



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

DANIELE MENDES GUIZONI

“INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO FÍSICO NA DISFUNÇÃO
ENDOTELIAL E NO DESENVOLVIMENTO DO ATEROMA EM
CAMUNDONGOS KNOCKOUT PARA O RECEPTOR DE
LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE”

“INFLUENCE OF EXERCISE TRAINING ON ENDOTHELIAL
DYSFUNCTION AND ATHEROMA DEVELOPMENT IN LOW DENSITY
LIPOPROTEIN RECEPTOR-DEFICIENT MICE”

CAMPINAS - SP

2016

DANIELE MENDES GUIZONI

**“INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO FÍSICO NA DISFUNÇÃO
ENDOTELIAL E NO DESENVOLVIMENTO DO ATEROMA EM
CAMUNDONGOS KNOCKOUT PARA O RECEPTOR DE
LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE”**

**“INFLUENCE OF EXERCISE TRAINING ON ENDOTHELIAL
DYSFUNCTION AND ATHEROMA DEVELOPMENT IN LOW DENSITY
LIPOPROTEIN RECEPTOR-DEFICIENT MICE”**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do título de Doutora em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Fisiologia.*

*Thesis presented to the Institute of Biology of
the University of Campinas in partial fulfillment
of the requirements for the degree of PhD title
in Functional and Molecular Biology, in
Physiology area.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA DANIELE MENDES GUIZONI, E
ORIENTADA PELA PROF^a DRA. ANA PAULA
COUTO DAVEL.

Orientadora: Prof^a Dra. Ana Paula Couto Davel
Co-orientadora: Prof^a Dra. Marta Helena Krieger
Co-orientadora: Prof^a Dra. Maria Andréia Delbin

CAMPINAS - SP

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

G949i Guizoni, Daniele Mendes, 1988-
Influência do treinamento físico na disfunção endotelial e no desenvolvimento do ateroma em camundongos knockout para o receptor de lipoproteínas de baixa densidade / Daniele Mendes Guizoni. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Ana Paula Couto Davel.
Coorientadores: Marta Helena Krieger e Maria Andréia Delbin.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Exercícios físicos. 2. Disfunção endotelial. 3. Camundongos knockout. 4. Receptores LDL. 5. Óxido nítrico. 6. Água oxigenada. I. Davel, Ana Paula, 1979-. II. Krieger, Marta Helena, 1958-. III. Delbin, Maria Andréia, 1982-. IV. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. V. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Influence of exercise training on endothelial dysfunction and atheroma development in low density lipoprotein receptor-deficient mice

Palavras-chave em inglês:

Exercise
Endothelial dysfunction
Mice, Knockout
LDL receptors
Nitric oxide
Hydrogen peroxide

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Marta Helena Krieger [Coorientador]
Leonardo dos Reis Silveira
Eliana Hiromi Akamine
Fernanda Roberta Roque Redondo
Luciana Venturini Rossoni

Data de defesa: 17-03-2016

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 17 de março de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Marta Helena Krieger

Prof. Dr. Leonardo dos Reis Silveira

Profa. Dra. Eliana Hiromi Akamine

Profa. Dra. Fernanda Roberta Roque Redondo

Profa. Dra. Luciana Venturini Rossoni

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica da aluna.

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu marido *Guilherme* e aos meus pais, *Anderson* e *Mirian*, por sempre me apoiarem em todas as conquistas da minha vida.

Agradecimentos

Agradeço acima de tudo a *Deus* por abençoar a minha vida com pessoas maravilhosas e por todas as conquistas alcançadas.

À minha querida orientadora *Ana Paula Davel* por toda dedicação a este trabalho, pelos ensinamentos, pela paciência, pelos conselhos e pela excelente orientação. Obrigada por ser um exemplo profissional, por participar de mais uma etapa na minha formação e por ter sido fundamental na realização deste trabalho!

À minha co-orientadora *Marta Helena Krieger* agradeço por ter “aberto as portas” da UNICAMP para mim e por toda confiança depositada para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela oportunidade e pelas considerações e correções deste trabalho.

À minha co-orientadora *Maria Andreia Delbin* agradeço pelo suporte nos experimentos, pelos ensinamentos, pelas colaborações e considerações dedicadas a este trabalho.

Ao meu marido *Guilherme* pelo amor, pelo companheirismo, pelos cuidados, pelos ensinamentos e por ser o alicerce da minha vida sempre me dando apoio, conselhos e segurança em todas as minhas escolhas. Muito obrigada por ser um exemplo de pessoa e por ser minha inspiração!

Aos meus pais, *Anderson* e *Mirian*, por serem a base de tudo. Obrigada por sempre apoiarem todas as minhas decisões e, acima de tudo, por estarem sempre presentes na minha vida ajudando da melhor forma possível em tudo que preciso. Pai e mãe, muito obrigada pela educação, carinho, paciência, amor, ensinamentos, dedicação e apoio em toda minha trajetória.

Aos meus irmãos, *Junior* e *Rodrigo*, e à minha cunhada *Paulina*, por serem acima de tudo amigos, conselheiros e exemplos na minha vida.

A todos os meus familiares, em especial meus avós, *Ângela* e *José* (in memorian), *Paulina* e *Antônio* (in memorian), por todo o carinho, apoio, dedicação, amor, afeto e cuidados.

Aos meus queridos sogros, *Isabel* e *Sérgio*, por serem pessoas muito especiais na minha vida, pelos conselhos, pelo carinho, por todo apoio nas minhas escolhas e por sempre estarem presentes e dispostos a ajudar no que for preciso.

Aos grandes amigos *Jad, Amanda, Andressa, Hygor, Carlos, Amanda (Minas), Mariana, Carmem, Nath, Natali* e *Nádia*, pelo companheirismo, pelos ensinamentos, pela paciência, pela ajuda em toda minha trajetória no laboratório, nos experimentos e nas discussões de dados. Obrigada pelas risadas, pelo carinho, pelos cuidados, pelos cafés e por fazerem dos meus dias no laboratório dias mais felizes. Obrigada por fazerem parte da minha vida e por terem se tornado minha segunda família!

Aos *funcionários da Secretaria da Pós-Graduação*, por toda ajuda e auxílio.

Aos *funcionários e técnicos do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional* pela ajuda e auxílio nos cuidados do laboratório e do biotério.

À professora *Helena Coutinho Franco de Oliveira* e aos seus alunos, em especial o *Gabriel, Thiago* e *Estela* pela colaboração neste trabalho.

À *Prof^a. Luciana Rossoni*, ao *Prof. Leonardo Silveira* e à *Dra. Jane de Souza* por terem participado da banca examinadora da minha qualificação, por todas as considerações, sugestões e colaborações feitas a este trabalho.

Aos membros da banca examinadora da minha defesa de doutorado *Prof. Leonardo dos Reis Silveira, Prof^a. Luciana Venturini Rossoni, Prof^a. Eliana Hiromi Akamine* e *Dra. Fernanda Roberta Roque Redondo* pela leitura deste trabalho e por terem prontamente aceito o convite para compor a minha banca de doutorado.

Aos *camundongos*, peças fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho, obrigada por suas contribuições à ciência.

RESUMO

A disfunção endotelial e o desequilíbrio redox constituem importantes mecanismos associados ao desencadeamento da aterosclerose. O aumento da produção de ânion superóxido, em conjunto com alterações na atividade das isoformas endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) da sintase de óxido nítrico (NO) contribuem para a disfunção endotelial, por reduzir a produção e a biodisponibilidade de NO e H_2O_2 . Trabalhos sugerem que o exercício físico aeróbio (Ex) pode reduzir o ateroma e o estresse oxidativo nas fases avançadas da aterosclerose. Porém, os efeitos do Ex na produção e atividade vasodilatadora do NO e H_2O_2 na disfunção endotelial que precede a formação do ateroma não está esclarecido. Camundongos knockout para o receptor de LDL ($LDLr^{-/-}$) constituem um modelo para estudo da hipercolesterolemia familiar (HF) com elevação das concentrações plasmáticas de LDL; porém o desenvolvimento acelerado da lesão aterosclerótica na aorta depende da exposição a outros fatores aterogênicos. O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito do Ex sobre a disfunção endotelial que ocorre nas fases iniciais da doença aterosclerótica na aorta de camundongos $LDLr^{-/-}$ focando no papel do NO, H_2O_2 e ânion superóxido. Camundongos C57BL/6J (WT) e $LDLr^{-/-}$ (12 semanas) alimentados com dieta padrão foram divididos em sedentários (S) ou exercitados (Ex; treinamento em esteira rolante 1h/5x por semana) por 4 semanas. Após este período, o soro foi obtido e a aorta torácica coletada. Houve aumento do colesterol total e de triglicérides em $LDLr^{-/-}$ S comparado ao WT-S, o que não foi modificado pelo treinamento. Observou-se redução do relaxamento dependente do endotélio induzido por acetilcolina na aorta de $LDLr^{-/-}$ S, sem diferenças na vasodilatação induzida pelo doador de NO nitroprussiato de sódio ou por H_2O_2 . O treinamento não modificou o relaxamento da acetilcolina em WT-Ex, mas normalizou esta resposta em $LDLr^{-/-}$ Ex. A inibição não específica das NOS (L-NAME), e em menor magnitude a inibição da nNOS (7-NI) e a catalase reduziram o relaxamento à acetilcolina em todos os grupos, abolindo as diferenças entre eles. A expressão da (Ser1177)p-eNOS e da nNOS, assim como a produção de NO e H_2O_2 foram reduzidas em aorta de $LDLr^{-/-}$ S e normalizados em $LDLr^{-/-}$ Ex. A inibição da atividade da NADPH oxidase com apocinina aumentou o relaxamento à acetilcolina em $LDLr^{-/-}$ S, mas não em $LDLr^{-/-}$ Ex, sugerindo menor papel da NADPH oxidase após o treinamento. De acordo, a expressão da subunidade Nox2 da NADPH oxidase e a produção de ânion superóxido foram reduzidas em aorta de $LDLr^{-/-}$ Ex em comparação ao grupo $LDLr^{-/-}$ S. Houve menor expressão aórtica das isoformas da superóxido dismutase em $LDLr^{-/-}$ S, efeito parcialmente restaurado em $LDLr^{-/-}$ Ex. Não foram encontrados depósitos de gordura na aorta torácica dos animais estudados, confirmando o estágio inicial da doença aterosclerótica em $LDLr^{-/-}$. Em conclusão, os dados sugerem o treinamento físico aeróbio como uma potencial terapia na prevenção da disfunção endotelial e do desequilíbrio redox que precede o desenvolvimento do ateroma na hipercolesterolemia, por promover aumento da produção e biodisponibilidade de NO e de H_2O_2 .

Palavras-chaves: Exercício físico, disfunção endotelial, aorta, aterosclerose, camundongos *knockout* para o receptor de LDL, óxido nítrico sintase, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico.

