar papel fundamental no desenvolvimento e progressão da doença e suas complicações clínicas (Libby et al., 2011).

O endotélio é um regulador primordial da função vascular e é composto por uma monocamada de células que revestem os vasos sanguíneos (Fearon & Faux, 2009). A sua disfunção parece estar envolvida na aterosclerose, e favorece o desenvolvimento das alterações estruturais vasculares (Landmesser et al., 2004). Condições comuns que predispõem a formação da placa aterosclerótica, tais como elevação de lipoproteínas aterogênicas, hipertensão, diabetes e tabagismo, estão associados com



disfunção endotelial, levando a um fenótipo pró-inflamatório e pró-trombótico do endotélio (Landmesser et al., 2004; Sposito et al., 2007).

Com o prejuízo na função do endotélio, ocorre um aumento da permeabilidade da camada íntima do vaso às lipoproteínas plasmáticas favorecendo a retenção das mesmas no espaço subendotelial, onde as partículas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são modificadas por oxidação ou atividade enzimática, agregando-se ao espaço extracelular da íntima e aumentando sua fagocitose pelos macrófagos (Rader & Daugherty, 2008), processo chave no início da aterogênese. Essa ação oxidativa induz o surgimento de moléculas de adesão nas células endoteliais, facilitando a atração de linfócitos e monócitos, aprisionando-os e permitindo a sua transmigração através da camada endotelial para íntima subjacente (Fearon & Faux, 2009). Com a diferenciação de monócitos em macrófagos e aumento da absorção de lipoproteínas aterogênicas, ocorre o acúmulo de lipídios no subendotélio e geração das células espumosas, aparentando estrias gordurosas no vaso com lesão inicial (Rader & Daugherty, 2008).

A progressão da lesão envolve a migração de células musculares lisas da média para a íntima, a proliferação de células musculares lisas da íntima, além da síntese aumentada de macromoléculas da matriz extracelular, como colágeno, elastina e proteoglicanos. Em lesões avançadas, com macrófagos formando a placa aterosclerótica e células musculares lisas que migraram, estas podem morrer e o lipídio extracelular derivado de células mortas pode se acumular na região central de uma placa, muitas vezes significando um núcleo lipídico ou necrótico (Tabas, 2010). Placas avançadas também contêm cristais de colesterol e microvasos. A complicação final da

aterosclerose é caracterizada pela trombose, um rompimento físico da placa aterosclerótica que se estende para dentro do lúmen do vaso, podendo impedir o fluxo sanguíneo (Libby et al., 2011).

Do mesmo modo, podem ocorrer mudanças estruturais e funcionais em diversos órgãos afetados pela doença. O desenvolvimento da aterosclerose e conseqüente produção de radicais livres estão associados a mudanças na arquitetura de vários órgãos, entre eles fígado e rins (Wu et al., 2007). Evidências crescentes indicam uma associação entre doença cardiovascular, aumento de gordura no fígado (Targher et al., 2010) e doença renal crônica (Foley & Collins, 2011). Além dos marcadores bioquímicos, a esteatose hepática tem sido questionada como um possível marcador da aterosclerose (Targher et al., 2006).

Em condições patológicas, diferentes mediadores da resposta inflamatória como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento têm sido demonstrados envolvidos no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas. Além destes eventos, os macrófagos também podem servir como fonte de outros mediadores inflamatórios que podem contribuir para a lesão tecidual nesta doença (Detmers et al., 2000). Um deles é a produção excessiva de óxido nítrico (NO), por um intervalo de tempo prolongado onde, a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), uma enzima de alto rendimento independente de  $Ca^{+2}$ , induz a expressão do NO em uma ampla extensão de células e tecidos (MacMicking et al., 1997).

Apesar da síntese aumentada de óxido nítrico produzido pela iNOS terem efeitos positivos, quantidades exacerbadas podem ter conseqüências prejudiciais ao combinar-se com o radical superóxido para formar

peroxinitrito, um aduto com capacidade de aumentar a oxidação (Beckman et al., 1990). Assim, a disfunção na indução da expressão da iNOS parece estar envolvida na patofisiológica de diferentes doenças, inclusive como um agente pró-inflamatório promovendo a progressão da lesão aterosclerótica.

Medidas farmacológicas e não farmacológicas relacionadas à mudança do estilo de vida são terapias comumente utilizadas.

O exercício físico aeróbico tem sido recomendado como um tratamento auxiliar no controle da doença arterial coronariana visando estabilizar e até reduzir as placas ateroscleróticas, minimizando mudanças estruturais e funcionais nos órgãos afetados. Esta terapia melhora o perfil lipídico sanguíneo, diminuindo a concentração plasmática de triglicerídios e lipoproteína de baixa densidade (LDL), aumentando a concentração de lipoproteína de alta densidade (HDL) (Kraus et al., 2002), e promovendo a saúde cardiovascular. Além disso, evidências sugerem que o exercício provavelmente aumenta o número de receptores que captam a LDL do plasma, resultando em menor exposição aos processos oxidativos (Nunes et al., 2010). Assim, o exercício regular está associado a modificações favoráveis nos fatores de risco cardiovasculares e afeta diretamente a atividade funcional do endotélio vascular. Estas alterações benéficas podem limitar o desenvolvimento da aterosclerose (Gleeson et al., 2011).

O nebivolol é um antagonista altamente seletivo para o receptor beta 1 da terceira geração de betabloqueadores, utilizado no tratamento da hipertensão. Este medicamento tem mostrado aumentar a biodisponibilidade de óxido nítrico derivado do endotélio e atenuar a ativação inflamatória de células endoteliais (Weiss, 2006), oferecendo uma combinação única de alta

seletividade de receptores beta-1 adrenérgicos no miocárdio humano e vasodilatação mediada por óxido nítrico (Kamp et al., 2010). O nebivolol é bem absorvido após administração oral, não é afetado pela alimentação, sexo, idade ou peso corporal, suas concentrações plasmáticas máximas são atingidas entre 30 minutos e duas horas, atingindo um steady-state em 24 horas e sendo metabolizado pelo fígado (Cheymol et al., 1997;McNeely & Goa, 1999). Além disso, tem sido considerado um medicamento mais potente que outros anti-hipertensivos da mesma classe. Tal fato é demonstrado em diversos estudos que relatam resultados positivos, em indivíduos hipertensos, como diminuição da pressão arterial, frequência cardíaca e resistência vascular, melhora da função sistólica e diastólica, redução do estresse oxidativo, índice de resistência à insulina e níveis plasmáticos de P-selectina (Celik et al., 2006;Kamp et al., 2010;Moen & Wagstaff, 2006;Pasini et al., 2005). Apesar de ser um anti-hipertensivo, este medicamento tem mostrado atenuar a aterogênese em camundongos modificados geneticamente (Kus et al., 2009), podendo ser uma terapia eficaz no controle da lesão aterosclerótica.

Como forma de verificar os efeitos de diferentes tratamentos sobre as lesões ateroscleróticas, modelos animais como o camundongo, tornam-se útil, econômico, e válido para o estudo e investigação dessas abordagens terapêuticas. A utilização dos modelos que desenvolvem lesões ateroscleróticas espontaneamente, como camundongos que possuem um gene deletado para a apolipoproteína E (apoE<sup>-/-</sup>), auxiliam na evolução das pesquisas. Este modelo possui o mesmo conjunto de genes que controlam o metabolismo de lipoproteínas (Hofker, 1998) e as lesões ateroscleróticas

desenvolvidas neste animal se assemelham as lesões humanas (Xiangdong et al., 2011).

Neste contexto, pesquisas devem ser conduzidas com enfoque voltado para situações que ocorrem no cotidiano dos indivíduos suscetíveis às doenças crônicas, como a aterosclerose. Atualmente, não existem pesquisas abordando a combinação do tratamento com nebivolol e exercício físico de natação como possíveis moduladores do processo aterogênico, tornando-se inédito o trabalho que propusemos. O uso destes agentes pode ser uma ferramenta útil como foco terapêutico em vários processos inflamatórios.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo determinar o efeito do treinamento físico com natação e o tratamento com nebivolol sobre alguns parâmetros na aorta, fígado, rim e coração de camundongos apoE<sup>-/-</sup>.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos do treinamento físico com natação e o tratamento com nebivolol no processo da aterosclerose em camundongos adultos apoE<sup>-/-</sup>.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar o efeito dos tratamentos na massa corporal e índice hepatossomático dos animais;
- Avaliar o efeito dos tratamentos no perfil lipídico dos animais;
- Verificar possíveis associações entre o treinamento de natação e as lesões ateroscleróticas;
- Verificar se o tratamento com nebivolol é capaz de alterar as lesões na raiz aórtica;
- Avaliar possíveis efeitos da associação do treinamento com natação com o tratamento com nebivolol nas lesões;
- Avaliar o efeito dos tratamentos nas enzimas indicadoras de hepatotoxicidade dos animais;
- Analisar a histopatologia do fígado, rim e coração dos animais tratados;
- Avaliar a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) na aorta dos animais tratados;
- Avaliar o potencial antioxidante do treinamento físico e do nebivolol sobre o fígado e rins dos animais.

### **3. METODOLOGIA GERAL**

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Nutrição Experimental e Bioquímica da Nutrição (DNS/UFV), Laboratório de Análises Clínicas (DSA/UFV), Laboratório de Biologia Celular e Estrutura (DBG/UFV) e Laboratório de Associação de Micorrizas (DMB/UFV) da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

#### **3.1. Aspectos éticos**

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (UFV), processo nº 101/2011. O experimento foi conduzido em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (2009).

#### **3.2. Animais de experimentação e tratamentos**

Foram utilizados 28 camundongos machos adultos da linhagem *Mus Musculus knockout* para o gene da apolipoproteína E ( $apoE^{-/-}$ ), com 17 semanas de idade, provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, com peso médio inicial de  $26,58 \pm 2,18$  g. Os animais foram distribuídos em grupos experimentais e alojados em gaiolas coletivas de polipropileno de 30 x 20 x 13 cm de largura, comprimento e altura, respectivamente, e equipadas individualmente com comedouro e bebedouro, onde foram disponibilizados água e ração comercial (Nuvilab®) *ad libitum*. As gaiolas alocaram o máximo de 5 animais, submetidos a um regime de luminosidade

de 12 horas claro/ 12 horas escuro, com condições ambientais no interior da sala experimental monitoradas diariamente, mantendo uma temperatura média de  $23 \pm 2$  °C durante todo o experimento até completarem a idade de 23 semanas. O peso dos animais foi monitorado semanalmente (balança digital M2K, Marte Slim).

Vinte e oito camundongos apoE<sup>-/-</sup> foram distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado composto de quatro tratamentos, assim subdivididos:

- apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e sem exercício (G1, n = 7);
- apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e sem exercício (G2, n = 7);
- apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e com exercício (G3, n = 7);
- apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e com exercício (G4, n = 7);

### **3.3. Protocolo de exercício físico**

Os grupos experimentais G3 e G4 foram submetidos a um programa progressivo de natação de moderada intensidade (adaptado de Pellegrin et al., 2009a). A progressão do treinamento encontra-se detalhada na tabela 1. Resumidamente, a natação foi realizada pela manhã, entre 07 e 09 h. Consistia em um período de treinamento de 60 minutos por dia, 05 dias por semana, 01 sessão por dia, com a água mantida constantemente entre 30 e 33°C. Os animais foram treinados progressivamente, iniciando com 10 minutos de treino no primeiro dia, seguido de um acréscimo diário de 5 minutos até o quinto dia. Na semana seguinte, os animais iniciaram o treinamento com 40 minutos no primeiro dia, seguido de um acréscimo de 10 minutos até o terceiro dia, onde alcançaram a meta de 60 minutos diários.



Após as sessões os animais eram cuidadosamente secos. O programa de exercício foi realizado em um recipiente circular com 60 cm de diâmetro e 25 cm de profundidade.

Tabela 1. Programa progressivo de natação para camundongos apoE<sup>-/-</sup>.

	<b>Seg</b>	<b>Ter</b>	<b>Qua</b>	<b>Qui</b>	<b>Sex</b>
Adaptação	10'	15'	20'	25'	30'
1ª Semana	40'	50'	60'	60'	60'
2ª Semana	60'	60'	60'	60'	60'
3ª Semana	60'	60'	60'	60'	60'
4ª Semana	60'	60'	60'	60'	60'
5ª Semana	60'	60'	60'	60'	60'

### **3.4. Tratamento Medicamentoso**

A administração do medicamento ocorreu por via oral por meio do método de gavagem. Nos grupos experimentais G2 e G4 foi administrada uma dose de 2,0 µmol / kg de peso corporal por dia de cloridrato de nebivolol (Nebilet® 5mg, BIOLAB) diluído em água destilada (Kus et al., 2009; Ozben et al., 2009). Os grupos G1 e G3 receberam a mesma dosagem de solução fisiológica.

### **3.5. Determinação do desenvolvimento dos animais**

#### **3.5.1. Massa corporal**

Ao início de cada semana, os animais eram pesados para obtenção da massa corporal a fim de acompanhara evolução de cada grupo experimental.

### **3.5.2. Índice hepatossomático**

Dados da massa do fígado foram obtidos e expressos como uma porcentagem da massa corporal ((massa fígado em gramas/ massa corporal) \*100).

### **3.6. Eutanásia e Dissecção dos Órgãos**

Na 23ª semana de vida os animais foram submetidos ao jejum de 12h, e eutanasiados por inalação de CO<sub>2</sub>. Os grupos exercitados sofreram a eutanásia 48 horas após a última sessão de exercício. Foram coletadas amostras de sangue, removidas por punção na aorta abdominal e imediatamente centrifugado a 3000 rpm, por 10 minutos à 4°C. O soro foi retirado e armazenado à -80°C.

Parte do fígado, o rim direito, a aorta e o coração de cada animal foram lavados em solução tampão fosfato-salino (PBS), em seguida, fixados em formol neutro a 10% (pH 7,0) e após 24 horas transferidos para uma solução de 70% de etanol até a análise histopatológica.

O restante do fígado, o rim esquerdo, os músculos sóleo e gastrocnêmio foram também removidos e mantidos a -80 °C até a análise.

### **3.7. Determinação dos níveis de lipídios plasmáticos**

Os níveis de Colesterol total (CT), Lipoproteínas de alta densidade (HDL) e Triacilglicerol (TAG) foram determinados por meio de kits comerciais (BIOCLIN, Quibasa Quimica Básica Ltda.) por método enzimático colorimétrico e analisador automático (Cobas Mira Plus, Roche Diagnostic System) pelo Laboratório de análises Clínicas da Divisão de Saúde/UFV.

### **3.8. Análises das Enzimas Indicadoras de Hepatotoxicidade**

Os níveis de Aspartato aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase (ALT) e Fosfatase alcalina (FA) foram determinados através de kits comerciais (BIOCLIN, Quibasa Química Básica Ltda.) por método cinético colorimétrico e analisador automático (Cobas Mira Plus, Roche Diagnostic System) pelo Laboratório de Análises Clínicas da Divisão de Saúde/UFV.