ABSTRACT

Endothelial dysfunction and redox imbalance are important mechanisms involved in the pathogenesis of atherosclerosis. The increased production of superoxide anion associated with changes in the activity of endothelial (eNOS) and neuronal (nNOS) nitric oxide (NO) synthase isoforms contribute to endothelial dysfunction by reducing the production and bioavailability of NO and H₂O₂. Previous studies suggest that aerobic exercise (Ex) might reduce atheroma and vascular oxidative stress in advanced stages of atherosclerosis. However, the effects of Ex on the endothelial production of NO and H₂O₂ and their vasodilator activity in early stages of atherosclerotic disease is still unclear. LDL-receptor knockout mice (LDLr^{-/-}) are a model for the study of familial hypercholesterolemia (FH); these mice exhibit elevated LDL plasma levels, but the acceleration of aortic atherosclerotic lesion depends on the exposure to other atherogenic factors. The aim of this study was to investigate the effect of Ex on the early endothelial dysfunction of LDLr^{-/-} mice, focusing on the role of NO, H₂O₂ and superoxide anion. C57BL/6J (WT) and LDLr^{-/-} mice (12 weeks) fed standard diet were divided into sedentary (S) or exercised (Ex; training on a treadmill 1h/5x per week) for 4 weeks. After this period, plasma samples and the thoracic aorta were collected. Total cholesterol and triglycerides were increased in LDLr^{-/-}S compared to WT-S; whereas Ex did not modify these parameters. The endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine was impaired in aortic rings from LDLr^{-/-}S, without changes in the relaxation response induced by the NO donor sodium nitroprusside or by H₂O₂. Ex did not modify the acetylcholine-induced relaxation in aorta of WT-Ex, but normalized this response in LDLr^{-/-}Ex. The non-specific inhibition of NOS with L-NAME, and to a lesser extent the inhibition of nNOS with 7-NI, as well as the incubation with catalase reduced the relaxation response to acetylcholine in all groups, abolishing differences between them. nNOS and p-eNOS (Ser1177) expression, as well as NO and H₂O₂ production were reduced in aorta of LDLr^{-/-}S and restored by Ex. The inhibition of NADPH oxidase activity with apocynin increased the acetylcholine-induced relaxation in LDLr^{-/-}S, but not in LDLr^{-/-}Ex suggesting minor role of NADPH oxidase after physical training. Accordingly, expression of NADPH oxidase Nox2 and superoxide anion production were reduced in aorta of LDLr^{-/-}Ex compared to LDLr^{-/-}S group. Aortas from LDLr^{-/-}S showed reduced aortic expression of superoxide dismutase isoforms 1, 2 and 3 in, which was partially restored in LDLr^{-/-}Ex. Fat deposit evaluated with Oil red staining were found no significant in thoracic aortas from all groups, confirming the initial stage of atherosclerotic disease in LDLr^{-/-}. In conclusion, the data suggest aerobic physical training as a potential therapy in the prevention of endothelial dysfunction and redox imbalance that precedes the development of atherosclerotic lesions in hypercholesterolemia by increasing NO and H₂O₂ production and bioavailability.

Keywords: Exercise training, endothelial dysfunction, aorta, atherosclerosis, LDL receptor-deficient mice, nitric oxide synthase, hydrogen peroxide, nitric oxide.

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Concentration-response curves to acetylcholine (A), to sodium nitroprusside (B) and to hydrogen peroxide (H_2O_2 , C) in thoracic aortic rings from sedentary (S) and exercise-trained (Ex) wild-type (WT) and LDLr knockout mice ($LDLr^{-/-}$). Data are mean $\pm$ SEM (n=5-14 per group). 2-way ANOVA.....**60**

Figure 2. Concentration-response curves to acetylcholine before and after incubation with L-NAME (LN, A and B), 7-Nitroindazole (7-NI, C and D) or catalase (CAT, E and F) in thoracic aortic rings from sedentary (S) and exercise-trained (Ex) wild-type (WT) and LDLr knockout mice ($LDLr^{-/-}$). Bar graphs show the acetylcholine maximal vasodilator effect (E_{max}) in the presence or absence of L-NAME (C), 7-NI (F) and CAT (I). ANOVA: * $p < 0.05$ vs. WT S; # $p < 0.05$ vs. $LDLr^{-/-}$ S; + indicates $p < 0.05$, ++ indicates $p < 0.001$, and +++ indicates $p < 0.0001$ vs. without incubation ring. Data are mean $\pm$ SEM (n=5-8 per group).....**61**

Figure 3. Representative fluorographs (A, left panel) and quantitative analysis (A, bar graphic right) of NO production evaluated by DAF-2A fluorescence in transverse sections of thoracic aorta. DAF-2A fluorescence is expressed as the percentage of intensity per vessel area obtained in WT S group (bar scale= 100 μm). The bar graph (B) represents the fluorescence curve slope to Amplex Red estimating the production of H_2O_2 per minute in aortic rings from sedentary (S) and exercise-trained (Ex) wild-type (WT) and LDLr knockout mice ($LDLr^{-/-}$). Data are mean $\pm$ SEM. Two-way ANOVA: * $p < 0.05$ vs. WT S; \$ $p < 0.05$ vs. WT Ex; # $p < 0.05$ vs. $LDLr^{-/-}$ S. Numbers into the bars represent N of animals used in each group.....**62**

Figure 4. Representative blots (top) and quantitative protein expression (bottom) of total and phosphorylated eNOS (p-eNOS) at Ser1177 (A); dimerized eNOS (B); total nNOS (C) and catalase (D) in aorta from sedentary (S) and exercise-trained (Ex) wild-type (WT) and LDLr knockout mice ($LDLr^{-/-}$). Proteins expression were normalized to α -actin content in each sample, and protein expression of p-eNOS

were normalized to total eNOS expression. eNOS dimerization was expressed as a ratio of dimer:monomer band intensity. The results were expressed as the percentage of the protein expression values obtained in WT S group. Data are mean $\pm$ SEM. Two-way ANOVA: * $p < 0.05$ vs. WT S; \$ $p < 0.05$ vs. WT Ex; # $p < 0.05$ vs. LDLr^{-/-} S. Numbers into the bars represent N of animals used in each group.....63

Figure 5. Concentration-response curves to acetylcholine before and after incubation with diethyldithiocarbamate (DETCA, A and B), or apocynin (Apo, D and E) in thoracic aortic rings from sedentary (S) and exercise-trained (Ex) wild-type (WT) and LDLr knockout mice (LDLr^{-/-}). Bar graphs show the acetylcholine maximal vasodilator effect (E_{max}) in the presence or absence of DETCA (C) and Apo (F). ANOVA: * $p < 0.05$ vs. WT S; # $p < 0.05$ vs. LDLr^{-/-} S; + indicates $p < 0.05$, ++ indicates $p < 0.001$, and +++ indicates $p < 0.0001$ vs. without incubation rings. Data are mean $\pm$ SEM (n=5-8 per group).....64

Figure 6. Representative blots (top) and quantitative protein expression (bottom) of Nox2 subunit of NADPH oxidase (A); CuZn-SOD (B); Mn-SOD (C) and EC-SOD (D) in aorta from sedentary (S) and exercise-trained (Ex) wild-type (WT) and LDLr knockout mice (LDLr^{-/-}). Proteins expression were normalized to α -actin content in each sample. The results were expressed as the percentage of the protein expression values obtained in WT S group. Data are mean $\pm$ SEM. Two-way ANOVA: * $p < 0.05$ vs. WT S; \$ $p < 0.05$ vs. WT Ex; # $p < 0.05$ vs. LDLr^{-/-} S. Numbers into the bars represent N of animals used in each group.....65

Figure 7. Representative fluorographs (A) and quantitative analysis of reactive oxygen species production in transverse sections of aorta (B) evaluated by the ethidium-bromide-positive nuclei under basal conditions and after incubation with apocynin (30 mM), or with Mn(III) tetrakis(1-methyl-4-pyridyl) porphyrin pentachloride (MnTMPyP, 25 μ M). Bar scale= 100 μ m. Sedentary and exercised (Ex) wild-type (WT) and LDLr knockout mice (LDLr^{-/-}). Data are mean $\pm$ SEM (n=4-15 per group). 2-

way ANOVA: * $p < 0.05$ vs. WT S; # $p < 0.05$ vs. LDLr^{-/-} S; + $p < 0.05$ apocynin vs. basal.....66

Figure S1: Representative photographs of oil red O staining in the thoracic aorta from sedentary and exercise-trained wild-type (WT) and LDLr knockout mice (LDLr^{-/-}).....74

LISTA DE TABELAS

Table 1. Incremental exercise test performed before (initial) and after (final) 4-week sedentary (S) or exercise-trained (Ex) wild-type (WT) and LDL receptor knockout mice (LDLr^{-/-}).....**58**

Table 2. Body weight and plasma biochemical parameters in sedentary (S) and exercise-trained (Ex) wild-type (WT) and LDLr knockout mice (LDLr^{-/-}).....**59**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh: acetilcolina

ACSM: *American College of Sports Medicine*

ADMA: dimetilarginina assimétrica

AHA: *American Heart Association*

Akt: proteína quinase B

ApoE^{-/-}: camundongos com deleção do gene da apolipoproteína E

BH₄: tetrahidrobiopterina

BSA: albumina de soro bovino

Ca²⁺: cálcio

CaMKII: proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina II

cav-1: caveolina-1

CD36: receptore *scavenger* CD36 molecule (*thrombospondin receptor*)

CD38: receptore *scavenger* CD38 molecule

CLM: cadeia leve de miosina

cNOS: isoformas constitutivas da NOS

COX-2: ciclooxigenase-2

Duox1: dual oxidase 1

Duox2: dual oxidase 2

eNOS ou NOS-3: óxido nítrico sintase endotelial

EROs: espécies reativas de oxigênio

FAD: flavina adenina dinucleotídeo

FMN: flavina mononucleotídeo

GMP cíclico ou GMPc: monofosfato cíclico de guanosina

GTP: guanosina trifosfato

H₂O: água

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HDL: lipoproteína de alta densidade

HF: hipercolesterolemia familiar

ICAM-1: molécula de adesão intercelular

IL-1 β : Interleucina-1 beta

IL-6: Interleucina-6

iNOS ou NOS-2: óxido nítrico sintase induzível

K⁺: potássio

LDL: lipoproteína de baixa densidade

LDLox: LDL oxidada

LDLr^{-/-}: camundongos com deleção do gene do receptor de LDL

LDLr^{-/-}apoE^{-/-}: camundongos duplo *knockout* para o receptor de LDL e para apolipoproteína E

LDLr^{-/-}Ex: camundongos com deleção do receptor de LDL exercitados

LDLr^{-/-}ob/ob^{-/-}: camundongos com deleção do receptor de LDL deficientes de leptina

LDLr^{-/-}S: camundongos com deleção do receptor de LDL sedentários

LDLR: gene que codifica o receptor de LDL

LDLr: receptor de LDL

LOX-1: receptor da LDL oxidada

MCP-1: proteína quimiotática de monócitos-1

MMP: metaloproteinase

MMP-2: metaloproteinase 2

MMP-9: metaloproteinase 9

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo de fosfato

nNOS ou NOS-1: óxido nítrico sintase neuronal

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintase

Nox2^{-/-}apoE^{-/-}: camundongos duplo *knockout* para Nox2 e para apolipoproteína E

O₂^{-·}: ânion superóxido

O₂: oxigênio

OMS: Organização Mundial de Saúde

ONOO^{-·}: peroxinitrito

PBS: Tampão de salina fosfato

peNOS^{Ser1177}: eNOS com fosforilação do aminoácido serina na posição 1177

PGI₂: prostaciclina

PGH₂: prostaglandina

PI-3K: fosfatidilinositol-3 quinase

PKA: proteína quinase A

PKC: proteína quinase C

PKG: proteína quinase G

PyK2: tirosina quinase 2

P38 MAPK: proteína quinase p38 ativada por mitógenos

Rac2: substrato de toxina botulínica C3 relacionada à ras 2

GCs: guanilato ciclase solúvel

siRNA: *small interfering RNA*

SOD: superóxido dismutase

SOD1 ou Cu/ZnSOD: superóxido dismutase 1, subunidade citoplasmática

SOD2 ou MnSOD: superóxido dismutase 2, subunidade mitocondrial

SOD3 ou ecSOD: superóxido dismutase 3, subunidade extracelular

SR: receptores *scavenger*

SR-AI: receptor *scavenger* da classe A tipo I

SR-AII: receptor *scavenger* da classe A tipo II

SR-BI: receptor *scavenger* da classe B tipo I

TG: triglicerídeos

TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa

TxA₂: Tromboxano A2

VCAM-1: molécula de adesão de célula vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Hipercolesterolemia, aterosclerose e disfunção endotelial.....	18
1.2. Óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂), isoformas da NO sintase (NOS) e função endotelial.....	22
1.3. NADPH oxidase e disfunção endotelial.....	28
1.4. Superóxido dismutase (SOD) e função endotelial.....	31
1.5. Treinamento físico, aterosclerose e disfunção endotelial.....	33
1.6. Camundongos hipercolesterolêmicos por deficiência genética (<i>knockout</i> do gene) do receptor de LDL (LDLr ^{-/-}).....	35
2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	37
3. OBJETIVO.....	39
4. ARTIGO: <i>Aerobic exercise training protects against endothelial dysfunction by increasing nitric oxide and hydrogen peroxide production in LDL receptor-deficient mice</i>	40
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO.....	75
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
7. ANEXOS.....	85

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hipercolesterolemia, aterosclerose e disfunção endotelial

A hipercolesterolemia familiar (HF) é uma doença genética autossômica caracterizada por elevadas concentrações plasmáticas de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e pela presença de sinais clínicos característicos, como xantomas tendíneos e risco aumentado de doença arterial coronariana prematura (Santos et al. 2012). O fenótipo clínico da HF é geralmente decorrente de mutações no gene LDLR, que codifica o receptor de LDL (LDLr) (Bronw & Goldstein 1986). De acordo com a I Diretriz Brasileira de HF, esta doença é responsável por 5 a 10% dos casos de doenças cardiovasculares em indivíduos abaixo de 55 anos (Santos et al. 2012). Estima-se que no mundo todo existam mais de 10 milhões de indivíduos portadores de HF, sendo este um problema de saúde mundial reconhecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Santos et al. 2012). Neste cenário, elevada concentração sérica de LDL caracteriza um importante fator de risco para doenças cardiovasculares, pois contribui para o desenvolvimento de aterosclerose e doenças coronarianas (Stapleton et al. 2010).

A hipercolesterolemia é um importante fator de risco para o desenvolvimento da aterosclerose (Moses 1954). A aterosclerose representa um conjunto de fenômenos patológicos incluindo processos inflamatórios, proliferativos e degenerativos que produzem lesões na parede do vaso (Ross 1999; Mitra et al. 2011). Essas lesões são caracterizadas pela presença de placas de gordura na parede arterial, podendo resultar em isquemia cardíaca, cerebral ou nas extremidades (Ross 1999; Yu et al. 2013). Assim, a aterosclerose é uma doença progressiva que envolve a proliferação de células musculares lisas e acúmulo de lipídios na parede do vaso, o que leva à formação de células espumosas de macrófagos, sendo os eventos isquêmicos consequentes da aterosclerose importante desfecho de doenças cardiovasculares como a hipertensão arterial e o diabetes tipo II (Ross 1999; Yamashita et al. 2010).

É interessante destacar que a doença aterosclerótica apresenta diferentes estágios de desenvolvimento, sendo a primeira fase deflagrada por fatores de risco,

dentre eles hipercolesterolemia e dislipidemia, citocinas pró-inflamatórias, hipertensão, produtos da glico-oxidação associados ao diabetes, tabagismo e à predisposição genética. A partir daí, os estágios da doença aterosclerótica progridem até finalmente resultarem em lesão podendo culminar em ruptura da placa e trombose (Manduteanu & Simionescu 2012). O desenvolvimento do ateroma é um processo gradual e contínuo, podendo ser didaticamente dividido em seis estágios:

Estágio I: Ativação da célula endotelial

As células endoteliais são responsáveis pela manutenção do tônus vascular via síntese e liberação de fatores de relaxamento e contração derivados do endotélio. Dentre os fatores de relaxamento encontram-se o óxido nítrico (NO), a prostaciclina (PGI₂) e os fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio, que variam de acordo com o leito vascular e espécie animal. Por outro lado, os fatores vasoconstritores derivados do endotélio incluem a endotelina-1, a angiotensina II, os prostanoídes vasoconstritores, dentre eles tromboxano A₂ (TxA₂) e prostaglandina (PGH₂), e o ânion superóxido (O₂⁻). Estas moléculas contribuem para a manutenção da homeostase vascular não apenas controlando o tônus, mas também a coagulação, crescimento celular, inflamação, agregação plaquetária e consequentemente o fluxo sanguíneo. Alterações na síntese e/ou atividade desses fatores podem culminar em disfunção endotelial favorecendo fatores pró-trombóticos e/ou causando um prejuízo no controle do tônus vascular (Goligorsky 2005; Skovgaard et al. 2011). Em suma, as células do endotélio vascular são responsáveis por controlar a permeabilidade da parede dos vasos sanguíneos, mantendo uma interface antitrombogênica e antiadesiva, ou seja, atuando de maneira a suprimir moléculas de transcrição envolvidas, por exemplo, nas interações de leucócitos com células endoteliais (Simionescu 2007). Assim, alterações na permeabilidade das células endoteliais podem resultar em prejuízos na sua função ateroprotetora.

Na hipercolesterolemia, um aumento na LDL circulante gera gradiente de concentração que induz aumento da transcitose endotelial destas moléculas, que se alocam na camada íntima e no espaço subendotelial da lâmina basal (Simionescu et al. 1986). A hipótese oxidativa da aterosclerose, segundo Raven et al. (1993), sugere que o processo aterosclerótico possa ser iniciado por danos no endotélio vascular, produzido por modificações oxidativas da LDL (Raven et al. 1993). A LDL

aprisionada na camada íntima interage com proteínas da matrix extracelular principalmente proteoglicanos, que participam da conversão aterogênica da LDL, que se torna uma lipoproteína oxidativamente modificada, a LDL oxidada (LDL_{ox}), rica em colesterol não esterificado (Simionescu et al. 1986). Nessa ocasião, a célula endotelial passa a apresentar alterações fenotípicas em seu padrão secretório, e são consideradas “ativadas” (Simionescu 2007) resultando no desenvolvimento de múltiplas camadas de lâmina basal. Esta proliferação da matrix extracelular subendotelial dificulta a comunicação entre célula endotelial e célula de músculo liso vascular, gerando respostas alteradas na parede vascular frente a estímulos externos.

Estágio II: Disfunção da célula endotelial

A ativação da célula endotelial e o aumento da camada subendotelial estimulam um processo inflamatório. Assim, nos estágios iniciais do desenvolvimento da aterosclerose em humanos e em modelos experimentais, a célula endotelial ativada apresenta aumento da expressão de citocinas inflamatórias e de moléculas de adesão celular como P-selectina, E-selectina, molécula de adesão de célula vascular (VCAM-1), molécula de adesão intercelular (ICAM-1) e proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) (Iiyama et al. 1999; Dong et al. 2000; Yang et al. 2003). Todas essas alterações resultam em disfunção da célula endotelial. No fim da década de 80, estudos pioneiros associaram pela primeira vez a disfunção endotelial à aterosclerose, demonstrando redução do relaxamento dependente do endotélio induzido com acetilcolina (ACh) em artérias coronárias de humanos com aterosclerose e em aorta de coelhos submetidos à dieta rica em colesterol (Wright & Angus 1986; Bossaller et al. 1987; Jayakody et al. 1987). A hipercolesterolemia e a aterosclerose são caracterizadas pelo comprometimento do relaxamento dependente do endotélio mesmo antes de ocorrerem mudanças estruturais vasculares, sendo a disfunção endotelial considerada um fator preditivo de desfechos clínicos (Jayakody et al. 1987; Kuvin & Karas 2003).

Estágio III: Recrutamento de células imunes sanguíneas

As modificações ocorridas na homeostase endotelial, que culminam em disfunção endotelial, coexistem com um processo inflamatório que atrai células imunes específicas, dentre elas monócitos, linfócitos T, neutrófilos e mastócitos,

além de células vasculares residentes, como células de músculo liso vascular e células dendríticas, que contribuem com o desenvolvimento da placa aterosclerótica. De acordo com a hipótese oxidativa, os monócitos diferenciam-se em macrófagos que capturam a LDLox acumulada na camada subendotelial, via receptores *scavenger* (SR), como SR-AI e SR-AII, CD36 e SR-BI, CD38 e LOX-1 (*lectin-like oxidized LDL receptor*), formando as chamadas células espumosas. A camada subendotelial que se forma entre a lâmina basal e a camada de músculo liso é conhecida como neoíntima (Moore & Freeman 2006). Em seguida forma-se um tipo de lesão caracterizada por estrias de gordura, pequenos depósitos subendoteliais de células espumosas (Moore & Freeman 2006; Mitra et al. 2011). As células espumosas levam à produção de numerosos marcadores inflamatórios, dentre eles interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), ciclooxigenase-2 (COX-2), além de elevar a produção de fatores de crescimento e de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Simionescu 2007).