### **3.9. Inclusão em Resina do Fígado e Rim**

Para as avaliações histológicas, os fragmentos de fígado e rim foram desidratados gradativamente em concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 95% e 100%), com trocas a cada 30 minutos, em seguida foram infiltrados e posteriormente incluídos em resina (Historesin®, Leica). Secções transversais e longitudinais de 3 µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo automático (RM2155, Leica) com navalhas de vidro.

### **3.10. Inclusão em Parafina do Coração e Aorta**

O coração foi seccionado transversalmente no meio, com a finalidade de isolar os ventrículos. A aorta de cada animal, destinadas à análise histológica e de imunofluorescência, foi desacoplada do coração e limpa, sendo retirados os tecidos conjuntivos e os gordurosos associados à parte externa da artéria. Os tecidos foram desidratados gradativamente em concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 90%, 100%) com trocas a cada 60 minutos. Em seguida os fragmentos foram diafanizados em xilol (álcool+xilol, xilol I, xilol II e xilol III) com trocas a cada 60 minutos, incluídos e emblocados em parafina. Secções transversais de 7 µm de

espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (CUT 4055, Olympus America Inc.) com navalhas de aço.

### **3.11. Captura de Imagens**

Foram obtidas imagens das secções coradas utilizando-se o microscópio de luz (BX-50, Olympus), e câmara digital de captura (QColor-3, Olympus) acoplada a um sistema computadorizado (Q-Capture Pro 6.0) do Laboratório de Associação de Micorrizas do Departamento de Microbiologia da UFV.

### **3.12. Análise histopatológica e morfometria da aorta**

Foram montadas duas lâminas histológicas por animal, cada uma contendo cinco cortes separados por no mínimo 28  $\mu\text{m}$ . As lâminas foram coradas com Tricrômico de Masson (modificado por Mallory; Tolosa et al., 2003), montadas com Entellan® (Merck, Alemanha) e observadas em microscópio de luz. Na região da raiz aórtica, caracterizada pela presença da valva aórtica, cinco imagens de cada animal foram capturadas (objetiva de 4x) e selecionadas para análise morfométrica e quantitativa.

Através das imagens foram feitas avaliações morfométricas da aorta quanto a área da luz e a extensão das lesões ateroscleróticas, medidas em cada secção utilizando um *software* de análise de imagem computadorizada (*Image-Pro Plus versão 4.5; Media Cybernetics, Sarasota, Florida, EUA*). Em cada secção a área relativa da placa (estenose luminal) foi determinada como percentagem de área da lesão por área da luz. Para estas medidas morfométricas foi utilizado o protocolo adaptado de Kadoglou et al. (2011).

### 3.13. Análise morfométrica do coração

Foram montadas duas lâminas histológicas por animal, contendo seis cortes cada. As lâminas foram coradas com *picrosirius red* (Junqueira et al., 1979), montadas com Entellan® (Merck, Alemanha) e observadas em microscópio de luz com filtros de polarização. Na região do ventrículo esquerdo três imagens de cada animal foram capturadas (objetiva de 10x) e selecionadas para análise morfométrica.

A quantificação do colágeno presente nos campos histológicos foi realizada utilizando-se o aplicativo *Image-Pro Plus*® versão 4.5 (Media Cybernetics). Padronizou-se a sobreposição de uma matriz quadrada padrão (21 linhas x 21 colunas) nos campos fotografados, e foram contabilizados apenas o colágeno coincidente com as interseções (Figura 1). As fibras que sob a luz polarizada apresentavam coloração amarela, laranja ou vermelha foram consideradas colágeno tipo I, enquanto as que apresentaram cor verde foram consideradas colágeno tipo III (Junqueira et al., 1978). A quantificação do colágeno foi expressa em porcentagem de área ocupada.

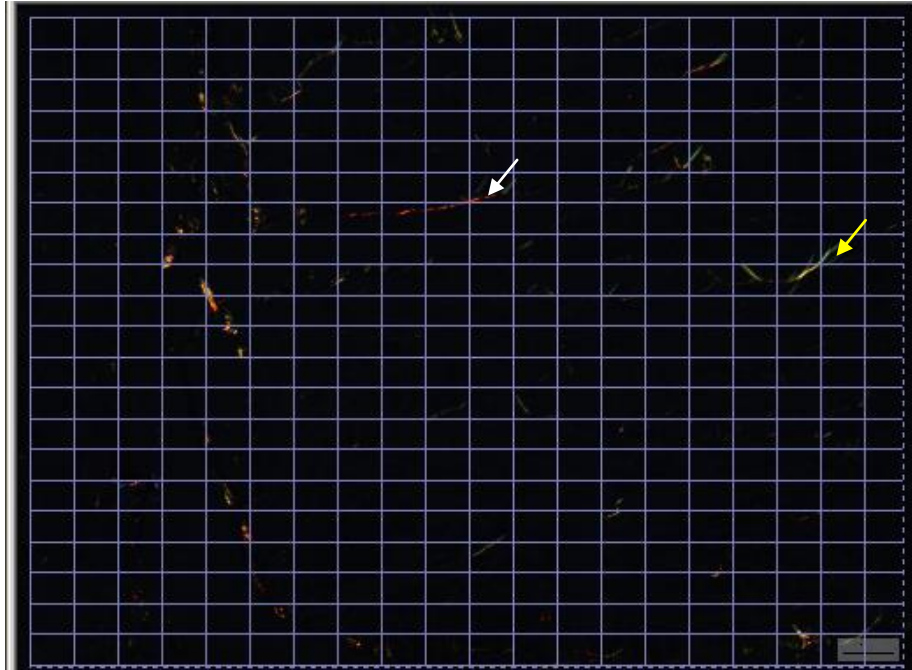


Figura 1: Fotomicrografia de secção histológica do coração de camundongo apoE<sup>-/-</sup> com sobreposição de uma matriz quadrada padrão. Apenas o colágeno coincidente com as interseções foi contabilizado. A seta branca indica o colágeno tipo I e a seta amarela indica o colágeno tipo III. Coloração picosirius red para colágeno. Barra = 40 µm.

### 3.14. Análise histopatológica e morfometria do fígado

Foram montadas quatro lâminas histológicas por animal, contendo 10 cortes cada. As lâminas foram coradas com Azul de Toluidina/Borato de Sódio 1% (Bancroft & Gamble, 2007), montadas com Entellan® (Merck, Alemanha) e observadas em microscópio de luz. Foram capturadas dez imagens de cada animal (objetiva de 40x), selecionadas para análise morfométrica.

A quantificação da deposição lipídica presente nos campos histológicos foi realizada utilizando-se o aplicativo *Image-Pro Plus*® versão 4.5 (Media Cybernetics). Padronizou-se a sobreposição de uma matriz quadrada padrão (41 linhas x 41 colunas) nos campos fotografados, e foram contabilizadas apenas as gotículas lipídicas coincidentes com as interseções (Figura 2). A

deposição lipídica nos hepatócitos foi expressa em percentagem de área ocupada.

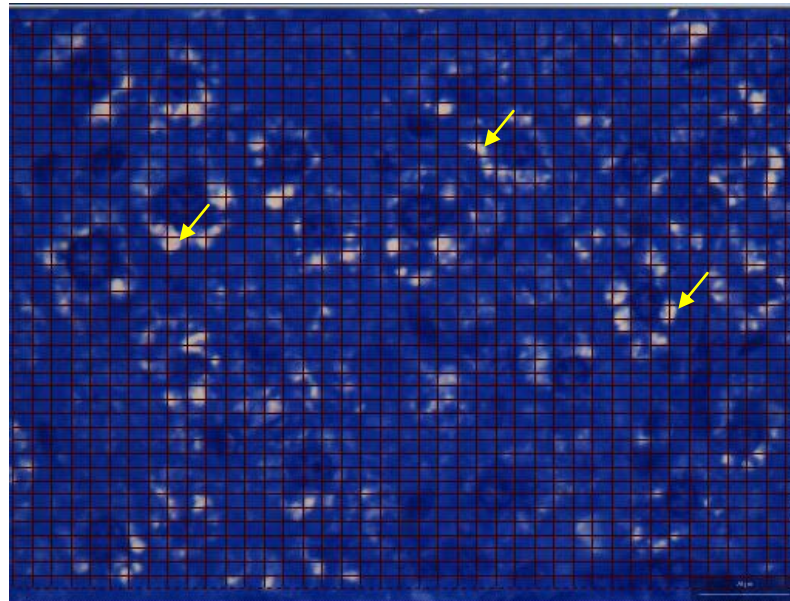


Figura 2: Fotomicrografia de secção histológica do fígado de camundongo apoE<sup>-/-</sup> com sobreposição de uma matriz quadrada padrão. Apenas as gotículas lipídicas coincidentes com as interseções foram contabilizadas. Coloração azul de toluidina/borato de sódio 1%. Barra = 20 μm

### 3.15. Análise histopatológica e morfometria do rim

Para a análise histológica do rim, foram montadas quatro lâminas histológicas por animal, contendo 10 cortes cada. As lâminas foram coradas com Azul de Toluidina/Borato de Sódio 1% (Bancroft & Gamble, 2007), montadas com Entellan® (Merck, Alemanha) e observadas em microscópio de luz. Foram capturadas dez imagens de cada animal (objetiva de 20x), selecionadas para análise morfométrica.

Através das imagens foi quantificado o número de glomérulos e a área de cada glomérulo por campo histológico, pelo software *Image-Pro Plus*® versão 4.5 (Media Cybernetics).

### **3.16. Imunofluorescência para detecção de óxido nítrico sintase induzível (iNOS).**

Inicialmente foram montadas duas lâminas histológicas por animal. Para tanto, utilizou-se lâminas revestidas com adesivo especial que melhoraram a aderência do tecido a esta placa de vidro (ImmunoSlide, EP-51-30185, Erviegas Instrumental Cirúrgico Ltda.). Cada lâmina continha seis cortes da aorta, sendo dois deles utilizados como controle. Foi realizada a desparafinização e reidratação das secções seguida de recuperação antigênica, durante 60 minutos (temperatura de 97,5°C) em solução de EDTA pH: 8.0. Nesta etapa, mesmo com a utilização de *immunoslide*, houve perda de muitos cortes. Após o retorno à temperatura ambiente os cortes foram lavados e permeabilizados 2 vezes de 5 minutos com PBS 0,1M contendo 1% Tween 20 (PBST1%) e bloqueados durante 25 minutos com solução de leite em pó 1% (MOLICO® desnatado, Nestlé Brasil Ltda.) diluído em água destilada. Os cortes foram novamente permeabilizados e lavados 2 vezes de 5 minutos com PBST1%. Sobre cada corte foi adicionado 10 µl de anticorpo primário anti-iNOS (NOS2; H-174) na diluição 1:100 (IgG policlonal de coelho, sc-8310, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), permanecendo *overnight* em câmara úmida escura à 4°C. Nos cortes controle, foi adicionado PBS em substituição ao anticorpo primário. As secções foram novamente permeabilizadas e lavadas 2 vezes de 5 minutos com PBST1%. Em seguida foi adicionado em cada corte 10 µl do anticorpo secundário conjugado com FITC (isotiocianato de fluoresceína) na mesma diluição (IgG de cabra anti-coelho; sc-2012, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), permanecendo sob as mesmas condições anteriores. Os cortes foram



novamente lavados 2 vezes de 5 minutos com PBS e as lâminas foram montadas utilizando meio de montagem contendo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) para coloração dos núcleos (Ultra Cruz Mounting Medium, sc-24941 Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

Como controle positivo, um animal apoE<sup>-/-</sup> foi injetado com lipopolissacarídeo (LPS de *Escherichia coli*) na dose de 2,5 mg/Kg de peso corporal através de injeção intraperitoneal. O animal foi sacrificado após 2 dias e a aorta coletada e processada conforme a mesma metodologia descrita nesta seção (Dias et al., 2010).

A fluorescência foi visualizada em microscópio de fluorescência (BX-50, Olympus), utilizando-se os filtros apropriados. As imagens foram digitalizadas e analisadas com o auxílio dos *softwares* citados anteriormente.

### **3.17. Determinação das Atividades Enzimáticas**

#### **3.17.1. Citrato Sintase (CS)**

Visando comprovar o condicionamento físico e adaptação ao exercício, a atividade da CS foi determinada no músculo sóleo e gastrocnêmico segundo Srere (1969). O método consiste na medida do grupo tiol (SH) pelo uso de 5'5-dithiobis-(2-nitrobenzoato)(DTNB).

Resumidamente, o tecido foi homogeneizado em PBS e a suspensão resultante foi centrifugada por 15 minutos a 12000 g. O sobrenadante foi retirado para mensurar a atividade enzimática. O procedimento iniciou-se pela combinação, em uma cubeta, de 10 µl da amostra, 100 µl de DTNB (1mM de DTNB em 1M Tris-HCl pH 8,1), 810 µl de tampão (1mM de EDTA, Triton X-100 a 0,05%) e 30 µl de Acetil-CoA. A reação da citrato sintase

começa com a adição de 50 µl de oxaloacetato. As reações foram realizadas a 37°C durante 3 min, e a absorvância foi lida a 412 nm em um espectrofotômetro de detecção do ultravioleta. A atividade da CS foi calculada e os dados relatados como micromoles por minuto por miligrama de proteína. A dosagem de proteína nos homogenatos foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951).

### 3.17.2. **Catalase (CAT)**

Para determinar a atividade da CAT, o tecido hepático (100 mg) foi homogeneizado em tampão fosfato 50 mmol.L<sup>-1</sup> e a suspensão resultante foi centrifugada à 3000g à 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para mensuração da atividade enzimática. A atividade da catalase foi determinada pela taxa de decaimento do peróxido de hidrogênio (10 mmol.L<sup>-1</sup>) lido em espectrofotômetro a 240 nm, segundo metodologia de Aebi (1984). A dosagem de proteína nos homogenatos foi realizada por meio do método de Lowry et al. (1951) e os resultados foram expressos em U CAT por miligrama de proteína. O mesmo procedimento foi realizando para o tecido renal.

### 3.17.3. **Superóxido Dismutase (SOD)**

A atividade da SOD foi determinada, segundo Dieterich et al. (2000). A metodologia baseia-se na capacidade desta enzima em catalisar a reação do superóxido O<sub>2</sub><sup>-</sup> à peróxido de hidrogênio, diminuindo assim a razão de auto-oxidação do pirogalol. Basicamente, os tecidos foram homogeneizados em tampão glicina (50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 10,1) e a atividade enzimática foi

estimada (triplicata) pela inibição da auto-oxidação espectrofotometricamente (480nm). A dosagem de proteína nos homogenatos foi realizada por meio do método de Lowroy et al. (1951) e os resultados expressos U SOD por miligrama de proteína. O mesmo procedimento foi realizando para o tecido renal.