Estágio IV: Formação da placa fibrosa

O processo inflamatório e aterogênico altera o fenótipo contrátil das células de músculo liso vascular para um fenótipo sintético, ou seja, estas células passam a sintetizar mais colágeno, proteoglicano e fibronectina. Além disso, passam a expressar também maior número de receptores relacionados à captura de lipídios causando a formação de células espumosas a partir das células de músculo liso vascular (Doran et al. 2008). Em adição, ocorrem proliferação e migração das células de músculo liso vascular da camada média para a camada íntima. Todos esses fatores contribuem para a formação de uma capa fibrosa. As metaloproteases (MMPs), em particular a MMP-2 e -9 ajudam a promover migração de células de músculo liso vascular e formação e espessamento da capa fibrosa, contribuindo para a estabilidade da placa aterosclerótica (Han et al. 2001; Simionescu 2007).

Estágio V: Formação da placa fibrolipídica calcificada

A placa aterosclerótica em estágio avançado é constituída basicamente por macrófagos, células espumosas, células de músculo liso vascular, gotículas lipídicas e núcleos de calcificação. Placas em estágio avançado podem ocupar grande parte do lúmen de artérias. O colesterol livre acumulado na placa aterosclerótica é um potente indutor de apoptose de células T e de células de

músculo liso vascular (Tiwari et al. 2008). O conteúdo de células apoptóticas, incluindo lipídios, contribuem para a formação de núcleos necróticos ricos em lipídios encapsulados por tecido fibroso, que é característico da placa fibrolipídica calcificada (Tabas et al. 2010). Esta placa, dotada de capa fibrosa derivada da atividade secretora das células do músculo liso vascular, é considerada uma placa estável. Um possível adelgaçamento da capa fibrosa, concomitante à infiltração de macrófagos, linfócitos T, células apoptóticas e ao acúmulo de grandes cristais de colesterol geram uma placa vulnerável, ou seja, instável, propensa à ruptura e consequentemente à trombose (Virmani et al. 2000).

Estágio VI: Ruptura e trombose

Os fatores que participam da ruptura do ateroma são o adelgaçamento da capa fibrosa, o excesso de citocinas inflamatórias e proteases, incluindo as MMPs, que levam a degradação das fibras de colágeno, e o acúmulo de detritos celulares dentro dos núcleos necróticos (Manduteanu & Simionescu 2012). Além disso, as plaquetas apresentam um importante papel na vulnerabilidade da placa e trombose. Quando as plaquetas são expostas à matriz extracelular rica em fatores pró-inflamatórios oriundos de uma placa em ruptura, tornam-se ativadas e se agregam, colaborando para a formação do trombo na superfície da lesão (Manduteanu & Simionescu 2012). A oclusão vascular pela trombose está associada a eventos isquêmicos como infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral, que constituem as duas principais causas de morte no mundo de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS 2012).

1.2. Óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), isoformas da NO Sintase (NOS) e função endotelial

Alterações na produção de NO pela enzima NO sintase (NOS) assim como modificação da biodisponibilidade do NO destacam-se como importantes mecanismos fisiopatológicos envolvidos na disfunção endotelial associada à aterosclerose (Stapleton et al. 2010; Li & Forstermann 2013). Em 1980, Furchgott & Zawadzki documentaram que, quando estimulado com acetilcolina, o endotélio era capaz de liberar uma substância vasoativa que foi denominada fator relaxante

derivado do endotélio (Furchgott & Zawadzki, 1980). Posteriormente, Ignarro e cols. (1987) identificaram este composto como sendo o NO. O NO é considerado o principal regulador do tônus vascular dependente do endotélio, e adicionalmente é importante na prevenção da ativação plaquetária, na inibição do estresse oxidativo, do crescimento celular, da migração e da proliferação das células do músculo liso vascular, sendo um importante fator anti-hipertensivo e antitrombótico (Kauser et al. 2000; Li et al. 2014).

A produção enzimática do NO ocorre a partir da oxidação do aminoácido L-arginina mediada por três diferentes isoformas da NOS: a NOS neuronal (nNOS ou NOS I), a NOS induzida (iNOS ou NOS II) e a NOS endotelial (eNOS ou NOS III). As isoformas compartilham 50% a 60% de homologia na sequência de aminoácidos, nos domínios oxidase e redutase (Dias et al. 2011). A eNOS e a nNOS são isoformas constitutivas (cNOS), enquanto a iNOS é induzida por citocinas e outros agentes inflamatórios e por algumas EROs (Andrew et al. 1999). Na forma dimérica, as NOS sintetizam NO utilizando L-arginina como substrato e, como cofatores, o oxigênio molecular, NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo de fosfato), FAD (flavina adenina dinucleotídeo), FMN (flavina mononucleotídeo) e BH₄ (tetrahidrobiopterina) (Förstermann & Sessa 2012). Há transferência de elétrons da NADPH, via FAD e FMN, do domínio redutase carboxi-terminal de um monômero para o domínio oxigenase amino-terminal do monômero adjacente. Ao domínio oxigenase também se ligam L-arginina, oxigênio molecular e BH₄. A transferência de elétrons é importante para reduzir e ativar o oxigênio molecular e oxidar L-arginina em L-citrulina e NO (Förstermann & Sessa 2012). As três isoformas ligam-se à calmodulina; quanto maior a afinidade da NOS com a calmodulina, maior será a facilidade do fluxo de elétrons do domínio redutase de um monômero ao domínio oxigenase do outro. O mecanismo clássico de ativação das isoformas constitutivas é dependente do cálcio (Ca²⁺), enquanto a iNOS independe da elevação das concentrações intracelulares de Ca²⁺, devido a sua alta afinidade de ligação com a calmodulina (Dias et al. 2011; Förstermann & Sessa 2012).

O NO é lipossolúvel e assim difunde-se através das membranas celulares. No músculo liso vascular liga-se ao ferro do grupo prostético heme da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) que então é ativada, promovendo a conversão de trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), resultando em ativação da proteína quinase G (PKG) responsável por ativar

a fosfatase da cadeia leve de miosina (CLM), que desfosforila a CLM levando ao relaxamento vascular (Ignarro et al. 1986; Francis et al. 2010). Além disso, a PKG inibe a via contrátil da RhoA/Rho quinase, diminui a probabilidade dos canais para Ca^{2+} tipo L encontrarem-se no estado aberto, reduzindo o influxo de Ca^{2+} ; e ainda aumenta a probabilidade dos canais para potássio (K^+) encontrarem-se no estado aberto, o que leva à hiperpolarização. Todos esses fatores também contribuem para o relaxamento do músculo liso vascular mediado pela ação do NO (Francis et al. 2010). Cabe ressaltar que além de produzir NO, a nNOS pode contribuir para o relaxamento vascular dependente do endotélio pela produção de H_2O_2 em aorta de camundongos (Capettini et al. 2010; 2011). Neste vaso, o H_2O_2 derivado da nNOS contribui igualmente ao NO derivado da eNOS para o relaxamento dependente do endotélio (Capettini et al. 2010).

Em condições fisiológicas a eNOS é responsável pela produção da maior parte do NO derivado do endotélio, por esta razão apresenta importante papel na homeostase cardiovascular, o que pode ser observado em camundongos *knockout* para eNOS que são hipertensos e mais suscetíveis a alterações cardiovasculares (Huang et al. 1995; Li et al. 2002). Importantes modificações pós-traducionais podem afetar a atividade da eNOS, dentre elas acetilação, interações proteína-proteína, disponibilidade de substrato e de cofatores e o grau de fosforilação (Qian & Fulton 2013). Nas células endoteliais a eNOS encontra-se majoritariamente ancorada à cavéola, invaginações ricas em colesterol da membrana plasmática (Shaul et al. 1996). Quando ancorada à cavéola, a eNOS encontra-se inativada devido a uma forte interação com a proteína caveolina-1 (cav-1) (Dias et al. 2011; Förstermann & Sessa 2012). Esta interação proteína-proteína inibe a atividade da eNOS principalmente por interferir com o sítio de ligação da calmodulina (Ju et al. 1997). Por outro lado, a ativação da calmodulina por ligação ao Ca^{2+} desloca a cav-1 e favorece a ativação da eNOS (Qian & Fulton 2013).

Um dos mecanismos de ativação da eNOS é através da fosforilação da serina na posição 1177 (Ser1177) no domínio redutase da enzima (Boo et al. 2006), capaz de aumentar a sensibilidade da eNOS às concentrações basais de Ca^{2+} /calmodulina, resultando em aumento na produção de NO. Diferentes agonistas como a acetilcolina ativam a fosfatidilinositol-3 quinase (PI-3K), que fosforila a proteína quinase B (Akt) ativando-a e induzindo a fosforilação da eNOS em Ser1177 (Fulton et al. 1999). Embora a fosforilação do resíduo Ser1177 desempenhe

importante papel na ativação enzimática da eNOS, sabe-se que sua regulação também é dependente do padrão de fosforilação de outros sítios (Mount et al. 2007). A fosforilação do resíduo de Ser633, localizado no domínio de ligação da FMN, também aumenta a atividade da eNOS e apresenta importante papel na manutenção da síntese de NO após a ativação por Ca^{2+} /calmodulina e fosforilação do resíduo de Ser1177 da eNOS (p-eNOS^{Ser1177}). Por outro lado, a fosforilação dos resíduos de treonina 495 (Thr495) pela proteína quinase C (PKC) e de tirosina 657 (Tyr657) pela tirosina quinase 2 (PYK2) podem inibir a atividade da eNOS (Mount et al. 2007; Fisslthaler et al. 2008).

A importância do estado de fosforilação da eNOS na aterosclerose tem sido demonstrada. Camundongos *knockout* para apolipoproteína E (apoE^{-/-}), modelo experimental para aterosclerose, quando receberam infusão de angiotensina II apresentaram redução no relaxamento dependente do endotélio acompanhado de redução da p-eNOS^{Ser1177} em aorta (Seto et al. 2013). O mesmo foi observado em artéria mamária interna esquerda de pacientes com doença arterial coronariana, que apresentaram piora na função endotelial juntamente com redução na expressão de p-eNOS^{Ser1177} (Hambrecht et al. 2003). Poucos trabalhos avaliaram os sítios de inativação da eNOS na aterosclerose. Recente estudo mostrou que camundongos apoE^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram redução na expressão proteica de p-eNOS^{Ser1177} e de eNOS total em aorta, porém sem alteração da p-eNOS^{Thr495} (Xing et al. 2015). Por outro lado, plaquetas tratadas com homocisteína, que induz injúria endotelial e ativação plaquetária, apresentaram aumento na fosforilação da eNOS em Thr495 e desfosforilação em Ser1177 (Signorello et al. 2009). Entretanto, o papel da fosforilação da eNOS em seus sítios de inibição na doença aterosclerótica ainda permanece incerto.