### **3.18. Análise estatística**

As variáveis estudadas foram submetidas ao teste de normalidade (Shapiro-wilk) e posteriormente à análise de variância. As comparações entre três ou mais grupos independentes foram realizadas por análise de variância (ANOVA), para dados com distribuição normal, e pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis, para os dados sem distribuição normal. Quando houve diferença estatística, utilizou-se o teste de comparação múltipla de Tukey para os dados paramétricos ou de Dunn, para os dados não paramétricos, para detectar as diferenças entre os grupos. O Teste t foi utilizado em situações que foram comparadas dois grupos independentes. Foi utilizado o programa *SigmaPlot*®, versão 11.0 (Systat© Software, Inc.), para análise estatística e representação dos dados. O valor de p foi fixado em até 5% com o intuito de obter uma confiabilidade de 95% nas comparações. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

#### 4. CAPÍTULO I: Histopatologia de fígado, rim e coração de camundongos apoE<sup>-/-</sup> tratados com nebivolol e exercitados aerobicamente.

##### 4.1. Resumo

**Objetivo:** avaliar se o exercício físico com natação associado ao nebivolol podem influenciar em alterações estruturais no fígado, rins e coração de camundongos apo E<sup>-/-</sup>.

**Métodos:** Vinte e oito camundongos apoE<sup>-/-</sup> com 17 semanas de idade, foram submetidos a 6 semanas de treinamento com natação (60 min/sessão/dia, 5 dias/semana) e tratamento com 2,0 µmol/kg de peso corporal de nebivolol. Os animais foram divididos em 4 grupos: controle: apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e sem exercício (G1, n = 7); apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e sem exercício (G2, n = 7); apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e com exercício (G3, n = 7); apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e com exercício (G4, n = 7). O peso dos animais foi avaliado semanalmente. Ao final do experimento os animais sofreram eutanásia e foram coletados o fígado, o rim e o coração. Os órgãos foram lavados em solução fisiológica e conservados em formol neutro a 10% (pH = 7,0) e após 24 horas transferidos para uma solução de 70% de etanol para as análises histopatológicas. O sangue foi coleta para análise do perfil lipídico e enzimas indicadoras de hepatotoxicidade.

**Resultados:** Não houve diferença estatística entre os grupos quanto a massa corporal e do fígado, perfil lipídico, AST e ALT. A FA foi significativamente maior nos grupos treinados. Nas análises histopatológicas do fígado tanto os grupos treinados quanto os tratados com medicamento apresentaram menor porcentagem de esteatose. No rim os tratamentos não demonstraram alterações no número e área dos glomérulos. G1 e G4 apresentaram um percentual maior de colágeno total que os grupos G2 e G3. Em relação à razão colágeno tipo I/III, não houve diferença significativa entre os grupos.

**Conclusão:** Apenas o nebivolol foi capaz de reduzir o conteúdo de colágeno. Além disso, tanto o medicamento quanto o exercício foram capazes de atuar de forma positiva, reduzindo o acúmulo de gordura no fígado.

**Palavras-chave:** aterosclerose, exercício, medicamento

## Histopathology of liver, kidney and heart in mice apoE<sup>-/-</sup> treated with nebivolol and aerobic exercise.

### 4.2. Abstract

**Purpose:** Evaluate whether swimming training associate to nebivolol may influence structural changes in liver, kidney and heart in mice apo E<sup>-/-</sup>.

**Methods:** Twenty-eight apoE<sup>-/-</sup> mice at the age of 17 weeks were kept on a six weeks of swimming training (60 min / session / day, 5 days / week) and treated with 2.0 mmol / kg body weight of nebivolol. The animals were randomized to the following 4 groups: control: apoE<sup>-/-</sup> without drug and sedentary (G1, n = 7), apoE<sup>-/-</sup> with drug and sedentary (G2, n = 7), apoE<sup>-/-</sup> without drug and exercised (G3, n = 7), apoE<sup>-/-</sup> with drug and exercised (G4, n = 7). Animals' weight was measured weekly. At the end of the experiment the animals were euthanized and liver, kidney and heart were collected. The organs were washed in saline, preserved in 10% neutral formalin (pH 7.0) and transferred after 24 hours to a solution of 70% ethanol for histological analysis. Blood was collected immediately and centrifuged to obtain serum for lipids and hepatotoxicity enzymes analysis.

**Results:** There was no statistical difference between groups for evolution, lipid profile, AST and ALT. The ALP was significantly higher in trained groups. In histopathological analysis, the liver from trained groups and from drug treated groups showed a lower percentage of steatosis. In the kidney, the treatments showed no changes in the number and glomeruli area. G1 and G4 had a higher percentage of total collagen in the heart than G2 and G3. Regarding collagen type I / III reason, there was no significant difference between groups.

**Conclusion:** Only nebivolol was capable of reducing collagen content. Moreover, both the drug as the exercise were able to act positively, reducing fat accumulation in the liver.

**Key words:** atherosclerosis, exercise, nebivolol

### **4.3. Introdução**

A aterosclerose tem impacto indiscutível na mortalidade e morbidade de milhões de indivíduos em países desenvolvidos e em desenvolvimento, dentre os quais o Brasil (Sposito et al., 2007). O desenvolvimento da aterosclerose e conseqüente produção de radicais livres estão associados a mudanças estruturais e funcionais em diversos órgãos afetados pela doença, entre eles fígado, rins e coração (Wu et al., 2007). Apesar dos avanços nas pesquisas envolvendo esta doença, os mecanismos responsáveis pela prevenção, controle e seu tratamento ainda precisam ser mais investigados.

O nebivolol é um antagonista beta 1-seletivo, que tem mostrado aumentar a biodisponibilidade de óxido nítrico derivado do endotélio e atenuar a ativação inflamatória de células endoteliais (Weiss, 2006). Pesquisas em modelo animal para aterosclerose têm mostrado que este medicamento atenua a aterogênese (Kus et al., 2009), podendo ser uma terapia eficaz no controle da lesão aterosclerótica.

A prática regular de exercícios físicos desempenha um papel no controle dos fatores de risco para doenças cardiovasculares e seu efeito benéfico tem sido demonstrado em diversos estudos (Fukao et al., 2010; Kadoglou et al., 2011; Pellegrin et al., 2009a; Pellegrin et al., 2009b). Apesar da evidência que o exercício físico apresenta efeitos na redução e diminuição da evolução e estabilização das placas ateroscleróticas (Fukao et al., 2010), informações relacionadas a locais diferentes dos vasos ainda são limitadas.

A utilização dos modelos que desenvolvem lesões ateroscleróticas espontaneamente, como camundongos que possuem um gene deletado para a apolipoproteína E (apoE<sup>-/-</sup>), auxiliam na evolução das pesquisas. Assim, este modelo animal torna-se um importante instrumento para ampliar o conhecimento sobre os efeitos do exercício físico regular e de medicamentos sobre lesões ateroscleróticas de camundongos apoE<sup>-/-</sup>.

Existe uma lacuna na literatura quanto ao uso do nebivolol associado ao exercício físico no controle das doenças cardiovasculares. Dessa forma, objetivou-se neste estudo, avaliar o efeito do nebivolol e do treinamento físico no processo de regressão da placa aterosclerótica e sua ação no fígado, coração e rins de camundongos adultos apoE<sup>-/-</sup>.

#### **4.4. Metodologia**

##### **4.4.1. Animais e protocolo de experimentação**

Camundongos machos adultos da linhagem *Mus Musculus* apoE<sup>-/-</sup>, com 17 semanas de idade, foram obtidos do Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde (Universidade Federal de Viçosa, Brasil). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, processo nº 101/2011. Os animais foram submetidos a um regime de luminosidade de 12 horas claro/ 12 horas escuro, em ambiente climatizado (23 ± 2 °C), com acesso à dieta e água *ad libitum* durante todo o experimento até completarem a idade de 23 semanas. Vinte e oito camundongos apoE<sup>-/-</sup> foram distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado composto de quatro

tratamentos: controle: apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e sem exercício (G1, n = 7); apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e sem exercício (G2, n = 7); apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e com exercício (G3, n = 7); apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e com exercício (G4, n =7).

#### **4.4.2. Protocolo de exercício físico**

Os grupos exercitados foram submetidos a um programa progressivo de natação de moderada intensidade (Pellegrin et al., 2009a). A natação foi realizada pela manhã, entre 07 e 09 h. Consistia em um período de treinamento de 60 minutos por dia, 05 dias por semana, 01 sessão por dia, com a água mantida constantemente entre 30 e 33°C. Os animais foram treinados progressivamente, iniciando com 10 minutos de treino no primeiro dia, seguido de um acréscimo diário de 5 minutos até o quinto dia. Na semana seguinte os animais iniciaram o treinamento com 40 minutos no primeiro dia, seguido de um acréscimo de 10 minutos até o terceiro dia, onde alcançaram a meta de 60 minutos diários. Após as sessões os animais foram cuidadosamente secos.

#### **4.4.3. Tratamento Medicamentoso**

Os grupos tratados com medicamento receberam por via oral (gavagem) uma dose de 2,0 µmol/kg de peso corporal por dia de cloridrato de nebivolol (Nebilet® 5mg, BIOLAB) diluído em água destilada (Kus et al., 2009; Ozben et al., 2009). Os grupos G1 e G3 receberam a mesma dosagem de solução fisiológica.



#### **4.4.4. Determinação do desenvolvimento dos animais**

##### **✓ Massa corporal**

Ao início de cada semana, os animais foram pesados para obtenção da massa corporal a fim de acompanhar a evolução de cada grupo experimental.

##### **✓ Índice hepatossomático (IH)**

Dados da massa do fígado foram obtidos e expressos como uma porcentagem da massa corporal ((massa fígado em gramas/ massa corporal em gramas) \*100).

#### **4.4.5. Preparação dos tecidos**

Na 23ª semana de vida os animais foram submetidos ao jejum de 12h, e eutanasiados por inalação de CO<sub>2</sub>. Os grupos exercitados sofreram a eutanásia 48 horas após a última sessão de exercício. Foram coletadas amostras de sangue, removidas por punção na aorta abdominal e imediatamente centrifugado a 3000 rpm, por 10 minutos à 4°C. O soro foi retirado e armazenado à -80°C.

Fragmentos do lóbulo caudado do fígado, rim e o coração de cada animal foram lavados em solução tampão fosfato-salino (PBS), em seguida, fixados em formol neutro a 10% (pH 7,0) e após 24 horas transferidos para uma solução de 70% de etanol. Tecidos fixados do fígado e rim foram incluídos em resina enquanto o coração foi incluído em parafina. Após o processamento, o material foi seccionado em micrótomo rotativo.

Os músculos sóleo e gastrocnêmio também foram removidos e mantidos a -80°C para a análise da atividade enzimática da citrato sintase (Srere, 1969), visando avaliar o condicionamento físico e adaptação ao exercício.

#### **4.4.6. Histologia do fígado e do rim**

Fragmentos do fígado e rim incluídos em resina foram cortados em 3 µm de espessura coradas com Azul de Toluidina/Borato de Sódio 1% (Bancroft & Gamble, 2007), as lâminas foram montadas com Entellan® (Merck, Alemanha) e observadas em microscópio de luz (BX-50, Olympus).

Para análise do fígado, foram capturadas dez imagens de cada animal (objetiva de 40x), através de câmara digital de captura (QColor-3, Olympus) acoplada a um sistema computadorizado (Q-Capture Pro 6.0). A quantificação da deposição lipídica presente nos campos histológicos foi realizada utilizando-se o aplicativo *Image-Pro Plus*® versão 4.5 (Media Cybernetics). Padronizou-se a sobreposição de uma matriz quadrada padrão (41 linhas x 41 colunas) nos campos fotografados, e foram contabilizadas apenas as gotículas lipídicas coincidentes com as interseções. A deposição lipídica nos hepatócitos foi expressa em percentagem de área ocupada.

O mesmo procedimento histológico foi feito para o rim, e as imagens capturas utilizando objetiva de 20x para análise morfométrica. Através das imagens foi quantificado o número de glomérulos e a área de cada glomérulo por campo histológico, utilizando o mesmo software.

#### **4.4.7. Histologia do coração**

O coração foi seccionado transversalmente no meio, com a finalidade de isolar os ventrículos. Os fragmentos foram incluídos em parafina, cortados em 7 µm de espessura, corados com *picrosirius red* (Junqueira et al., 1979), as lâminas montadas com Entellan® (Merck, Alemanha) e observadas em microscópio de luz com filtros de polarização. Na região do ventrículo esquerdo três imagens de cada animal foram capturadas (objetiva de 10x).

Para a quantificação do colágeno, padronizou-se a sobreposição de uma matriz quadrada padrão (21 linhas x 21 colunas) nos campos fotografados, e foi contabilizado apenas o colágeno coincidente com as interseções. As fibras que sob a luz polarizada apresentavam coloração amarela, laranja ou vermelho foram consideradas colágeno tipo I, enquanto as que apresentavam cor verde foi considerado colágeno tipo III (Junqueira et al., 1978). Os resultados foram expressos em percentagem de área ocupada.

#### **4.4.8. Determinação dos níveis de lipídios no soro**

Os níveis de Colesterol total (CT), Lipoproteínas de alta densidade (HDL) e Triacilglicerol (TAG) foram determinados por meio de kits comerciais (BIOCLIN, Quibasa Quimica Básica Ltda.) por método enzimático colorimétrico e analisador automático (Cobas Mira Plus, Roche Diagnostic System) pelo Laboratório de Análises Clínicas da Divisão de Saúde/UFV.

#### **4.4.9. Análises das Enzimas Indicadoras de Hepatotoxicidade**

Os níveis de Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST) e Fosfatase alcalina (FA) foram determinados por meio de kits comerciais (BIOCLIN, Quibasa Química Básica Ltda.) por método cinético colorimétrico e analisador automático (Cobas Mira Plus, Roche Diagnostic System) pelo Laboratório de Análises Clínicas da Divisão de Saúde/UFV.

#### **4.4.10. Análise estatística**

As variáveis estudadas foram submetidas ao teste de normalidade (Shapiro-wilk) e posteriormente à análise de variância. As comparações entre três ou mais grupos independentes foram realizadas por análise de variância (ANOVA), para dados com distribuição normal, e pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis, para os dados sem distribuição normal. Quando houve diferença estatística, utilizou-se o teste de comparação múltipla de Tukey para os dados paramétricos ou de Dunn, para os dados não paramétricos, para detectar as diferenças entre os grupos. Foi utilizado o programa *SigmaPlot*®, versão 11.0 (Systat© Software, Inc), para análise estatística e representação dos dados. O valor de p foi fixado em até 5% com o intuito de obter uma confiabilidade de 95% nas comparações. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

## **4.5. Resultados**

### **4.5.1. Evolução dos animais, lipídios plasmáticos e Hepatotoxicidade**

Os resultados referentes a evolução dos animais, lipídios plasmáticos e enzimas indicadoras de hepatotoxicidade podem ser observados na Tabela 2.

Ao fim do experimento, não foi verificada nenhuma diferença entre os tratamentos em relação à massa corporal inicial, final, massa do fígado e índice hepato-somático. O mesmo resultado foi observado quanto ao colesterol total, triacilglicerol e HDL. As enzimas AST e ALT não variaram significativamente entre os grupos, porém a FA apresentou maiores valores nos grupos exercitados.