Em condições patológicas, além de alterações nos estados de fosforilação da eNOS, esta pode encontrar-se em estado desacoplado (Li & Förstermann 2013). Neste caso, a transferência de elétrons entre as subunidades da forma dimérica da eNOS fica prejudicada e a enzima reduz a produção de NO em detrimento do aumento da geração de $\text{O}_2^{\cdot-}$. Assim, além da redução da síntese de NO há um concomitante aumento da sua degradação, uma vez que o $\text{O}_2^{\cdot-}$ reage com o NO inativando-o e formando outra ERO, o ânion peroxinitrito (ONOO^-), contribuindo para um desequilíbrio do estado redox (Gryglewski et al. 1986). Diversos são os mecanismos que podem levar ao desacoplamento da eNOS:

redução na biodisponibilidade de BH_4 , deficiência de L-arginina, acúmulo de inibidores endógenos da NOS como a dimetilarginina assimétrica (ADMA) e a glutationilação da eNOS (Chen et al. 2010). Tem-se descrito que uma das causas da redução da biodisponibilidade do NO na hipercolesterolemia e na aterosclerose avançada é o desacoplamento da eNOS com consequente redução da síntese de NO e aumento de O_2^- e ONOO^- (Li & Förstermann 2013). De acordo, a indução do aumento da síntese de BH_4 é capaz de reduzir o desenvolvimento da lesão aterosclerótica em camundongos $\text{apoE}^{-/-}$, associado a menor geração de O_2^- pela eNOS (Takaya et al. 2007), além de melhorar a disfunção endotelial em pacientes com aterosclerose (Antoniades et al. 2011). Cabe ressaltar que uma ativação da NADPH oxidase e uma redução de glutathione tecidual também são mecanismos envolvidos no desequilíbrio redox na aterosclerose, contribuindo para aumento da produção de EROs e redução da biodisponibilidade do NO (Judkins et al. 2010; Lassègue & Griendling 2010; Mancini et al. 2014).

Mais recentemente, adicionado aos mecanismos que envolvem o prejuízo na produção e biodisponibilidade do NO na disfunção endotelial na aterosclerose, tem sido descrito a importância do H_2O_2 neste processo. O H_2O_2 é considerado um fator relaxante derivado do endotélio que apresenta significativo papel no relaxamento de artérias mesentéricas de camundongos (Matoba et al. 2000), coronárias de cães (Yada et al. 2003) e aorta de camundongos (Rabelo et al. 2003; Capettini et al. 2008; 2010; 2011). Cabe destacar a importância vasodilatadora do H_2O_2 demonstrado em artérias mesentéricas e coronárias de humanos (Matoba et al. 2002; Miura et al. 2003). O H_2O_2 pode atuar como fator contrátil ou relaxante em vasos sanguíneos através de diversos mecanismos que dependem de suas concentrações, tipos de vasos e espécies animais (Ardanaz & Pagano 2006). O mecanismo envolvido na vasoconstrição observado em aorta de ratos e artéria basilar de cachorros parece ocorrer por ativação de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, assim como por aumento da liberação do Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático via PI-3K na célula de músculo liso, o que promove aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular resultando em contração (Ardanaz & Pagano 2006). Entretanto os mecanismos contráteis dependentes do H_2O_2 ainda precisam ser mais esclarecidos. Com relação à ação vasodilatadora do H_2O_2 , foi demonstrado que em artérias mesentéricas de camundongos, o H_2O_2 atua como um fator hiperpolarizante derivado do endotélio, ativando canais para K^+ ativados por Ca^{2+} de baixa (SK) e

intermediária condutância (IK) nas células endoteliais, provocando hiperpolarização destas e das células do músculo liso adjacente, com consequente relaxamento vascular (Prysyazhna et al. 2012). Mais especificamente em aorta, foi demonstrado que o H_2O_2 induz relaxamento por elevar o influxo de Ca^{2+} na célula endotelial, promovendo ativação da eNOS, produção de NO e consequente relaxamento do músculo liso vascular (Zembowicz et al. 1993; Yang et al. 1999). Porém, trabalhos posteriores demonstram que o H_2O_2 pode ativar a PKG e promover vasodilatação independente da via de sinalização GCs/GMPc ativada pelo NO, tanto em aorta (Prysyazhna et al. 2012; Godo et al. 2016), como em artérias coronárias de humanos (Zhang et al. 2012). Estes trabalhos evidenciam o importante papel do H_2O_2 no relaxamento de diferentes leitos vasculares, assim como a variedade de mecanismos de ação deste fator.

Estudos mostram que a nNOS das células endoteliais de aorta de camundongos, além de NO produzem H_2O_2 (Capettini et al. 2008; 2010). Estes autores demonstraram que o H_2O_2 produzido pela nNOS contribui igualmente ao NO para o relaxamento dependente do endotélio em aorta de camundongos (Capettini et al. 2008; 2010). E, interessante, uma redução da síntese do H_2O_2 foi demonstrada ser um dos fatores responsáveis pela redução do relaxamento dependente do endotélio induzido por acetilcolina em aorta de camundongos knockout para o receptor de LDL ($LDLr^{-/-}$) e $apoE^{-/-}$ (Rabelo et al. 2003; Capettini et al. 2011), além de ser um dos prováveis fatores relacionados ao desenvolvimento acelerado da lesão aterosclerótica (Langbein et al. 2015a). A redução da produção de H_2O_2 foi associada a menor ativação da nNOS hiperfosforilada em seu sítio de inativação Ser852 (Capettini et al. 2011).

A fosforilação da nNOS é regulada por algumas quinases e fosfatases, por exemplo, PKA, PKC, quinases dependentes de calmodulina (como a CaMKII) e fosfatase 1, as quais são reguladas por sinais extra e intracelulares (El-Mlili et al. 2008). Assim como observado na eNOS, a fosforilação de diversos sítios da nNOS afetam sua atividade de maneira diferente. A proteína quinase CaMKII fosforila o resíduo Ser847, que reduz a atividade da nNOS por inibir a ligação Ca^{2+} -Calmodulina. Por outro lado, a proteína fosfatase 1 reduz a fosforilação em Ser847, resultando em aumento da atividade de nNOS (Rameau et al. 2004; El-Mlili et al. 2008). A fosforilação do resíduo Ser852 pela PKA ou PKG gera inativação da nNOS. Outro sítio de fosforilação da nNOS é no resíduo Ser1412, que de forma análoga à

Ser1177 da eNOS, via Akt promove ativação da nNOS (Adak et al. 2001). Portanto, alterações no estado de fosforilação da nNOS interferem com seu padrão de atividade e consequentemente com a produção de NO e de H_2O_2 .

Na nNOS a produção de $O_2^{\cdot-}$ e de H_2O_2 ocorre de maneira fisiológica em etapas que antecedem a formação do NO (Rosen et al. 2002; Tsai et al. 2005; Weaver et al. 2005). Dessa forma, o H_2O_2 proveniente da nNOS pode ser formado por duas vias diferentes. Uma delas é a partir do $O_2^{\cdot-}$, ou seja, alterações no estado de oxidação/redução do ferro, oxigênio e BH_4 na nNOS são descritos levar a formação de $O_2^{\cdot-}$, que por ação da enzima superóxido dismutase (SOD) rapidamente é convertido em H_2O_2 . A outra via não necessita de formação previa de $O_2^{\cdot-}$, ou seja, na presença de L-arginina a formação de $O_2^{\cdot-}$ é substituída por um complexo mais estável, o $Fe^{3+}-O_2^{\cdot-}$. Este complexo possibilita a formação direta de H_2O_2 na presença do íon H^+ proveniente da NADPH. Como dito anteriormente, ambas as vias de formação do H_2O_2 ocorrem em uma etapa anterior à formação do NO. Somente após a formação do H_2O_2 com liberação de Fe^{3+} ocorre a produção de L-citrulina e NO (Weaver et al. 2005).

1.3. NADPH oxidase e disfunção endotelial

Diversos trabalhos demonstraram que um quadro de estresse oxidativo com aumento da produção e/ou redução da degradação de EROs, em particular o $O_2^{\cdot-}$, contribui efetivamente para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, dentre elas hipertensão, hipertrofia e falência cardíaca, reestenose e aterosclerose (Cosentino et al. 2001; Paravicini et al. 2002; Cangemi et al. 2007; Custodis et al. 2008; Paravicini & Touyz 2008; Rabelo et al. 2009; Judkins et al. 2010). Múltiplos sistemas enzimáticos produzem EROs e seus derivados na vasculatura, incluindo ciclooxigenase, lipoxigenase, citocromo P450, xantina oxidase, NOS e NADPH oxidase. A NADPH oxidase é uma das mais importantes fontes de EROs tanto em células endoteliais como em células musculares lisas (Cosentino et al. 2001; Cai et al. 2003; Lassègue & Clempus 2003; Cangemi et al. 2007; Custodis et al. 2008; Paravicini & Touyz 2008; Rabelo et al. 2009).

A NADPH oxidase atua como doadora de elétron para a redução do oxigênio (O_2) a $O_2^{\cdot-}$, segundo a reação $2O_2 + NAD(P)H \rightarrow 2O_2^{\cdot-} + NAD(P) + H^+$ (Paravicini et al. 2002; Paravicini & Touyz 2008). O NO é também um radical livre e

quando reage com o O_2^- forma rapidamente uma espécie altamente reativa o $ONOO^-$. Assim, a maior parte da citotoxicidade atribuída ao NO é derivada do $ONOO^-$ (Dusting et al. 2004; Touyz & Schiffrin 2004). Este último é um importante mediador da peroxidação de lipídios, incluindo a oxidação da LDL, evento crucial para a aterogênese, como já mencionado anteriormente (Dusting et al. 2004). Em condições patológicas, um aumento extracelular de O_2^- leva à diminuição da biodisponibilidade do NO, reduzindo sua difusão para o músculo liso vascular e desta forma prejudicando a resposta relaxante do vaso (Adachi et al. 2004).

A produção elevada de O_2^- colabora para geração de estresse oxidativo, ativação de cascata inflamatória e prejuízo da ação vasoprotetora do NO, colaborando para o desenvolvimento da aterosclerose e instabilidade da placa (Sorescu et al. 2002; Bleys et al. 2006). Aumentada produção de O_2^- pela NADPH oxidase está relacionada a fatores de risco para a aterosclerose com prejuízo da função endotelial em pacientes com doença coronariana (Dusting et al. 2004). De acordo, há aumento da expressão das subunidades Nox2 e p22phox da NADPH oxidase na região vulnerável da placa aterosclerótica de pacientes com doença arterial coronariana, colaborando para instabilidade e ruptura da placa aterosclerótica nestes indivíduos (Sorescu et al. 2002).