### **4.5.2. Atividade enzimática da Citrato Sintase (CS)**

No que diz respeito aos efeitos do treinamento, a atividade da CS (Figura 3) foi superior nos grupos exercitados. Os resultados indicam que o programa de treinamento com natação foi suficiente para aumentar a capacidade oxidativa do músculo esquelético (G1 =  $10,1 \pm 1,04$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína, G2 =  $10,07 \pm 1,04$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína, G3 =  $14,32 \pm 0,90$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  proteína, G4 =  $13,51 \pm 1,14$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína,  $p < 0,001$ ).

Tabela 2. Evolução dos animais, concentração de lipídeos no soro e indicadores de hepatotoxicidade nos grupos experimentais.

Parâmetros	Grupos				p
	G1	G2	G3	G4	
Massa inicial, g	26,48± 1,27	27,70 ± 1,30	26,96 ± 1,18	27,88± 0,86	0,143
Massa final, g	25,41± 1,05	26,05 ± 0,80	26,24 ± 1,30	26,10 ± 0,60	0,145
Massa do fígado, g	1,43 ± 0,16	1,40 ± 0,08	1,56 ± 0,14	1,54 ± 0,14	0,115
IH	5,76 ± 0,43	5,39 ± 0,41	5,91 ± 0,36	5,91 ± 0,20	0,142
CT, mg/dl	339,83±39,60	290,00±64,05	345,29±34,78	381,00±80,81	0,064
TAG, mg/dl	83,57±24,08	64,29±21,74	82,29±14,24	77,17±13,57	0,247
HDL, mg/dl	22,50±6,98	24,85±6,84	23,57± 3,15	23,5± 2,35	0,951
AST, U/l	210,71 ± 108,9	154,57 ± 92,27	263,60 ± 107,1	189,14 ± 76,88	0,122
ALT, U/l	125,43 ± 83,75	52,00 ± 12,71	84,83 ± 29,06	72,71 ± 37,06	0,108
FA, U/l	69,14 ± 14,87 <sup>a</sup>	82,29 ± 9,05 <sup>ab</sup>	99,17 ± 10,94 <sup>b</sup>	98,50 ± 13,26 <sup>b</sup>	<0,001

Os dados são apresentados como médias ± desvio padrão. Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) para mesma linha. G1: controle apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e sem exercício; G2: apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e sem exercício; G3: apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e com exercício; G4: apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e com exercício. IH: Índice hepatossomático, CT: Colesterol Total, TAG: Triacilglicerol, HDL: lipoproteína de alta densidade; AST: Aspartato aminotransferase, ALT: Alanina aminotransferase, FA: Fosfatase alcalina.

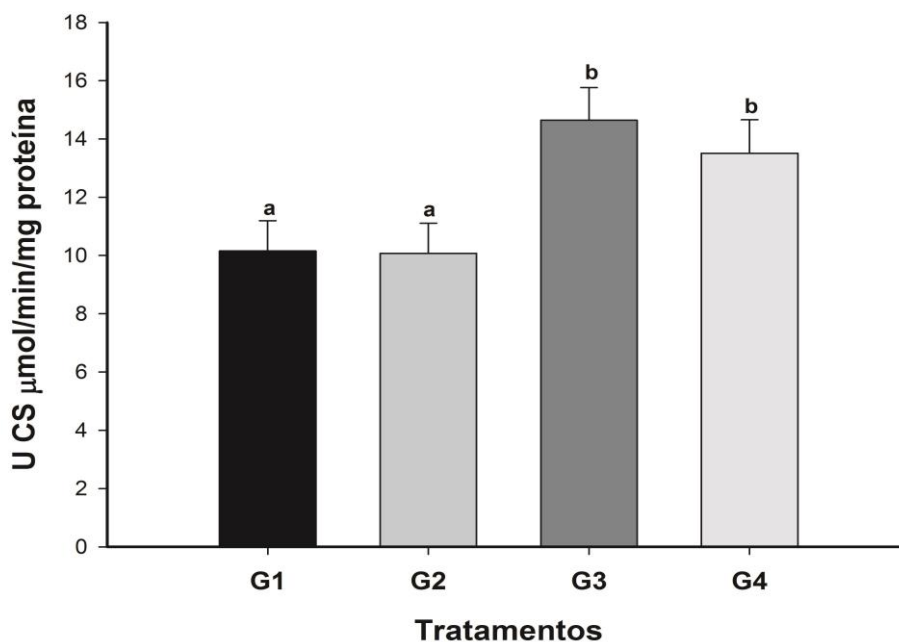


Figura 3: Atividade da CS no músculo esquelético (sóleo/gastrocnêmio). Colunas = médias; Barras de erro = desvio padrão. Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,001$ ). CS: Citrato Sintase, G1: controle apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e sem exercício; G2: apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e sem exercício; G3: apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e com exercício; G4: apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e com exercício.

#### 4.5.3. Esteatose Hepática

O G1 apresentou níveis de esteatose hepática superiores (16,64%) a todos os grupos (6,59% no G2, 7,20% no G3 e 8,39% no G4). Do mesmo modo, o G4 apresentou uma deposição lipídica no fígado maior que os grupos G2 e G3 (Figura 6,7,  $p < 0,001$ ).

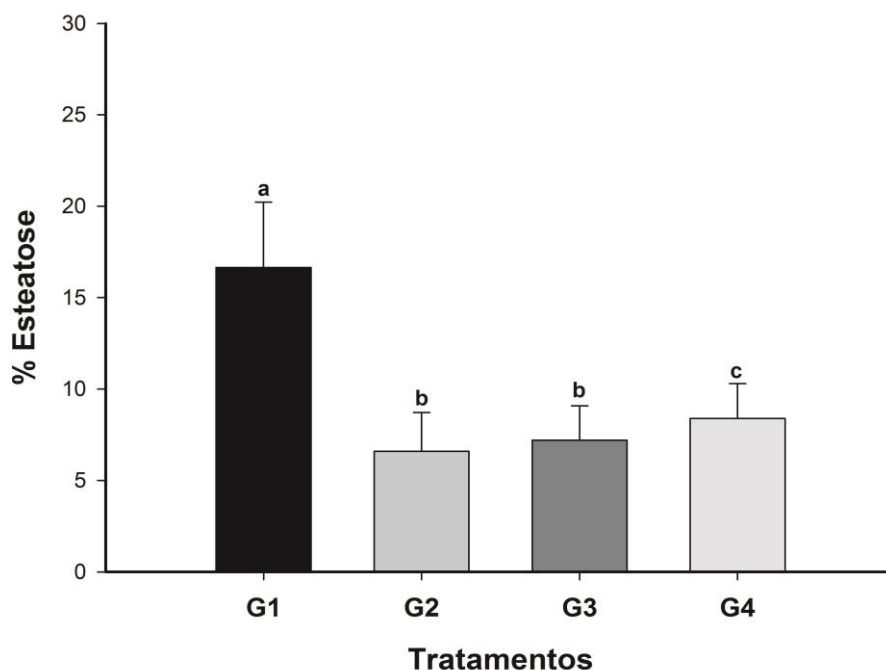


Figura 6: Percentual de esteatose hepática.

Colunas = médias; Barras de erro = desvio padrão. Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,001$ ). G1: controle apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e sem exercício; G2: apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e sem exercício; G3: apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e com exercício; G4: apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e com exercício.

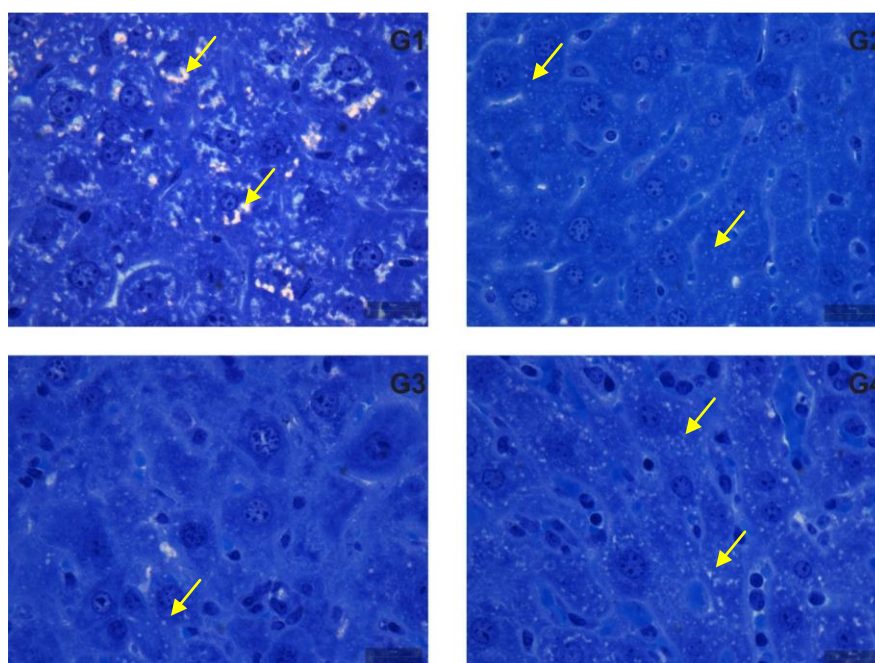


Figura 7: Fotomicrografias representativas do fígado.

G1: controle apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e sem exercício; G2: apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e sem exercício; G3: apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e com exercício; G4: apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e com exercício. As setas indicam gotículas lipídicas. Azul de Toluidina/Borato de Sódio 1%. Barra: 20  $\mu$ m.



#### 4.5.4. Morfometria dos glomérulos

Na tabela 3 são mostrados a área e o número de glomérulos em relação aos diferentes tratamentos. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos

#### 4.5.5. Quantificação do colágeno no coração

G1 e G4 apresentaram um percentual maior de colágeno total (6,12% no G1 e 5,99% no G4) que os grupos G2 e G3 (4,12% no G2, 4,83% no G3; Tabela 4,  $p < 0,001$ ). Em relação à razão colágeno tipo I/III, não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 3. Morfometria de glomérulos nos grupos experimentais.

	Grupos				p
	G1	G2	G3	G4	
Área do glomérulo, $\mu\text{m}^2$	5254,39 $\pm$ 2770,93	5394,69 $\pm$ 2123,42	5696,247 $\pm$ 2375,39	5291,56 $\pm$ 2268,78	0,054
Quantidade de glomérulos, U	2,07 $\pm$ 0,80	1,90 $\pm$ 0,73	2,27 $\pm$ 0,95	2,09 $\pm$ 0,93	0,145

Os dados são apresentados como médias  $\pm$  desvio padrão. G1: controle apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e sem exercício; G2: apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e sem exercício; G3: apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e com exercício; G4: apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e com exercício.

Tabela 4. Conteúdo de colágeno no coração nos grupos experimentais.

	Grupos				p
	G1	G2	G3	G4	
Fração de colágeno (%)	6,12 ± 2,18 <sup>b</sup>	4,12 ± 1,68 <sup>a</sup>	4,83 ± 1,93 <sup>ab</sup>	5,99 ± 1,76 <sup>b</sup>	<0,001
Razão Colágeno I/III	1,45 ± 0,93	1,32 ± 0,70	1,05 ± 0,61	1,38 ± 0,16	0,376

Os dados são apresentados como médias ± desvio padrão. G1: controle apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e sem exercício; G2: apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e sem exercício; G3: apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e com exercício; G4: apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e com exercício.

#### 4.6. Discussão

Os resultados do desenvolvimento do animal não diferiram entre os grupos. Estes dados mostraram que o uso do medicamento e o treinamento físico não foram capazes de interferir nestes parâmetros.

Não houve diferença significativa para os valores de CT, TAG e HDL entre os grupos experimentais. Dados semelhantes para o CT e TAG foram encontrados por Kus et al. (2009) ao investigar o efeito do nebivolol no mesmo modelo animal. Outros pesquisadores também relataram a inexistência de diferença significativa quando o exercício com natação foi realizado (Kadoglou et al., 2011; Pellegrin et al., 2007). Este fato pode estar relacionado ao modelo animal, uma vez que este é específico para desenvolvimento de lesões ateroscleróticas. Além disso, o tempo de estudo pode não ter sido suficiente para desenvolver uma alteração significativa no parâmetro lipídico do sangue.

Os testes de função hepática constituem uma forma de estudar o fígado e as suas possíveis alterações funcionais. A AST, a ALT e a FA são

enzimas envolvidas no metabolismo de aminoácidos. Suas alterações permitem a identificação de danos nos tecidos em órgãos como o fígado, além de monitorar efeitos secundários ao medicamento. Neste trabalho, não foram identificadas diferenças entre os grupos em relação a AST e ALT. No entanto, constatou-se um aumento significativo na atividade da FA nos animais submetidos ao exercício físico, o que pode ser indicativo de alteração do metabolismo ósseo, uma vez que os valores não atingem níveis patológicos. Uma elevação dos níveis de FA no soro sugere um aumento da atividade dos osteoblastos (Mayr-Wohlfart et al., 2001) e pode ser observada recentemente em um trabalho realizado com ratos Wistar exercitado em esteira (Shun-cheng et al., 2012).

O treinamento físico também resultou em uma melhora da capacidade do músculo esquelético, como evidenciado pelo aumento da atividade enzimática da citrato sintase. Estes dados estão de acordo Pellegrin et al. (2009a), indicando que o treinamento foi eficiente em provocar uma melhora no metabolismo oxidativo do músculo.

De acordo com Targher et al. (2010), evidências indicam uma forte associação entre o acúmulo de gordura no fígado e doenças cardiovasculares. De forma consistente com esses dados, os animais tratados tanto com medicamento quanto com exercício apresentaram uma porcentagem de esteatose hepática significativamente inferior ao grupo controle, demonstrando que o tratamento desempenhou um papel importante em prevenir o acúmulo de gordura no fígado. Em nosso laboratório, resultados semelhantes foram obtidos por Castro (2011), que ao testar a dieta com açaí e o treinamento físico em esteira, observou menor

porcentagem de esteatose hepática nos grupos treinados. A falta de dados torna difícil oferecer recomendações definitivas que são limitadas ao controle dos fatores de risco para doenças cardiovasculares (Targher et al., 2010).

Segundo Foley & Collins (2011) a doença renal crônica é comum, geralmente silenciosa e associada a doenças cardiovasculares. Neste trabalho, nenhuma alteração significativa foi observada entre os grupos quanto a área transversal e número de glomérulos. Os trabalhos que relacionaram exercício físico e doença renal ainda são controversos. Pinheiro-Mulder et al. (2010), observaram um aumento do volume glomerular em animais obesos sedentários quando comparados aos exercitados aerobicamente. No entanto, Boor et al. (2009) relataram a ausência de diferenças significativas ao realizar exercício aeróbico moderado em animais obesos e diabéticos. Do mesmo modo que o exercício físico, trabalhos que relacionaram nebivolol são escassos, controversos e concentram-se na melhora (Toblli et al., 2011) ou não da função renal com o uso do medicamento (Shaw et al., 2005).