A NADPH oxidase é um complexo proteico multimérico com componentes na membrana celular e no citoplasma. O protótipo da NADPH oxidase encontrado em células fagocíticas, envolvido na imunidade inata por gerar elevadas concentrações de EROs, é formado por uma subunidade maior, a gp91phox (também conhecida como Nox2), e uma menor, p22phox (Lassègue & Clempus 2003). Além destas, a enzima compreende três subunidades citoplasmáticas (p47phox, p67phox e p40phox) e uma pequena proteína G regulatória (Rac2). A ativação da NADPH oxidase inicia-se pela fosforilação em serina da subunidade citoplasmática p47phox, que desencadeia sua migração para a membrana, onde, juntamente com a Rac, associa-se ao citocromo b558, iniciando a atividade catalítica da enzima (Cai et al. 2003; Dusting et al. 2004; Touyz & Schiffrin 2004; Chen et al. 2008). A identificação de subunidades homólogas à gp91phox resultou na formação da família Nox, constituída atualmente por sete membros (Nox1, Nox2 ou gp91phox, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 e Duox2) (Chen et al. 2008; Rabelo et al. 2009). As subunidades são distribuídas de forma específica em diferentes células e tecidos, podendo gerar diferentes EROs. Em células não fagocíticas as subunidades da

NADPH oxidase produzem relativamente menor quantidade de EROs, que atuam como segundos mensageiros em diversas vias de sinalização (Montezano et al. 2001). Pelo menos quatro subunidades da NADPH oxidase são encontradas na parede dos vasos sanguíneos (Nox1, Nox2, Nox4 e Nox5), sendo uma das principais fontes de EROs no sistema cardiovascular (Lassègue & Griendling 2010). As EROs derivadas das diferentes subunidades da NADPH oxidase influenciam a função vascular modulando vasoconstrição e vasodilatação, crescimento celular, apoptose, senescência, respostas inflamatórias, fibrose, migração e calcificação (Briones et al. 2010; Petry et al. 2010).

Em condições fisiológicas a Nox4 é altamente expressa em todos os tipos celulares que constituem a parede do vaso, ou seja, células endoteliais, células de músculo liso vascular e fibroblastos da adventícia (Ambasta et al. 2004; Martyn et al. 2006). Diferente das demais subunidades da NADPH oxidase, o principal produto da Nox4 não é o $O_2^{\cdot -}$ e sim o H_2O_2 (Martyn et al. 2006; Dikalov et al. 2008; Gordillo et al. 2010). São descritos diversos estímulos que podem aumentar a expressão vascular da Nox4, dentre eles o estresse de cisalhamento fisiológico (Hwang et al. 2003), injúria arterial (Szocs et al. 2002) e hipóxia (Ismail et al. 2009). Em relação ao papel da Nox4 na aterosclerose os dados são ainda controversos. Em coronária humana observou-se um aumento na expressão da Nox4 no estágio IV do desenvolvimento da placa aterosclerótica, sugerindo papel da Nox4 na aterosclerose (Sorescu et al. 2002). De acordo, trabalhos sugerem um papel patológico para a ativação da Nox4 relacionado à estimulação da migração e hipertrofia de células de músculo liso (Sturrock et al. 2007; Lyle et al. 2009). Entretanto, mais recentemente foi demonstrado que a deleção da Nox4 resulta em aumento na adesão de leucócitos e acelera o desenvolvimento da aterosclerose em camundongos apoE^{-/-} (Schürmann et al. 2015), além de contribuir para a disfunção endotelial em camundongos LDLr^{-/-} (Langbein et al. 2015a). Tendo em vista esses dados controversos, são necessários mais estudos para esclarecer a discrepância de resultados referentes ao papel fisiológico e patológico da Nox4.

Ao contrário da Nox4, as subunidades Nox1 e Nox2 fisiologicamente são pouco expressas nos vasos sanguíneos, mas apresentam-se elevadas em condições de risco de doenças cardiovasculares como hipertensão, diabetes e hiperlipidemia (Bengtsson et al. 2003; Wendt et al. 2005; Judkins et al. 2010). A Nox5 tem significativa homologia com a Nox1 e a Nox2 (Bánfi et al. 2001; Cheng et

al. 2001), apresenta ação aterogênica e, curiosamente, não pode ser encontrada em roedores (Kawahara et al. 2007; Fulton 2009). O papel da Nox1 em doenças cardiovasculares tem sido principalmente associado à hipertensão. A Nox1 vascular e renal apresenta-se aumentada em modelos experimentais de hipertensão (Lassègue & Clempus 2003; Wang et al. 2007; Nishiyama et al. 2004). A hipertensão induzida por angiotensina II é atenuada por administração *in vivo* de siRNA (*small interfering RNA*) da p22phox (Modlinger et al. 2006) ou inibidor da PKC, que promovem redução no aumento da Nox1 observada neste modelo (Lassègue & Clempus 2003). Além disso, a Nox1 pode ser estimulada ou ativada em células vasculares de músculo liso tratadas com angiotensina II, ou com LDL ou com produtos finais da glicação avançada (Lassègue & Clempus 2003; Katsuyama et al. 2007; San Martin et al. 2007). A Nox 1 também tem sido associada à migração e proliferação de células de músculo liso vascular, podendo ter importante papel no desenvolvimento da aterosclerose (Lassègue & Griendling 2010).

A Nox2 é expressa em células endoteliais, fibroblastos da adventícia e células inflamatórias invasoras que contribuem para o desenvolvimento da lesão aterosclerótica (Sorescu et al. 2002). A Nox2 produz $O_2^{\cdot-}$ intra e extracelular que, desta forma, rapidamente neutraliza o NO prejudicando o relaxamento vascular. A expressão da Nox2 foi inversamente correlacionada ao relaxamento dependente do endotélio em aorta isolada (Peshavariya et al. 2009; Takenouchi et al. 2009) e, a deleção da Nox2 promoveu inibição da contração da aorta mediada pela PKC (Gupte et al. 2009). Além disso, estudo com camundongo Nox2^{-/-}apoE^{-/-} mostrou que a deleção da Nox2 foi associada com redução na produção de $O_2^{\cdot-}$, significante melhora da biodisponibilidade de NO e discreta redução da placa aterosclerótica ao longo do comprimento da aorta, demonstrando a importância da Nox2 nos estágios iniciais do desenvolvimento da aterosclerose (Judkins et al. 2010).

1.4. Superóxido Dismutase (SOD) e função endotelial

A superóxido dismutase (SOD) é o principal sistema de defesa antioxidante contra o $O_2^{\cdot-}$ (Fukai & Ushio-Fukai 2011). A SOD dismuta o $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e O_2 , sendo o H_2O_2 decomposto em H_2O e O_2 por ação de enzimas como a catalase, a glutathione peroxidase ou peroxirredoxinas (Fukai & Ushio-Fukai 2011).

Uma inadequada remoção e/ou aumento na produção de O_2^- resulta em estresse oxidativo, que tem sido implicado na fisiopatologia de doenças cardiovasculares, incluindo aterosclerose, hipertensão, diabetes e insuficiência cardíaca (Bogdan et al. 2000). Como já mencionado anteriormente, o O_2^- pode rapidamente reagir com o NO formando $ONOO^-$ um potente oxidante, sendo esta reação uma importante condição que leva a disfunção endotelial (Guzik & Harrison 2006, Madamanchi & Runge 2007). Em mamíferos existem três isoformas da SOD: uma cobre-zinco citoplasmática conhecida como CuZn-SOD ou SOD1, uma mitocondrial conhecida como manganês SOD (Mn-SOD ou SOD2) e uma cobre-zinco extracelular conhecida como ecSOD ou SOD3. Cada isoforma é produto de genes distintos, entretanto catalisam a mesma reação (Fukai & Ushio-Fukai 2011).

Elevadas concentrações de SOD3 são encontradas entre a camada endotelial e de músculo liso vascular, local onde o NO derivado do endotélio atravessa para estimular o relaxamento do músculo liso (Oury et al. 1996). Devido à sua localização, a SOD3 apresenta papel crítico na prevenção da destruição do NO liberado pelo endotélio, evidenciando a importância da SOD3 para a regulação da biodisponibilidade de NO (Fukai & Ushio-Fukai 2011). Estudos têm associado redução na expressão de SOD3 com agravamento da doença arterial coronariana e aterosclerose (Fukai et al. 1998). No mesmo sentido, a deficiência de SOD2 parece ser responsável pela disfunção endotelial devido ao aumento de O_2^- e dano mitocondrial crônico em camundongos $apoE^{-/-}$ (Ohashi et al. 2006). Camundongos idosos heterozigotos para SOD2 ($SOD2^{+/-}$) apresentaram prejuízo no relaxamento vascular e elevados níveis de produção de EROs mitocondrial, sugerindo que a formação de radicais pela mitocôndria contribui significativamente para a disfunção endotelial relacionada ao envelhecimento (Wenzel et al. 2008). Resultados parecidos foram encontrados para SOD1, camundongos deficientes de SOD1 apresentaram prejuízo na função vascular associado com aumento de O_2^- (Didion et al. 2002). Por outro lado, uma superexpressão de SOD1 em camundongos $apoE^{-/-}$ resultou em retardo no desenvolvimento da aterosclerose (Fang et al. 1998). Em adição, camundongos $LDLr^{-/-}$ deficientes de leptina ($LDLr^{-/-} ob/ob^{-/-}$) com 24 semanas de idade apresentaram redução na expressão gênica de SOD1 associada ao aumento da deposição de LDLox em placas ateroscleróticas localizadas na aorta (Verreth et al. 2007).

1.5. Treinamento físico, aterosclerose e disfunção endotelial

A *American Heart Association* (AHA) e o *American College of Sports Medicine* (ACSM) lançaram orientações recomendando atividades físicas aeróbicas e de resistência para indivíduos com idade entre 18 e 65 anos com objetivo de manter a saúde, reduzir o risco de doenças crônicas, e gerenciar atuais fatores de risco cardiovascular, incluindo a hipercolesterolemia (Haskell et al. 2007). O treinamento físico apresenta ação no sistema cardiovascular sendo importante alternativa ou complementação para restaurar a função endotelial na hipercolesterolemia ou em doenças ateroscleróticas periféricas. Muitos trabalhos demonstraram em diversos modelos experimentais que o exercício físico aeróbio apresenta efeitos benéficos no estresse oxidativo e no perfil lipídico, e consequentemente no desenvolvimento da aterosclerose (Yang et al. 2003; Ramachandran et al. 2005; Teodoro et al. 2012).

Durante a atividade física aeróbia ocorrem alterações hemodinâmicas que incluem aumento na frequência cardíaca, débito cardíaco e fluxo sanguíneo, fatores que contribuem para os efeitos benéficos do exercício. Essas alterações hemodinâmicas podem estar relacionadas às modificações benéficas encontradas na estrutura e função vascular resultantes da prática de atividade física (Newcomwe et al. 2011). O aumento no fluxo sanguíneo durante o exercício gera uma força de cisalhamento (do inglês “*shear stress*”) na parede do vaso, que apresenta papel protetor na função endotelial e no desenvolvimento da aterosclerose (Newcomwe et al. 2011; Bretón-Romero et al. 2012). São descritos diversos efeitos benéficos do *shear stress* laminar sobre a função endotelial, dentre eles aumento na expressão gênica, proteica e da atividade da eNOS, redução na biodisponibilidade de endotelina-1 e aumento na produção de NO e H₂O₂ em cultura células endoteliais (Miller et al. 1992; Nadaud et al. 1996; Bretón-Romero et al. 2012).