No presente estudo, a razão colágeno I/III não apresentou diferença significativa, porém observou-se que a quantidade total de colágeno foi inferior no grupo tratado com nebivolol. Resultados semelhantes foram obtidos por Toblli et al. (2010) que observaram uma diminuição do conteúdo de colágeno tipo I e III no coração de ratos obesos e diabéticos. Já o grupo exercitado e o exercitado e medicado não apresentaram reduções significativas do colágeno total em relação ao grupo controle. Os benefícios do exercício na melhora da função cardíaca são bem estabelecidos, no entanto, estudos ainda são controversos ao avaliarem o conteúdo de

colágeno no coração. Singh & Krishan(2010) não observaram diferença significativa no conteúdo de colágeno de ratos alimentados com dieta hiperlipídica, enquanto Kwak et al (2011) relataram que o exercício físico reduziu a elevação de fibras de colágeno tipo I associada a idade.

Algumas limitações do presente estudo podem ser mencionadas. Primeiro, um protocolo de treinamento de maior duração poderia ser utilizado no estudo. Em segundo lugar, falta uma avaliação da função renal e miocárdica. Assim, não podemos fazer qualquer conclusão sobre as mudanças no desempenho do miocárdio e dos rins após as intervenções.

#### **4.7. Conclusões**

A partir dos dados apresentados, os achados mais significantes deste estudo concentram-se na prevenção da progressão da lesão aterosclerótica e a redução do conteúdo de colágeno pelo nebivolol. Além disso, tanto o medicamento quanto o exercício foram capazes de atuar de forma positiva reduzindo o acúmulo de gordura no fígado. Até o momento, no entanto, ainda há uma lacuna na literatura sobre as possíveis interações do nebivolol com atividade física e mais estudos são necessários.

## 5. CAPÍTULO II: Expressão de iNOS na adventícia e potencial antioxidante em camundongos apoE<sup>-/-</sup> submetidos a treinamento com natação e tratados com nebulolol.

### 5.1. Resumo

**Objetivo:** avaliar se o exercício físico com natação e o nebulolol podem influenciar o processo aterosclerótico, expressão de iNOS e capacidade oxidativa em camundongos.

**Métodos:** Vinte e oito camundongos apoE<sup>-/-</sup> com 17 semanas de idade, foram submetidos a 6 semanas de treinamento com natação (60 min/sessão/dia, 5 dias/semana) e tratamento com 2,0 µmol/kg de peso corporal de nebulolol. Os animais foram divididos em 4 grupos: controle: apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e sem exercício (G1, n = 7); apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e sem exercício (G2, n = 7); apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e com exercício (G3, n = 7); apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e com exercício (G4, n = 7). Ao final do experimento os animais sofreram eutanásia e o fígado e o rim foram coletados e mantidos a -80 °C. A aorta foi retirada, lavada em solução fisiológica e conservados em formol neutro a 10% (pH = 7,0) e após 24 horas transferidos para uma solução de 70% de etanol para as análises histopatológicas e de imunofluorescência.

**Resultados:** A estenose no lúmen da raiz aórtica foi menor no G2 em relação ao G1. A expressão da iNOS na aorta do animais de todos os grupos ocorreu essencialmente na camada adventícia da artéria. A atividade da CAT no fígado foi significativamente inferior nos grupos treinados. A atividade da SOD no fígado no grupo G3 foi inferior em relação aos grupos não treinados. Não houve diferença significativa na atividade enzimática de SOD e CAT no rim.

**Conclusão:** Apenas o nebulolol foi capaz de reduzir a área das lesões ateroscleróticas e a expressão da iNOS ocorreu na camada adventícia da artéria de todos os grupos. Além disso, o exercício atuou reduzindo a atividade antioxidante de SOD e CAT no fígado nos grupos treinados.

**Palavras-chave:** aterosclerose, exercício, estresse oxidativo.

**iNOS expression in adventitia and antioxidant potential in mice apoE<sup>-/-</sup>  
undergo swimming training and nebivolol treatment.**

**5.2. Abstract**

**Purpose:** evaluate the effect of swimming exercise and nebivolol treatment in atherosclerotic process, iNOS expression and oxidative capacity of mice apoE<sup>-/-</sup>.

**Methods:** Twenty-eight apoE<sup>-/-</sup> mice at the age of 17 weeks were kept on a six weeks of swimming training (60 min / session / day, 5 days / week) and treated with 2.0 mmol / kg body weight of nebivolol. The animals were randomized to the following 4 groups: control: apoE<sup>-/-</sup> without drug and sedentary (G1, n = 7), apoE<sup>-/-</sup> with drug and sedentary (G2, n = 7), apoE<sup>-/-</sup> without drug and exercised (G3, n = 7), apoE<sup>-/-</sup> with drug and exercised (G4, n = 7). At the end of the experiment the animals were euthanized and liver and kidney were collected and kept at -80 °C. Aorta was removed, washed in saline and preserved in 10% neutral formalin (pH 7.0) and transferred after 24 hours to a solution of 70% ethanol for histological and immunofluorescence analysis.

**Results:** The lumen stenosis of the aortic root was lower in G2 compared to G1. iNOS expression in aorta of animals occurred primarily in the adventitia layer of the artery in all groups. CAT activity in the liver was significantly lower in trained groups. SOD activity in G3 group was lower compared to the untrained group. There was no significant difference in SOD and CAT enzymatic activity in the kidney.

**Conclusion:** Only nebivolol was capable of reducing atherosclerotic lesions area and iNOS expression occurred in the adventitia layer of the artery from all groups. Moreover, exercise acted reducing SOD and CAT antioxidant activity in the liver in trained groups.

**Key words:** atherosclerosis, exercise, nebivolol, iNOS, oxidative stress

### 5.3. Introdução

A aterosclerose é um processo patológico complexo nas paredes dos vasos sanguíneos, que se desenvolve ao longo de muitos anos, e a inflamação desempenha um papel importante nessa doença.

Em condições patológicas, a superprodução de óxido nítrico ocorre após uma indução e expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em resposta a agentes inflamatórios (Pautz et al., 2010). O uso de mecanismos que podem inibir a atividade dessa enzima podem ser ferramentas importantes como foco terapêutico no processo inflamatório.

O nebivolol é um antagonista beta 1-seletivo, que tem mostrado aumentar a biodisponibilidade de óxido nítrico derivado do endotélio e atenuar a ativação inflamatória de células endoteliais (Weiss, 2006). Pesquisa em modelo animal tem mostrado que o nebivolol regula a expressão de iNOS e alivia o estresse oxidativo na isquemia cerebral (Heeba & El-Hanafy, 2012) e atenua a aterogênese (Kus et al., 2009), podendo ser uma terapia eficaz no controle da lesão aterosclerótica.

O papel protetor do exercício regular contra a aterosclerose tem sido destacado por diversos autores (Gleeson et al., 2011; Kadoglou et al., 2011; Pellegrin et al., 2009b). A literatura fornece evidência que o exercício físico apresenta efeitos na redução e estabilização das placas ateroscleróticas (Fukao et al., 2010), porém há poucas informações relacionando-o a expressão de iNOS na aterogênese.

Atualmente, não existem pesquisas abordando a combinação do tratamento com nebivolol e exercício físico de natação como possíveis



moduladores da atividade e/ou indução da iNOS e capacidade oxidativa no processo aterogênico. O uso destes agentes pode ser uma ferramenta útil como foco terapêutico em vários processos inflamatórios.

A maioria das recentes descobertas são derivados de experimentos realizados em modelos animais que desenvolvem a aterosclerose, como o camundongo apoE<sup>-/-</sup>. Dessa forma, objetivou-se neste estudo, avaliar o efeito do nebivolol associado ao treinamento físico no processo de regressão da placa aterosclerótica, expressão de iNOS e capacidade oxidativa de camundongos adultos apoE<sup>-/-</sup>.

## **5.4. Metodologia**

### **5.4.1. Animais e protocolo de experimentação**

Camundongos machos adultos da linhagem *Mus Musculus* apoE<sup>-/-</sup>, com 17 semanas de idade, foram obtidos do Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde (Universidade Federal de Viçosa, Brasil). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, processo nº 101/2011. Os animais foram submetidos a um regime de luminosidade de 12 horas claro/ 12 horas escuro, em ambiente climatizado (23 ± 2°C), com acesso à dieta e água *ad libitum* durante todo o experimento até completarem a idade de 23 semanas. Vinte e oito camundongos apoE<sup>-/-</sup> foram distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado composto de quatro tratamentos: controle: apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e sem exercício (G1, n = 7); apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e sem exercício (G2, n = 7); apoE<sup>-/-</sup> sem

medicamento e com exercício (G3, n = 7); apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e com exercício (G4, n = 7).

#### **5.4.2. Protocolo de exercício físico**

Os grupos exercitados foram submetidos a um programa progressivo de natação de moderada intensidade (adaptado de Pellegrin et al., 2009a). Resumidamente, a natação foi realizada pela manhã, entre 07 e 09 h. Consistia em um período de treinamento de 60 minutos por dia, 05 dias por semana, 01 sessão por dia, com a água mantida constantemente entre 30 e 33°C. Os animais foram treinados progressivamente, iniciando com 10 minutos de treino no primeiro dia, seguido de um acréscimo diário de 5 minutos até o quinto dia. Na semana seguinte os animais iniciaram o treinamento com 40 minutos no primeiro dia, seguido de um acréscimo de 10 minutos até o terceiro dia, onde alcançaram a meta de 60 minutos diários. Após as sessões os animais eram cuidadosamente secos.

#### **5.4.3. Tratamento Medicamentoso**

Os grupos tratados com medicamento receberam por via oral (gavagem) uma dose de 2,0 µmol/kg de peso corporal por dia de cloridrato de nebivolol diluído em água destilada (Kus et al., 2009; Ozben et al., 2009). Os grupos G1 e G3 receberam a mesma dosagem de solução fisiológica.

#### **5.4.4. Preparação dos tecidos**

Na 23ª semana de vida os animais foram submetidos ao jejum de 12h, e eutanasiados por inalação de CO<sub>2</sub>. Os grupos exercitados sofreram a

eutanásia 48 horas após a última sessão de exercício. A aorta de cada animal foi lavada em solução tampão fosfato-salino (PBS), em seguida, fixada em formol neutro a 10% (pH 7,0) e após 24 horas transferida para uma solução de 70% de etanol. Posteriormente, a aorta fixada foi incluída em parafina e após o processamento, o material foi seccionado em micrótomo rotativo.

Parte do fígado e o rim foram removidos e mantidos a -80°C até a análise. Os músculos sóleo e gastrocnêmio também foram removidos e mantidos a -80°C para a análise da atividade enzimática da citrato sintase (CS; Srere 1969), visando avaliar o condicionamento físico e adaptação ao exercício.

#### **5.4.5. *Quantificação das lesões na aorta***

A aorta de cada animal foi desacoplada do coração e limpa, sendo retirados os tecidos conjuntivos e os gordurosos associados à parte externa da artéria. O tecido foi incluído em parafina, cortado em 7 µm de espessura, separados por no mínimo 28 µm e corado com Tricrômico de Masson (modificado por Mallory; Tolosa et al., 2003). As lâminas foram montadas com Entellan® (Merck, Alemanha) e observadas em microscópio de luz.

Na região da raiz aórtica, caracterizada pela presença da valva aórtica, cinco imagens de cada animal foram capturadas (objetiva de 4x). Em cada secção a área relativa da placa (estenose luminal) foi determinada como porcentagem de área da lesão por área da luz (Kadoglou et al., 2011; Van Vré et al., 2007). As medidas foram realizadas utilizando o *software* de

análise de imagem computadorizada (*Image Pro Plus versão 4.5; Media Cybernetics, Sarasota, Florida, EUA*).

#### **5.4.6. Análise de imunofluorescência**

Secções do arco aórtico (7  $\mu$ m) incluídos em parafina foram desparafinizadas e reidratadas, seguida de recuperação antigênica, durante 60 minutos (temperatura de 97,5°C) em solução tampão de EDTA pH 8.0. Após o retorno à temperatura ambiente os cortes foram lavados e permeabilizados 2 x 5 minutos com PBS 0,1M contendo 1% Tween 20 (PBST1%) e bloqueados durante 25 minutos com solução de leite em pó 1% (MOLICO® desnatado, Nestlé Brasil Ltda.) diluído em água destilada. Os cortes foram novamente permeabilizados e lavados 2 x 5 minutos com PBST1%. Para marcação de iNOS, foi adicionada sobre cada corte 10  $\mu$ l de anticorpo primário anti-iNOS (NOS2; H-174) na diluição 1:100 (IgG policlonal de coelho, sc-8310, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), permanecendo *overnight* em câmara úmida escura à 4°C. As secções foram novamente permeabilizadas e lavadas 2 x 5 minutos com PBST1%. Em seguida foi adicionado em cada corte 10  $\mu$ l do anticorpo secundário conjugado com FITC (isotiocianato de fluoresceína) na mesma diluição (IgG de cabra anti-coelho; sc-2012, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), permanecendo sob as mesmas condições anteriores. Os cortes foram novamente lavados 2 x 5 minutos com PBS e as lâminas foram montadas utilizando meio de montagem contendo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) para coloração dos núcleos (Ultra Cruz Mounting Medium, sc-24941 Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

Como controle positivo, um animal apoE<sup>-/-</sup> foi injetado com lipopolissacarídeo (LPS de *Escherichia coli*) na dose de 2,5 mg/Kg de peso corporal através de injeção intraperitoneal. O animal foi sacrificado após 2 dias e a aorta coletada e processada conforme a mesma metodologia descrita nesta seção (Dias et al., 2010).

A fluorescência foi visualizada em microscópio de fluorescência (BX-50, Olympus) utilizando-se os filtros apropriados. As imagens foram digitalizadas e analisadas com o auxílio dos *softwares* citados anteriormente.

#### **5.4.7. Catalase (CAT)**

Para determinar a atividade da CAT, o tecido hepático (100mg) foi homogeneizado em tampão fosfato 50 mmol.L<sup>-1</sup> e a suspensão resultante foi centrifugada à 3000g à 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para mensuração da atividade enzimática. A atividade da catalase foi determinada pela taxa de decaimento do peróxido de hidrogênio (10 mmol.L<sup>-1</sup>) lido em espectrofotômetro a 240 nm, segundo metodologia de Aebi (1984). A dosagem de proteína nos homogenatos foi realizada por meio do método de Lowry et al. (1951) e os resultados foram expressos em U CAT por miligrama de proteína. O mesmo procedimento foi realizando para o tecido renal.

#### **5.4.8. Superóxido Dismutase (SOD)**

A atividade da SOD foi determinada, segundo Dieterich et al. (2000). A metodologia baseia-se na capacidade desta enzima em catalisar a reação do superóxido O<sub>2</sub><sup>-</sup> à peróxido de hidrogênio, diminuindo assim a razão de

auto-oxidação do pirogalol. Basicamente, o tecido foram homogeneizados em tampão glicina (50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 10,1) e a atividade enzimática foi estimada (triplicata) pela inibição da auto-oxidação espectrofotometricamente (480nm). A dosagem de proteína nos homogenatos foi realizada por meio do método de Lowroy et al. (1951) e os resultados expressos em U SOD por miligrama de proteína. O mesmo procedimento foi realizando para o tecido renal.

#### **5.4.9. Análise estatística**

As variáveis estudadas foram submetidas ao teste de normalidade (Shapiro-wilk) e posteriormente à análise de variância. As comparações entre três ou mais grupos independentes foram realizadas por análise de variância (ANOVA), para dados com distribuição normal, e pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis, para os dados sem distribuição normal. Quando houve diferença estatística, utilizaram-se os testes de comparações múltiplas de Tukey para os dados paramétricos ou de Dunn, para os dados não paramétricos, para detectar as diferenças entre os grupos. O Teste t foi utilizado em situações que foram comparadas dois grupos independentes. Foi utilizado o programa *SigmaPlot*®, versão 11.0 (*Systat*® Software, Inc), para análise estatística e representação dos dados. O valor de p foi fixado em até 5% com o intuito de obter uma confiabilidade de 95% nas comparações. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

## 5.5. Resultados

### 5.5.1. Atividade enzimática da CS

A atividade da citrato sintase foi superior nos grupos exercitados. Os resultados indicaram que o programa de treinamento com natação foi suficiente para aumentar a capacidade oxidativa do músculo esquelético (Sedentário =  $10,12 \pm 0,99$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína, Exercitado =  $14,08 \pm 1,23$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  proteína,  $p < 0,001$ ).

### 5.5.2. Quantificação da Aterosclerose

O grau de estenose luminal foi significativamente menor (Figura 8,9,  $p = 0,045$ ) no grupo tratado com medicamento em comparação com o controle ( $12,57\%$  no G1 e  $6,31\%$  no G2).

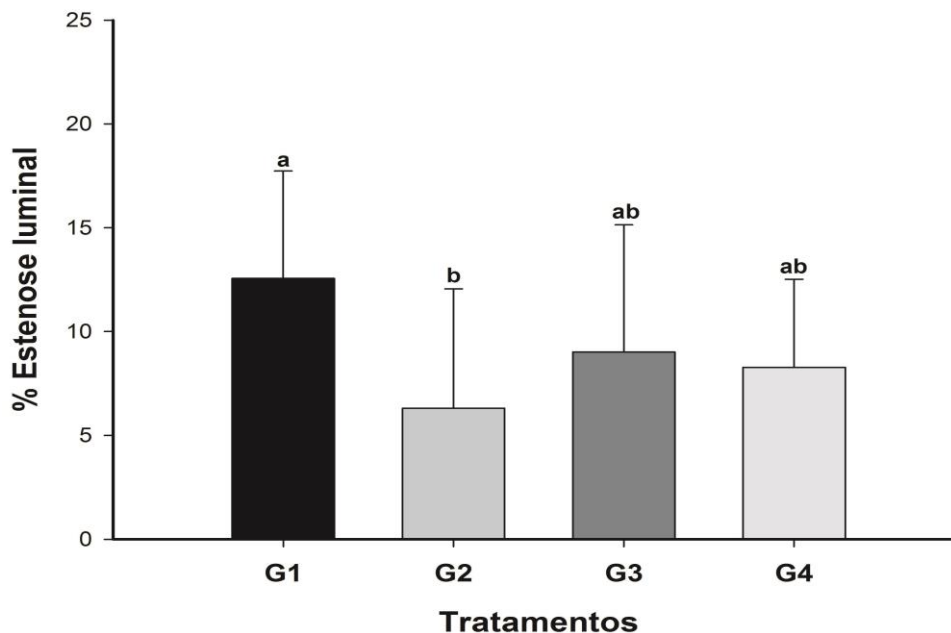


Figura 8: Percentual de área lesionada ocupando o lúmen. Colunas = médias; Barras de erro = desvio padrão. Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). G1: controle apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e sem exercício; G2: apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e sem exercício; G3: apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e com exercício; G4: apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e com exercício.

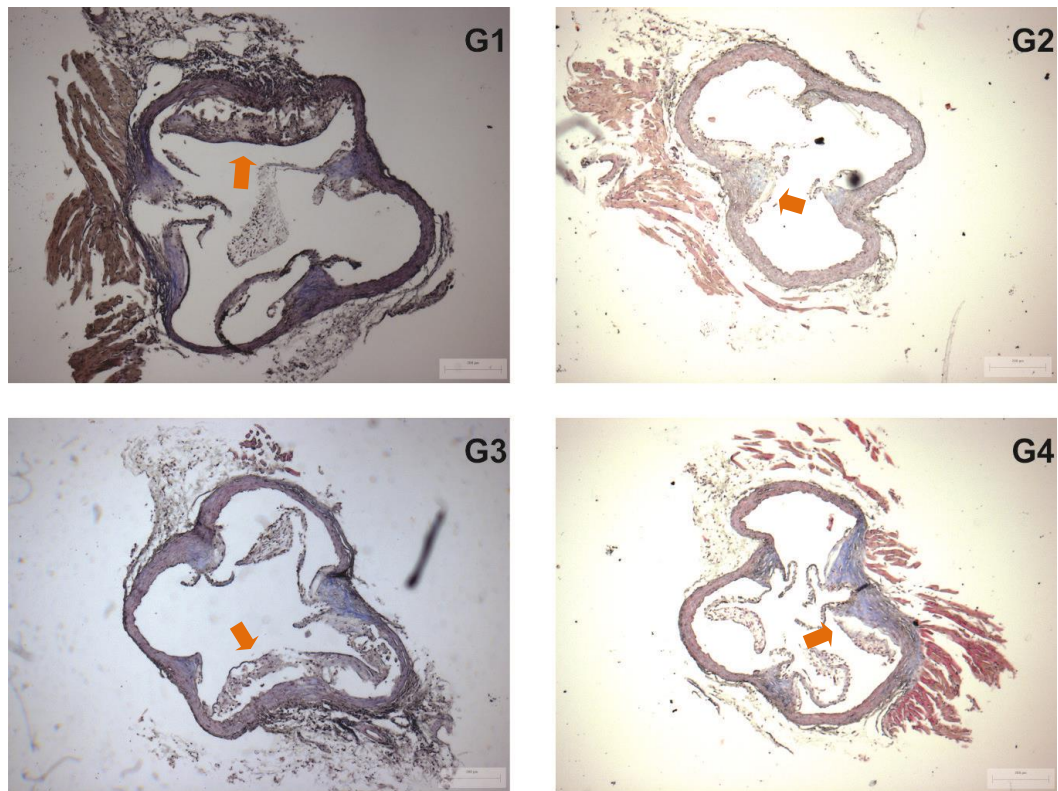


Figura 9: Fotomicrografia representativas da raiz aórtica. G1: controle apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e sem exercício; G2: apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e sem exercício; G3: apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e com exercício; G4: apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e com exercício. As setas indicam as lesões ateroscleróticas, Tricrômico de Masson, Barra: 200 µm.

### 5.5.3. *Expressão e localização da iNOS*

A Figura 10 mostra que a iNOS foi expressa em todos os tratamentos, localizando-se essencialmente na camada adventícia da artéria. A aorta de animais apoE<sup>-/-</sup> injetados com LPS foram usadas como controle, confirmando a expressão de iNOS.



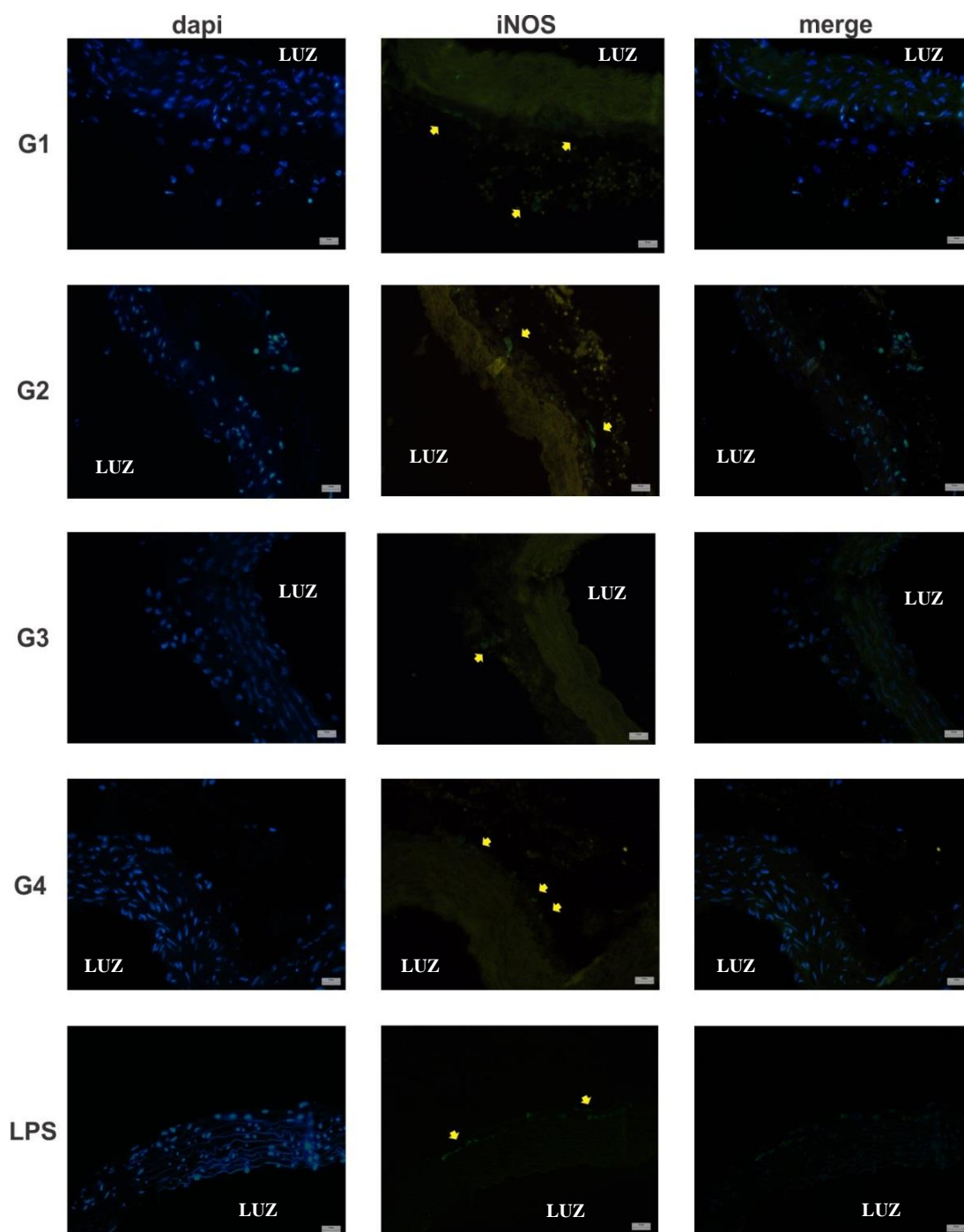


Figura 10: Expressão de iNOS detectada por imunofluorescência nos grupos experimentais.

G1: controle apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e sem exercício; G2: apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e sem exercício; G3: apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e com exercício; G4: apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e com exercício, apoE<sup>-/-</sup> injetado com LPS. Os núcleos foram corados com DAPI (azul, primeira imagem à esquerda), e a iNOS foi corada com FITC (verde, segunda imagem). A terceira imagem (merge) representa a sobreposição das duas primeiras. As setas indicam as marcações de iNOS. Barra: 20 µm.

Além de confirmar a presença da iNOS, pôde-se demonstrar que esta enzima estava localizada no citoplasma e co-localizada com os núcleos celulares (Figura 11).

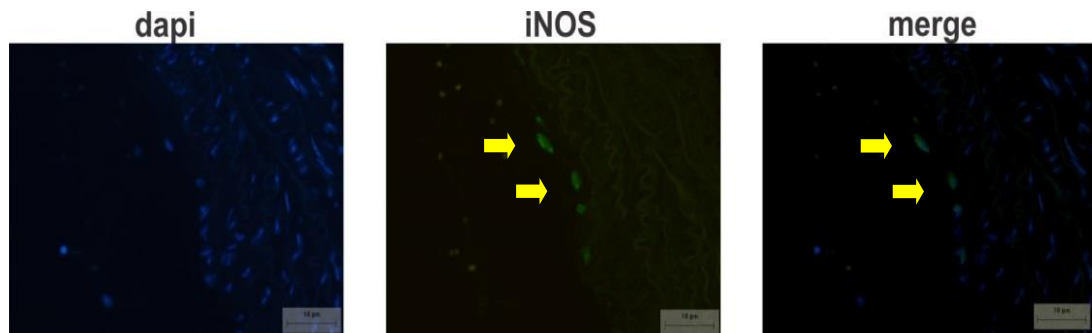


Figura 11: Expressão de iNOS detectada por Imunofluorescência no citoplasma e núcleo celular. Os núcleos foram corados DAPI (azul, primeira imagem à esquerda), e a iNOS foi corada com FITC (verde, segunda imagem). A terceira imagem (merge) representa a sobreposição das duas primeiras. As setas indicam as marcações de iNOS. Barra: 10  $\mu$ m

#### 5.5.4. *Atividade das enzimas antioxidantes no fígado*

A capacidade antioxidante no fígado foi investigada através da quantificação da atividade enzimática da CAT e da SOD. O exercício físico com natação foi capaz de provocar uma alteração significativa na atividade da CAT (figura 12) e da SOD (figura 13).

A atividade da CAT foi significativamente superior ( $p < 0,001$ ) nos grupos que não participaram do protocolo de treinamento ( $9,89 \pm 0,94 \text{ U.mg}^{-1}$  de proteína no G1 e  $10,70 \pm 1,15 \text{ U.mg}^{-1}$  no G2 )em relação aos grupos treinados ( $6,45 \pm 0,66 \text{ U.mg}^{-1}$  de proteína no G3 e  $6,81 \pm 1,30 \text{ U.mg}^{-1}$  no G4).

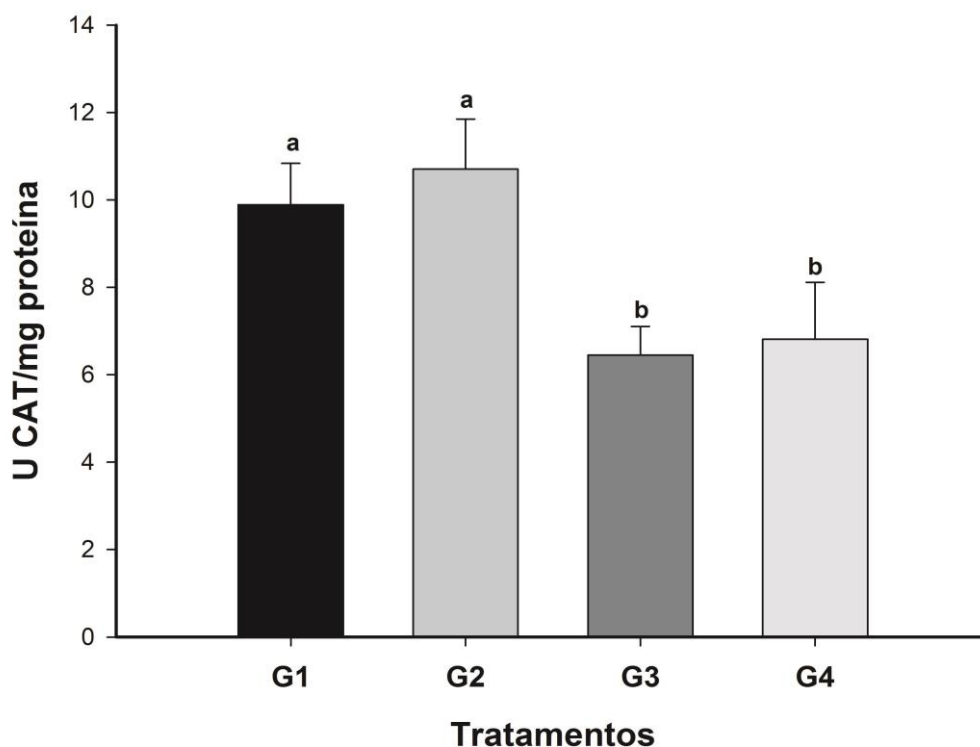


Figura 12: Atividade da enzima CAT ( $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína) no fígado. Colunas = médias; Barras de erro = desvio padrão. Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,001$ ). G1: controle apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e sem exercício; G2: apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e sem exercício; G3: apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e com exercício; G4: apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e com exercício.