Além disso, os efeitos benéficos do exercício aeróbio crônico podem incluir aumento da defesa antioxidante e da biodisponibilidade ou produção de NO, redução basal de oxidantes e de fatores inflamatórios (Napoli et al. 2006; Stapleton et al. 2010; Barhoumi et al. 2014). Em coelhos com hipercolesterolemia induzida por dieta com 2% de colesterol por 8 semanas, um programa de exercício aeróbio em esteira melhorou o relaxamento dependente do endotélio na aorta torácica, diminuiu

a espessura da camada íntima da aorta e reduziu a expressão de moléculas de adesão como VCAM-1, P-Selectina, MCP-1 e também a expressão de iNOS (Yang et al. 2003). Em aorta de camundongos hipercolesterolêmicos, alimentados com dieta tipo *Western*, o treinamento de longa duração, moderado e graduado, foi capaz de reduzir a lesão aterosclerótica, combater o estresse oxidativo, aumentar a expressão proteica da eNOS e a biodisponibilidade de NO (Napoli et al. 2004; 2006). Reforçando esses dados, em camundongos LDLr^{-/-} com lesão aterosclerótica estabelecida induzida por dieta hiperlipídica, o treinamento físico em esteira de baixa e de moderada intensidade promoveu redução na lesão aterosclerótica, aumento nos níveis plasmáticos de lipoproteína de alta densidade (HDL) e melhora no balanço oxidativo hepático, caracterizado por aumento de SOD 3, catalase e glutathione peroxidase, além de redução da peroxidação lipídica (Teodoro et al. 2012). Corroborando estes dados, um programa de treinamento físico de natação por 9 semanas foi capaz de melhorar o relaxamento dependente do endotélio em camundongos apoE^{-/-} alimentados com dieta com alto teor de gordura e colesterol (Pellegrin et al. 2007).

Sabe-se que dietas do tipo *Western* podem induzir dislipidemia e acelerar o processo aterosclerótico, porém estes efeitos estão associados à indução de obesidade, resistência à insulina e diabetes (Meilhac et al. 2001; Napoli et al. 2004; Pellegrin et al. 2007; de Oliveira et al. 2014). Estudos prévios demonstraram que o exercício físico aeróbio crônico em esteira é capaz de apresentar efeitos benéficos na função endotelial, no remodelamento vascular e na melhora da via da eNOS/NO em diferentes vasos como aorta, artéria mesentérica, artéria femoral e coronária em modelos experimentais de obesidade e diabetes tipo II sem aterosclerose (de Moraes et al. 2008; Delbin et al. 2012; Trask et al. 2012). Entretanto, não está claro se um protocolo de treinamento físico poderia ser benéfico para a disfunção endotelial encontrada no estágio inicial do desenvolvimento da aterosclerose, independente dos fatores prejudiciais adicionais de uma dieta tipo *Western*.

Todos os estudos acima citados deixam claro o importante papel dos diferentes tipos e modalidades de treinamento físico em melhorar diversos parâmetros na função vascular, inflamação e estresse oxidativo nos estágios mais avançados da doença aterosclerótica. Porém, um possível papel do treinamento físico aeróbio nas fases iniciais da doença aterosclerótica associada ao quadro de hipercolesterolemia, como apresentado por pacientes com HF, não é claro na

literatura. Além do mais, não há estudos que associem um papel do exercício físico à maior expressão e/ou atividade da nNOS, assim como na produção de H_2O_2 na aterosclerose. Recentemente demonstrou-se um aumento da expressão da nNOS e da função vascular em segmentos da artéria mesentérica de ratos obesos submetidos a treinamento físico aeróbio por 8 semanas (Sastre et al. 2015) e de ratos espontaneamente hipertensos submetidos a treinamento físico em esteira por 8 semanas (Blanco-Rivero et al. 2013). Assim, no presente trabalho levantamos a hipótese de que o exercício físico aeróbio poderia aumentar a expressão da nNOS e a produção de H_2O_2 em aorta de camundongos $LDLr^{-/-}$ nos estágios iniciais da aterosclerose.

1.6. Camundongos hipercolesterolêmicos por deficiência genética (*knockout* do gene) do receptor de LDL ($LDLr^{-/-}$)

Diversos modelos de aterosclerose em camundongos têm sido utilizados para investigar o desenvolvimento e a progressão da lesão aterosclerótica (Getz et al. 2006). Dentre estes modelos, destacam-se os camundongos *knockout* para o gene da apolipoproteína E ($apoE^{-/-}$) e os camundongos *knockout* para o receptor de LDL ($LDLr^{-/-}$). Os primeiros desenvolvem dislipidemia severa, uma vez que a apoE é responsável pela remoção da LDL circulante. Além disso, mesmo sem a administração de dietas aterogênicas, esses camundongos desenvolvem placas ateroscleróticas espontaneamente (Coleman et al. 2006). Já os camundongos $LDLr^{-/-}$, que foram desenvolvidos por Ishibashi e cols. (1993), mimetizam a HF humana devido a deficiência induzida do gene do LDLr, que resulta em aumento da concentração de LDL no soro e, sob dieta aterogênica, no desenvolvimento de lesão aterosclerótica progressiva (Zaragoza et al. 2011). Uma das principais vias de entrada do colesterol nas diferentes células do organismo é através do receptor de LDL, assim, defeitos genéticos neste receptor resultam em hipercolesterolemia e aterosclerose precoce em seres humanos (Brown & Goldstein 1986). Além disso, células de vários tecidos destes camundongos encontram-se sob estresse oxidativo de origem mitocondrial (Oliveira et al. 2005). Segundo Oliveira et al. 2005, o aumento de geração de EROs mitocondrial foi relacionada à redução na capacidade antioxidante das mitocôndrias, que apresentaram redução no conteúdo de NADPH,

principal redutor para reconstituição do sistema enzimático glutathione redutase/peroxidase.

Os camundongos LDLr^{-/-} quando alimentados com dieta padrão apresentam concentração plasmática de colesterol por volta de 300 mg/dl, o que representa um aumento de aproximadamente 3 vezes da concentração encontrada nos camundongos selvagens (Hasty et al. 2001; Veniant et al. 2001). Ainda sem a utilização de dietas aterogênicas esses camundongos com 20 semanas de idade já apresentam deposição lipídica no seio aórtico, porém sem desenvolvimento de placas ateroscleróticas ao longo da aorta descendente, que caracterizam os estágios mais avançados da doença (Ishibashi et al. 1993; Dorighello et al. 2014). Por outro lado, quando os camundongos LDLr^{-/-} são alimentados com dietas hiperlipídicas ou hipercolesterolêmicas apresentam concentrações de colesterol total circulante por volta de 1500 mg/dl, com consequente aceleração e agravamento do desenvolvimento da lesão aterosclerótica (Krieger et al. 2006; Hort et al. 2012).

Em aorta de camundongos LDLr^{-/-} com 10 semanas de vida alimentados com dieta padrão não há alteração significativa da resposta de relaxamento dependente do endotélio induzida por acetilcolina ou pelo doador de NO nitroprussiato de sódio (Langbein et al. 2015a). Porém, a resposta relaxante da acetilcolina encontra-se prejudicada após a 12^a (Rabelo et al. 2003) e na 24^a semana de vida (Langbein et al. 2015b). O mesmo padrão de resposta foi observado na aorta dos camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta tipo *Western* por 4 (Hort et al. 2011; 2012; Minatti et al. 2012), 10 (Steioff et al. 2005), ou 20 semanas (Langbein et al. 2015b), a despeito do desenvolvimento do ateroma. Entretanto, um aspecto importante a ser levado em consideração é que a administração de dietas tipo *Western*, além de agravarem a dislipidemia nos modelos genéticos de aterosclerose, podem induzir obesidade, hiperglicemia, resistência à insulina, hipertensão arterial e aterosclerose (Meilhac et al. 2001; Napoli et al. 2004; Pellegrin et al. 2007; de Oliveira et al. 2014). Estes fatores influenciam a função endotelial por diferentes mecanismos e assim dificultam o entendimento da patogênese da doença aterosclerótica na HF.

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Apesar de bem esclarecidos os efeitos benéficos do exercício físico aeróbio na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, muitos dos mecanismos de ação ainda permanecem desconhecidos. Mais especificamente relacionado à aterosclerose, vários trabalhos mostraram a eficiência de diferentes modalidades (esteira ou natação) de treinamento físico na redução ou prevenção do desenvolvimento da placa aterosclerótica. Este efeito é associado à redução de marcadores inflamatórios ou EROs, ou ainda ao aumento na produção e biodisponibilidade de NO e de enzimas antioxidantes, benefícios também observados para outras doenças cardio-metabólicas associadas com diferentes fatores de risco. Porém, pouco se sabe sobre o possível papel do exercício físico aeróbio na prevenção da doença aterosclerótica associada à hipercolesterolemia causada pela disfunção do LDLr, de fundamental importância para pacientes com HF.

A disfunção endotelial que começa a aparecer por volta do estágio II do desenvolvimento da aterosclerose, ou seja, antes do desenvolvimento do ateroma, é caracterizada por redução do relaxamento dependente do endotélio à acetilcolina. Sendo assim, uma das propostas do presente trabalho foi avaliar o efeito do treinamento físico aeróbio realizado em esteira rolante na prevenção da disfunção endotelial em camundongos LDLr^{-/-} modelo experimental de HF, alimentados com dieta padrão. Para tal, o protocolo de treinamento foi iniciado nos animais com 12 semanas de vida, que representa um período no qual a placa aterosclerótica é mínima ao longo da aorta neste modelo experimental (Lichtman et al. 1999; Ma et al. 2012; Wrobel et al. 2013).

De forma inovadora avaliamos também o efeito da interferência do exercício físico aeróbio na expressão proteica da nNOS e na produção de H₂O₂ em aorta de camundongos hipercolesterolêmicos. Esse mecanismo destaca-se devido a propriedade antiaterogênica recém-demonstrada para o H₂O₂ (Langbein et al. 2015a; Gray et al. 2016), assim como a nNOS como fonte de produção endotelial deste fator (Capettini et al. 2011). Embora tenha sido sugerida a participação da nNOS e do H₂O₂ na disfunção endotelial associada à aterosclerose em modelos

experimentais, não existem trabalhos na literatura que mostrem os possíveis efeitos benéficos do treinamento físico nesta via.

Em suma, no presente trabalho levantamos a hipótese de que o exercício físico aeróbio poderia ser preventivo na disfunção endotelial que precede o desenvolvimento da doença aterosclerótica, por aumentar a produção de NO e H_2O_2 concomitante com redução dos níveis de ânion superóxido, que em conjunto caracterizariam uma melhora do equilíbrio redox em aorta de camundongos $LDLr^{-/-}$ hipercolesterolêmicos.

3. OBJETIVO

Investigar os efeitos vasculares de um programa de treinamento físico aeróbio em camundongos $LDLr^{-/-}$, modelo de hipercolesterolemia genética, com ênfase nos mecanismos associados à produção de NO, H_2O_2 e ânion superóxido.