Para atividade da SOD, apenas o grupo exercitado G3 ( $22,07 \pm 4,55 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína) apresentou atividade enzimática significativamente menor ( $p = 0,019$ ) em relação aos grupos não treinados ( $30,90 \pm 7,43 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína no G1;  $31,74 \pm 4,45 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína no G2).

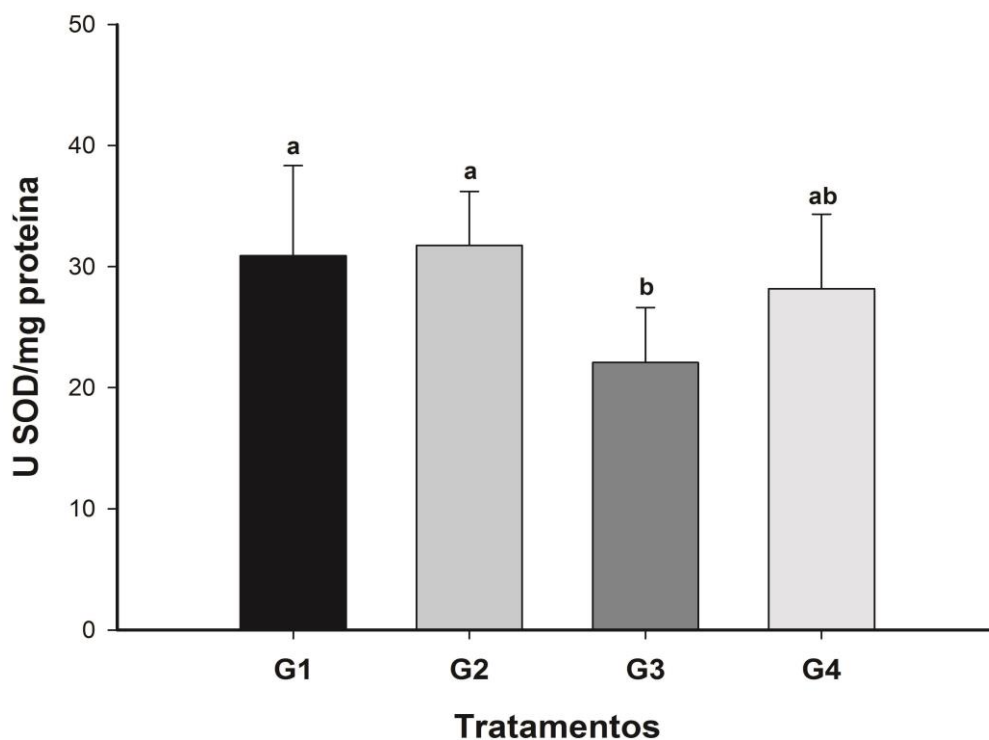


Figura 13: Atividade da enzima SOD ( $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína) no fígado. Colunas = médias; Barras de erro = desvio padrão. Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,001$ ). G1: controle  $\text{apoE}^{-/-}$  sem medicamento e sem exercício; G2:  $\text{apoE}^{-/-}$  com medicamento e sem exercício; G3:  $\text{apoE}^{-/-}$  sem medicamento e com exercício; G4:  $\text{apoE}^{-/-}$  com medicamento e com exercício.

#### 5.5.5. Atividade das enzimas antioxidantes no rim.

A capacidade antioxidante no rim foi investigada por meio da quantificação da atividade enzimática da CAT e da SOD. O exercício físico com natação e o tratamento medicamentoso com nebivolol não foram capazes de provocar uma alteração significativa na atividade enzimática da CAT e da SOD (Tabela 5).

Tabela 5. Atividade da enzima catalase e superóxido dismutase no rim dos animais dos grupos experimentais.

	Grupos				p
	G1	G2	G3	G4	
CAT, U.mg <sup>-1</sup> de proteína	5,02 ± 0,94	4,98 ± 0,41	4,96 ± 0,45	4,22 ± 0,70	0,158
SOD, U.mg <sup>-1</sup> de proteína	9,18 ± 2,25	8,79 ± 2,38	12,10 ± 5,33	9,28 ± 4,82	0,358

Os dados são apresentados como médias ± desvio padrão. CAT: Catalase; SOD: Superóxido dismutase. G1: controle apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e sem exercício; G2: apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e sem exercício; G3: apoE<sup>-/-</sup> sem medicamento e com exercício; G4: apoE<sup>-/-</sup> com medicamento e com exercício.

## 5.6. Discussão

A aterosclerose é considerada uma doença inflamatória crônica que resulta na formação de placas nas artérias de grande e médio porte (Legein et al., 2013). Fatores como dislipidemia, sedentarismo, envelhecimento, diabetes, hipertensão, estão envolvidos na doença (Gu et al., 2012). Neste estudo utilizou-se do camundongo apoE<sup>-/-</sup> para investigar o efeito do tratamento medicamentoso com nebivolol e treinamento físico com natação no desenvolvimento da doença.

Para testar a adaptação do músculo esquelético ao condicionamento aeróbico, foi avaliada, em todos os grupos, a atividade da enzima CS. O treinamento com natação resultou em aumento da atividade enzimática da CS, confirmando melhora da capacidade do músculo esquelético. Estes dados estão de acordo Pellegrin et al. (2009a), que também obtiveram um

aumento da atividade enzimática da citrato sintase ao realizarem um treinamento com natação por 5 semanas em camundongos apoE<sup>-/-</sup>.

A formação das lesões ateroscleróticas ocorre inicialmente na região proximal da aorta, devido à presença das valvas aórticas, o que ocasiona alteração do fluxo sanguíneo nesse local, com aumento do estresse e atrito nesta região. Ao investigar-se o efeito do tratamento com nebivolol e o treinamento com natação no tamanho da placa aterosclerótica utilizando-se um modelo animal para aterosclerose, é possível observar uma menor evolução das lesões no grupo tratado com o nebivolol quando comparado com o controle. Esse efeito pode ter sido obtido por uma ação vascular direta, por meio dos efeitos benéficos do medicamento no endotélio. Resultado semelhante foi obtido por Kus et al. (2009), que avaliaram o efeito do nebivolol no mesmo modelo animal. Embora muitos detalhes acerca da função endotelial permaneçam obscuros, o tratamento com nebivolol parece estar ligado ao aumento da atividade endotelial pela enzima óxido nítrico sintase endotelial (Toblli et al., 2012), que estimula a produção de óxido nítrico no endotélio, sugerindo sua participação no efeito vasodilatador da droga (Parenti et al., 2000).

Os grupos que se exercitaram não obtiveram o mesmo efeito quando comparados com os grupos que receberam a droga e permaneceram sedentários. A ineficiência do treinamento regular em provocar alteração na estenose luminal é suportada por Schlotter et al (2012), que não observou redução significativa da doença em camundongos LDL<sup>-/-</sup> treinados em esteira por 16 semanas. Uma possível explicação para o resultado negativo

seria a duração do treinamento. Os resultados do presente estudo podem sugerir que o exercício tem efeitos benéficos sobre a progressão da doença em estágio mais avançado, ou que os efeitos benéficos do exercício não são mediados por alterações na progressão da doença. De acordo com Arce-Esquivel et al. (2012), mesmo que o exercício não atenua a formação da lesão, efeitos benéficos através de alterações na hemostasia, resistência melhorada à isquemia cardíaca, e / ou alteração funcional nas células vasculares, podem ser induzidas pelo exercício. Além disso, estudos do nosso laboratório evidenciaram a capacidade ateroprotetora do exercício tanto em camundongos LDL<sup>-/-</sup> (Teodoro et al., 2012) quanto em camundongos apoE<sup>-/-</sup> (Castro, 2011).

Desta forma, utilizou-se a imunofluorescência para documentar a presença de iNOS na aorta de camundongos apoE<sup>-/-</sup>. Os sinais imunodetectáveis estão localizados essencialmente na camada adventícia da artéria dos animais de todos os grupos. A iNOS é um importante fator pró-inflamatório durante o desenvolvimento da aterosclerose (Tsutsui et al., 2010) e não é detectável em condições fisiológicas normais (Wilcox et al., 1997). Segundo Beckman (1990), apesar da síntese aumentada de óxido nítrico produzido pela iNOS terem efeitos positivos, quantidades exageradas tem efeito citotóxico. A noção de que esta enzima desempenha um papel importante na progressão da aterosclerose também é apoiada por estudos realizados por observação de que as lesões ateroscleróticas foram menores em camundongos apoE<sup>-/-</sup>/iNOS<sup>-/-</sup> em comparação com os camundongos apoE<sup>-/-</sup> (Detmers et al, 2000;. Kuhlencordt et al, 2001).

O papel fisiológico ou fisiopatológico da inflamação da adventícia permanece em parte desconhecido. Nos conceitos tradicionais de inflamação vascular são consideradas respostas inflamatórias iniciadas na superfície luminal, que penetram na artéria “de dentro para fora”, e são centradas na adesão de monócitos e oxidação lipídica. No entanto, evidências crescentes dão suporte a um novo paradigma, uma resposta “de fora para dentro”, em que a inflamação vascular é iniciada na adventícia e avança para dentro em direção a íntima (Maiellaro & Taylor, 2007). Segundo Cai et al.(2010), os fibroblastos da adventícia podem se diferenciar em miofibroblastos, que migram, proliferam e secretam citocinas, desempenhando um papel crucial na resposta da adventícia à lesão. Esta hipótese foi primeiramente sugerida por Zhang et al. (1999), que observou a produção de iNOS em fibroblastos da adventícias da aorta de ratos tratados com lipopolissacarídeo. Sendo assim, este estudo demonstrou mais uma vez como inflamação da adventícia pode ser um componente da proliferação vascular aterosclerótica, e a produção adventícia de óxido nítrico citotóxico pela iNOS pode servir para modular o processo aterosclerótico.

O estresse oxidativo é um dos fatores causais que liga a hipercolesterolemia com a patogênese da aterosclerose, e o tecido hepático contém enzimas que contribuem para o mecanismo de defesa antioxidante (Kwon et al., 2010). Além disso, o fígado é considerado o maior órgão metabólico, responsável pela detoxificação de várias substâncias. Neste estudo foram avaliadas o efeito do tratamento com nebivolol e o exercício com natação sobre as enzimas antioxidantes, SOD e CAT, no tecido hepático.



O impacto do exercício físico sobre o estresse oxidativo tem sido muito estudado em relação ao risco cardiovascular e doença. Dados do nosso laboratório mostraram que treinamento físico é apresentado como um antioxidante eficaz e uma terapia anti-aterogênica em camundongos LDL<sup>-/-</sup> que realizaram exercício de intensidade leve e moderada (Teodoro et al., 2012). No entanto, no presente estudo a atividade enzimática da SOD foi inferior no grupo submetido somente ao treinamento em relação ao grupo controle e ao grupo que recebeu somente o medicamento. Além disso, o nebivolol parece ter diminuído a queda da atividade da SOD pelo exercício nos grupos que receberam os dois tratamentos. Já a atividade enzimática da CAT reduziu nos dois grupos treinados.

A redução da atividade da SOD nessas condições não é clara. Segundo AbdHamid et al. (2011) esses resultados podem ocorrer devido à atividade reduzida de ratos durante as semanas do confinamento na gaiola, uma vez que, nessas condições o radical oxigênio produzido será menor e, portanto, reduzindo a atividade da SOD. Com relação a atividade da CAT, os resultados encontrados na literatura para esta enzima são controversos. Alguns estudos mostraram um aumento na sua atividade (Teodoro et al., 2012), outros uma diminuição (da Silva et al., 2009) ou não alteram em função dos tratamentos (Castro, 2011). A divergência entre os resultados pode ser devido a uma variedade de fatores, incluindo diferenças nos protocolos.

Baseada na literatura estudada há duas possíveis explicações para os resultados obtidos. Primeiro, a menor atividade de SOD e CAT nos animais exercitados pode estar relacionada à menor produção de radicais livres

nesses grupos. Segundo, com base nas observações de You et al. (You et al., 2009) é possível que altos níveis de dano oxidativo tenha sido gerado por um exercício exaustivo de natação. Essa resposta pode ser evidenciada pelo aumento significativo de malonaldeído hepático e diminuição significativa na concentração de glutathiona e atividade de CAT, SOD e glutathiona-S-transferase, sugerindo um papel do estresse oxidativo do exercício. No entanto, futuros estudos são necessários para confirmar estas inter-relações.

A maioria das doenças comuns como a hipertensão, a aterosclerose, diabetes, entre outras está associada a alterações funcionais vasculares e estruturais em vários órgãos, incluindo os rins. Segundo Bonomini et al., 2010, camundongos apoE<sup>-/-</sup> com 20 semanas de vida possuem a capacidade antioxidante reduzida em relação aos animais com 6 semanas. Além disso, a doença renal está associada ao estresse oxidativo (de Souza et al., 2012). Como base nestes dados, foram avaliadas as atividades das enzimas antioxidantes, SOD e CAT, neste tecido, a fim de observar o potencial dano renal causado pela doença e sua alteração quando os animais foram submetidos aos tratamentos já descritos. O presente estudo não demonstrou diferenças significativas entre os tratamentos quanto a atividade enzimática de SOD e CAT. Dessa forma, é possível afirmar que tanto o exercício quanto o medicamento não foram capazes de aumentar o potencial antioxidativo nos rins nesse modelo animal.

Algumas limitações do presente estudo podem ser mencionadas. Primeiro, um protocolo de treinamento de maior duração poderia ser utilizado no estudo. Segundo, a quantificação da iNOS não foi possível.

Assim, não podemos comparar entre os grupos as diferenças na expressão da enzima. Por último, a ausência da análise de um marcador de estresse oxidativo, como o malonaldeído, impossibilita afirmar se os tratamentos atuaram de forma estressante ou não.

### **5.7. Conclusões**

A partir dos dados apresentados, os achados mais significantes deste estudo concentram-se na prevenção da progressão da lesão aterosclerótica pelo nebivolol e a da expressão da iNOS na camada adventícia da artéria. Além disso, o exercício atuou reduzindo a atividade oxidante de SOD e CAT nos grupos treinados. Até o momento, no entanto, ainda há uma lacuna na literatura sobre as possíveis interações do nebivolol com atividade física e mais estudos são necessários.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABD HAMID, N.A.; HASRUL, M.; RUZANNA, R. et al. Effect of vitamin E (Tri E(R)) on antioxidant enzymes and DNA damage in rats following eight weeks exercise. **Nutrition Journal**, 10: 37, 2011.

AEBI, H. [13] **Catalase in vitro**. Methods in Enzymology. Academic Press. 1984

ARCE-ESQUIVEL, A.A.; KREUTZER, K.V.; RUSH, J.W.E. et al. Exercise Does Not Attenuate Early CAD Progression in a Pig Model. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, 44: 27-38, 2012.

BANCROFT, J.; GAMBLE, M. **Theory and practice of histological techniques**. Churchill Livingstone. Elsevier, 2007.

BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.W.; CHEN, J. et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 87: 1620-1624, 1990.

BERLINER, J.A.; NAVAB, M.; FOGELMAN, A.M. et al. Atherosclerosis: Basic Mechanisms: Oxidation, Inflammation, and Genetics. **Circulation**, 91: 2488-2496, 1995.

BONOMINI, F.; FILIPPINI, F.; HAYEK, T. et al. Apolipoprotein E and its role in aging and survival. **Experimental Gerontology**, 45: 149-157, 2010.

BOOR, P.; CELEC, P.; BEHULIAK, M. et al. Regular moderate exercise reduces advanced glycation and ameliorates early diabetic nephropathy in obese Zucker rats. **Metabolism**, 58: 1669-1677, 2009.

CAI, X.-J.; CHEN, L.; LI, L. et al. Adiponectin Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Adventitial Fibroblast Migration and Transition to Myofibroblasts via AdipoR1-AMPK-iNOS Pathway. **Molecular Endocrinology**, 24: 218-228, 2010.

CASTRO, C.A.D. **Lesão aterosclerótica, capacidade antioxidante e histopatologia de camundongos apoe -/- alimentados com açaí (*euterpe edulis martius*) e submetidos ao treinamento físico**. Magister Scientiae - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2011.

CELIK, T.; IYISOY, A.; KURSAKLIOGLU, H. et al. Comparative effects of nebivolol and metoprolol on oxidative stress, insulin resistance, plasma adiponectin and soluble P-selectin levels in hypertensive patients. **Journal of Hypertension**, 24: 591-596 10.1097/01.hjh.0000209993.26057.de, 2006.

CHEYMOL, G.; WOESTENBORGHES, R.; SNOECK, E. et al. Pharmacokinetic study and cardiovascular monitoring of nebivolol in normal

and obese subjects. **European Journal of Clinical Pharmacology**, 51: 493-498, 1997.

DA SILVA, L.A.; PINHO, C.A.; ROCHA, L.G.C. et al. Effect of different models of physical exercise on oxidative stress markers in mouse liver. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, 34: 60-65, 2009.

DE SOUZA, P.S.; DA ROCHA, L.G.C.; TROMM, C.B. et al. Therapeutic action of physical exercise on markers of oxidative stress induced by chronic kidney disease. **Life Sciences**, 91: 132-136, 2012.

DETMERS, P.A.; HERNANDEZ, M.; MUDGETT, J. et al. Deficiency in Inducible Nitric Oxide Synthase Results in Reduced Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. **The Journal of Immunology**, 165: 3430-3435, 2000.

DIAS, F.A.; URBONIENE, D.; YUZHAKOVA, M.A. et al. Ablation of iNOS delays cardiac contractile dysfunction in chronic hypertension. **Front Biosci (Elite Ed)**, 2: 312-324, 2010.

DIETERICH, S.; BIELIGK, U.; BEULICH, K. et al. Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart: Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. **Circulation**, 101: 33-39, 2000.

FEARON, I.M.; FAUX, S.P. Oxidative stress and cardiovascular disease: novel tools give (free) radical insight. **J Mol Cell Cardiol**, 47: 372-81, 2009.

FOLEY, R.N.; COLLINS, A.J. A Novel Model of Cardiovascular Risk Based on Kidney Function. **American Journal of Nephrology**, 34: 505-511, 2011.

FUKAO, K.; SHIMADA, K.; NAITO, H. et al. Voluntary exercise ameliorates the progression of atherosclerotic lesion formation via anti-inflammatory effects in apolipoprotein E-deficient mice. **J Atheroscler Thromb**, 17: 1226-36, 2010.

GLEESON, M.; BISHOP, N.C.; STENSEL, D.J. et al. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. **Nat Rev Immunol**, advance online publication: 2011.

GU, H.-F.; TANG, C.-K.; YANG, Y.-Z. Psychological stress, immune response, and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, 223: 69-77, 2012.

HEEBA, G.H.; EL-HANAFY, A.A. Nebivolol regulates eNOS and iNOS expressions and alleviates oxidative stress in cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. **Life Sciences**, 90: 388-395, 2012.

HOFKER, M. Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, 137: 1-11, 1998.

JUNQUEIRA, L.C.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R.R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. **Archivum Histologicum Japonicum**, 41: 267-274, 1978.

JUNQUEIRA, L.C.U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **The Histochemical Journal**, 11: 447-455, 1979.

KADOGLU, N.P.; KOSTOMITSOPOULOS, N.; KAPELOUZOU, A. et al. Effects of Exercise Training on the Severity and Composition of Atherosclerotic Plaque in apoE-Deficient Mice. **J Vasc Res**, 48: 347-356, 2011.

KAMP, O.; METRA, M.; BUGATTI, S. et al. Nebivolol: haemodynamic effects and clinical significance of combined beta-blockade and nitric oxide release. **Drugs**, 70: 41-56, 2010.

KRAUS, W.E.; HOUMARD, J.A.; DUSCHA, B.D. et al. Effects of the Amount and Intensity of Exercise on Plasma Lipoproteins. **New England Journal of Medicine**, 347: 1483-1492, 2002.

KUS, K.; GAJDA, M.; PYKA-FOSCIAK, G. et al. The effect of nebivolol on atherogenesis in apoE-knockout mice. **J Physiol Pharmacol**, 60: 163-5, 2009.

KWAK, H.-B.; KIM, J.-H.; JOSHI, K. et al. Exercise training reduces fibrosis and matrix metalloproteinase dysregulation in the aging rat heart. **The FASEB Journal**, 25: 1106-1117, 2011.

KWON, E.Y.; DO, G.M.; CHO, Y.Y. et al. Anti-atherogenic property of ferulic acid in apolipoprotein E-deficient mice fed Western diet: Comparison with clofibrate. **Food and Chemical Toxicology**, 48: 2298-2303, 2010.

LANDMESSER, U.; HORNIG, B.; DREXLER, H. Endothelial Function. **Circulation**, 109: II-27-II-33, 2004.

LEGEIN, B.; TEMMERMAN, L.; BIESSEN, E.L. et al. Inflammation and immune system interactions in atherosclerosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 1-23, 2013.

LIBBY, P.; RIDKER, P.M.; HANSSON, G.K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. **Nature**, 473: 317-325, 2011.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. et al. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. **Journal of Biological Chemistry**, 193: 265-275, 1951.

MACMICKING, J.; XIE, Q.-W.; NATHAN, C. NITRIC OXIDE AND MACROPHAGE FUNCTION. **Annual Review of Immunology**, 15: 323-350, 1997.

MAIELLARO, K.; TAYLOR, W.R. The role of the adventitia in vascular inflammation. **Cardiovascular Research**, 75: 640-648, 2007.

MAYR-WOHLFART, U.; FIEDLER, J.; GÜNTHER, K.P. et al. Proliferation and differentiation rates of a human osteoblast-like cell line (SaOS-2) in

contact with different bone substitute materials. **Journal of Biomedical Materials Research**, 57: 132-139, 2001.

MCNEELY, W.; GOA, K.L. Nebivolol in the Management of Essential Hypertension: A Review. **Drugs**, 57: 633-651, 1999.

MOEN, M.D.; WAGSTAFF, A.J. Nebivolol: A Review of its Use in the Management of Hypertension and Chronic Heart Failure. **Drugs**, 66: 1389-1409, 2006.

NAVAB, M.; ANANTHRAMIAH, G.M.; REDDY, S.T. et al. Thematic review series: The Pathogenesis of Atherosclerosis The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. **Journal of Lipid Research**, 45: 993-1007, 2004.

NUNES, A.P.D.O.B.; VINAGRE, C.G.C.D.M.; MARANHÃO, R.C. **Metabolismo de lípidos plasmáticos e exercício físico**. Cardiologia do Exercício: Do atleta ao cardiopata. Manole. Barueri. 2010

OZBEN, B.; DURSUN, E.; MONARI, E. et al. Proteomic profiling during atherosclerosis progression: Effect of nebivolol treatment. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 331: 9-17, 2009.

PARENTI, A.; FILIPPI, S.; AMERINI, S. et al. Inositol Phosphate Metabolism and Nitric-Oxide Synthase Activity in Endothelial Cells Are Involved in the Vasorelaxant Activity of Nebivolol. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 292: 698-703, 2000.

PASINI, A.F.; GARBIN, U.; NAVA, M.C. et al. Nebivolol decreases oxidative stress in essential hypertensive patients and increases nitric oxide by reducing its oxidative inactivation. **Journal of Hypertension**, 23: 589-596, 2005.

PAUTZ, A.; ART, J.; HAHN, S. et al. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **Nitric Oxide**, 23: 75-93, 2010.

PELLEGRIN, M.; BERTHELOT, A.; HOUDAYER, C. et al. New insights into the vascular mechanisms underlying the beneficial effect of swimming training on the endothelial vasodilator function in apolipoprotein E-deficient mice. **Atherosclerosis**, 190: 35-42, 2007.

PELLEGRIN, M.; ALONSO, F.; AUBERT, J.-F. et al. Swimming Prevents Vulnerable Atherosclerotic Plaque Development in Hypertensive 2-Kidney, 1-Clip Mice by Modulating Angiotensin II Type 1 Receptor Expression Independently From Hemodynamic Changes. **Hypertension**, 53: 782-789, 2009a.

PELLEGRIN, M.; MIGUET-ALFONSI, C.; BOUZOURENE, K. et al. Long-term exercise stabilizes atherosclerotic plaque in ApoE knockout mice. **Med Sci Sports Exerc**, 41: 2128-35, 2009b.

PINHEIRO-MULDER, A.; AGUILA, M.B.; BREGMAN, R. et al. Exercise counters diet-induced obesity, proteinuria, and structural kidney alterations in rat. **Pathology - Research and Practice**, 206: 168-173, 2010.

RADER, D.J.; DAUGHERTY, A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. **Nature**, 451: 904-913, 2008.

SCHLOTTER, F.; MATSUMOTO, Y.; MANGNER, N. et al. Regular Exercise or Changing Diet Does Not Influence Aortic Valve Disease Progression in LDLR Deficient Mice. **PLoS One**, 7: e37298, 2012.

SHAW, A.A.; LIU, S.; ZACHWIEJA, L.F. et al. Effects of varying degrees of renal impairment on the pharmacokinetic disposition of nebivolol. **Clin Pharmacol Ther**, 77: P38-P38, 2005.

SHUN-CHENG, S.C.X.; XUE-JUN, X.J.M.; CHENG-JI, C.J.G. et al. [Different strength intermittent treadmill training of growth period rats and related bone metabolism of the hormone influence]. **Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi**, 28: 271-274, 2012.

SINGH, R.; KRISHAN, P. Modulation of impact of high fat diet in pathological and physiological left ventricular cardiac hypertrophy by fluvastatin. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 64: 147-153, 2010.

SPOSITO, A.C.; CARAMELLI, B.; FONSECA, F.A.H. et al. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 88: 2-19, 2007.

SRERE, P.A. [1] **Citrate synthase: [EC 4.1.3.7. Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)]**. Methods in Enzymology. Academic Press. 1969

TABAS, I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. **Nat Rev Immunol**, 10: 36-46, 2010.

TARGHER, G.; BERTOLINI, L.; PADOVANI, R. et al. Relations Between Carotid Artery Wall Thickness and Liver Histology in Subjects With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Diabetes Care**, 29: 1325-1330, 2006.

TARGHER, G.; DAY, C.P.; BONORA, E. Risk of Cardiovascular Disease in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **New England Journal of Medicine**, 363: 1341-1350, 2010.

TEODORO, B.G.; NATALI, A.; OCIRC et al. Improvements of Atherosclerosis and Hepatic Oxidative Stress are Independent of Exercise Intensity in LDLr<sup>-/-</sup> Mice. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, 19: 904-911, 2012.

TOBLLI, J.; DIGENNARO, F.; GIANI, J. et al. Nebivolol: impact on cardiac and endothelial function and clinical utility **Vascular Health and Risk Management** 8: 151-160, 2012.



TOBLLI, J.E.A.; CAO, G.A.; RIVAS, C.A. et al. Cardiovascular protective effects of nebivolol in Zucker diabetic fatty rats. **Journal of Hypertension**, 28: 1007-1019, 2010.

TOBLLI, J.E.A.; CAO, G.A.; GIANI, J.F.B. et al. Long-term treatment with nebivolol attenuates renal damage in Zucker diabetic fatty rats. **Journal of Hypertension**, 29: 1613-1623, 2011.

TOLOSA, E.; RODRIGUES, C.; BEHMER, A. et al. **Manual de técnicas para histología normal e patológica. Barueri. Barueri. Manole, 2003.**

TSUTSUI, M.; SHIMOKAWA, H.; OTSUJI, Y. et al. Pathophysiological relevance of NO signaling in the cardiovascular system: Novel insight from mice lacking all NO synthases. **Pharmacology & Therapeutics**, 128: 499-508, 2010.

VAN VRÉ, E.A.; VAN BEUSEKOM, H.M.; VRINTS, C.J. et al. Stereology: a simplified and more time-efficient method than planimetry for the quantitative analysis of vascular structures in different models of intimal thickening. **Cardiovascular Pathology**, 16: 43-50, 2007.

WEISS, R. Nebivolol: a novel beta-blocker with nitric oxide-induced vasodilatation. **Vasc Health Risk Manag**, 2: 303-8, 2006.

WILCOX, J.N.; SUBRAMANIAN, R.R.; SUNDELL, C.L. et al. Expression of Multiple Isoforms of Nitric Oxide Synthase in Normal and Atherosclerotic Vessels. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 17: 2479-2488, 1997.

WU, Y.; LI, L.; WEN, T. et al. Protective effects of echinacoside on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. **Toxicology**, 232: 50-56, 2007.

XIANGDONG, L.; YUANWU, L.; HUA, Z. et al. Animal models for the atherosclerosis research: a review. **Protein Cell**, 2: 189-201, 2011.

YOU, Y.; PARK, J.; YOON, H.-G. et al. Stimulatory Effects of Ferulic Acid on Endurance Exercise Capacity in Mice. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 73: 1392-1397, 2009.

ZHANG, H.; DU, Y.; COHEN, R.A. et al. Adventitia as a source of inducible nitric oxide synthase in the rat aorta nitric oxide production by the aortic adventitia. **American Journal of Hypertension**, 12: 467-475, 1999.