4. ARTIGO

“Aerobic exercise training protects against endothelial dysfunction by increasing nitric oxide and hydrogen peroxide production in LDL receptor-deficient mice”

Daniele M Guizoni, Gabriel G Dorighello, Helena C F Oliveira, Maria A Delbin, Marta H Krieger, Ana P Davel

Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, University of Campinas - UNICAMP, Campinas, Sao Paulo, Brazil

***Running title:* Running training improves endothelial function in LDLr^{-/-} mice**

Corresponding author:

Ana P. Davel, PhD

Department of Structural and Functional Biology

Institute of Biology

P.O. Box 6109

University of Campinas -UNICAMP

Campinas, SP, Brazil

Telephone: +55 19 35216189

Fax: +55 19 35216185

E-mail: anadavel@unicamp.br

Abstract

Background: Endothelial dysfunction associated with hypercholesterolemia is an early event in atherosclerosis characterized by redox imbalance associated with high superoxide production and reduced nitric oxide (NO) and hydrogen peroxide (H₂O₂) production. Aerobic exercise training (Ex) has been demonstrated to ameliorate atherosclerotic lesions and oxidative stress in advanced atherosclerosis. However, whether Ex protects against the early mechanisms of endothelial dysfunction in familial hypercholesterolemia remains unclear. This study investigated the effects of Ex on endothelial dysfunction and vascular redox status in the aortas of LDL receptor knockout mice (LDLr^{-/-}), a genetic model of familial hypercholesterolemia.

Methods: Twelve-week-old C57BL/6J (WT) and LDLr^{-/-} mice were divided into sedentary and exercised (Ex on a treadmill 1 h/5× per week) groups for 4 weeks. Changes in lipid profiles, endothelial function, and aortic NO, H₂O₂ and superoxide production were examined.

Results: Total cholesterol and triglycerides were increased in sedentary and exercised LDLr^{-/-} mice. Endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine was impaired in aortas of sedentary LDLr^{-/-} mice but not in the exercised group. Inhibition of NO synthase (NOS) activity or H₂O₂ decomposition by catalase abolished the differences in the acetylcholine response between the animals. No changes were noted in the relaxation response induced by NO donor sodium nitroprusside or H₂O₂. Neuronal NOS expression and endothelial NOS phosphorylation (Ser1177), as well as NO and H₂O₂ production, were reduced in aortas of sedentary LDLr^{-/-} mice and restored by Ex. Incubation with apocynin increased acetylcholine-induced relaxation in sedentary, but not exercised LDLr^{-/-} mice, suggesting a minor participation of NADPH oxidase in the endothelium-dependent relaxation after Ex. Consistent with these findings, Nox2 expression and superoxide production were reduced in the aortas of exercised compared to sedentary LDLr^{-/-} mice. Furthermore, the aortas of sedentary LDLr^{-/-} mice showed reduced expression of superoxide dismutase (SOD) isoforms and minor participation of Cu/Zn-dependent SODs in acetylcholine-induced, endothelium-dependent relaxation, abnormalities that were partially attenuated in exercised LDLr^{-/-} mice.

Conclusion: The data gathered by this study suggest aerobic physical training as a potential non-pharmacological therapy in the prevention of very early endothelial dysfunction and redox imbalance in familial hypercholesterolemia via increases in NO bioavailability and H₂O₂ production.

Keywords: Aerobic exercise training; LDL receptor-deficient mice; familial hypercholesterolemia; endothelial dysfunction; nitric oxide synthase; hydrogen peroxide; superoxide dismutase.

Introduction

Familial hypercholesterolemia (FH) is a genetic disorder characterized by high concentrations of low-density lipoprotein (LDL), resulting in premature development of atherosclerosis and its vascular complications [1]. Endothelial dysfunction has been described as an important early marker of atherosclerosis preceding atheroma formation and is characterized by impaired vasodilatation [2]. Therefore, non-pharmacological strategies preventing the onset of endothelial dysfunction may protect against the acceleration of atherosclerosis in FH.

LDL receptor knockout (LDLr^{-/-}) mice are a genetic model of hypercholesterolemia that mimics human FH [3]. It is accepted that LDLr^{-/-} mice fed a chow diet develop small lesions in the aortic root and impaired endothelium-dependent relaxation in the thoracic aorta [4,5], despite lacking atherosclerotic plaques throughout the descending aorta [6-8]. In this model of genetic hypercholesterolemia, endothelial dysfunction is associated with impaired hydrogen peroxide (H₂O₂) production [4]. Similar to the effects of endothelial NOS (eNOS)-derived nitric oxide (NO), H₂O₂ production by neuronal nitric oxide synthase (nNOS) contributes to endothelium-dependent relaxation in the mouse aorta [9]. Furthermore, increased NADPH oxidase Nox2-derived superoxide anion production, together with a reduction in NO bioavailability, is often found to contribute to the development of atherosclerosis in humans and experimental models [10-12]. Thus, reactive oxygen species (ROS) participate in the pathogenesis of atherosclerotic disease via multiple pathways.

It is well established that aerobic exercise training promotes vascular beneficial effects, mitigating the risk of cardiovascular disease [2]. Aerobic exercise training has been demonstrated to improve oxidative stress and endothelium-dependent relaxation, delaying the progression of vascular injury in atherosclerosis-prone model apolipoprotein E knockout mice (ApoE^{-/-}) fed a high-fat and cholesterol diet [11,13]. Atherogenic diets are often associated with metabolic disorders, including obesity and type II diabetes. Previous studies have demonstrated that treadmill training improves endothelial dependent-relaxation [14], oxidative stress [15], NO release and nNOS expression [16] in obese non-atherosclerosis-prone rats. However, the potential beneficial effects of aerobic exercise training in the early

stages of atherosclerosis, independent of atherogenic diet-induced confounding factors, are unclear. Recently, Langbein et al. (2015) [5] demonstrated that voluntary physical activity was not able to improve endothelial dysfunction in aortas from LDLr^{-/-} mice fed a standard or high-fat diet. However, it is still unknown whether or not an aerobic exercise training program can modulate endothelial function and vascular redox status in aortas from LDLr^{-/-} mice.

Therefore, in the present study, we investigated the effect of treadmill training on impaired endothelium-induced relaxation in LDLr^{-/-} mice, focusing on the effects of vascular production of the superoxide anion, NO, and H₂O₂.

Materials and methods

Animals

All experimental protocols were approved (protocol number: 3631-1) by the Ethics Committee on Animal Use of the University of Campinas (CEUA-UNICAMP, Campinas-SP, Brazil) and conformed to the ethical principles for animal experimentation adopted by the Brazilian Society of Laboratory Animal Science (SBCAL/COBEA). LDL receptor knockout (LDLr^{-/-}) mice and wild-type (WT) mice (C57BL6/J) were purchased from the Jackson Laboratory; the strains are now maintained by breeding in the Multidisciplinary Center for Biological Research (CEMIB) of UNICAMP with genotypic control. The mice were housed at a constant room temperature (22 - 24°C) and light cycle (12:12 h light:dark). All mice were fed a chow diet. Food and water were provided *ad libitum* to all animals.

WT and LDLr^{-/-} mice (12-week-old) were divided into four experimental groups: sedentary and exercised WT (WT S and WT Ex, respectively) and sedentary and exercised LDLr^{-/-} (LDLr^{-/-} S and LDLr^{-/-} Ex, respectively).

Aerobic exercise protocol

Animals were trained on a treadmill with individual lanes designed for small animals, without electrical stimulation (Gesan, Sao Paulo-SP, Brazil). One week before starting the exercise program, the mice were subjected to a treadmill adaptation protocol in an attempt to minimize potential stress; this consisted of daily runs beginning at 10 meters/minute (m/min) for 10 min on the first day and was progressively increased to 10 m/min for 30 min. Only the animals that adapted to the treadmill were used in the present study. After four days of adaptation, the intensity of the exercise training was determined according to an acute incremental exercise test on the treadmill [17], where the intensity of exercise was increased by 3.3 m/min (5 - 38.3 m/min) every 3 min at a 0% gradient until the point of exhaustion (defined as an inability to maintain running speed). The maximal speed was used to calculate the percentage corresponding to moderate intensity (60-70% of maximal speed). At the beginning of the training program, the duration and speed started at 10 m/min for 30

min and were progressively increased to 60 min at a speed of 15.0 - 16.6 m/min, 5 days/week for 4 weeks, at a 0% gradient. All animals were trained between 7:00 a.m. and 10:00 a.m.

To evaluate the effectiveness of the training program, sedentary and exercised mice were subjected to an acute incremental exercise test on the treadmill during the last week of the study. This test provided the total distance, total time, and maximal speed run for each animal.

Serum biochemical analysis

At the end of the training protocol, 48 h after the last exercise session and after 12 h of fasting, blood samples were collected from the tail vein, and blood glucose was measured using a hand-held glucometer (Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostics, Sao Paulo, Brazil). Immediately thereafter, the mice were anesthetized (5 g/kg urethane, i.p.), and blood samples were obtained by cardiac puncture and centrifuged (8000 *g*, for 15 min); serum supernatants were subsequently collected for biochemical analysis. Total cholesterol (CHOL) and triglyceride (TG) levels were measured using standard commercial kits (Chod-Pap, Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany); the absorbance for CHOL and TG was measured at 492 nm.

Vascular reactivity study

Thoracic aortas were cut into segments (2 mm in length), free of adipose and connective tissue, and then mounted in an isolated tissue chamber containing Krebs-Henseleit solution (in mM: 118 NaCl, 4.7 KCl, 25 NaHCO₃, 2.5 CaCl₂·2H₂O, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄·7H₂O, 11 glucose, and 0.01 EDTA) and gassed with 95% O₂ and 5% CO₂. The rings were maintained at a resting tension of 0.5 g at 37°C, pH = 7.4, as previously described [18]. Isometric tension was recorded using an isometric force transducer (MLT0420, ADInstruments, Sydney, Australia) connected to an acquisition PowerLab 8/30 system for tension recordings (LabChart 7, ADInstruments). After a 60 min equilibration period, the aortic rings were exposed to 125 mM KCl to determine the maximal tension. After washout, relaxation concentration-response curves to acetylcholine (ACh, 1 nM - 30 µM, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), NO-donor sodium nitroprusside (10 pM - 3 µM, Sigma-

Aldrich, Saint Louis, MO, USA), or exogenous H_2O_2 (1 μM – 3 mM, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) were generated for the aortic rings contracted with U46619 (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) until 50 - 70% of maximum contraction with 125 mM KCl was reached. Some aortic rings were incubated for 30 min with the nonselective NOS inhibitor N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 100 μM , Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), the NADPH oxidase inhibitor apocynin (30 μM , Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), the SOD inhibitor diethyldithiocarbamate (DETCA, 1 mM, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), the nNOS inhibitor 7-nitroindazole (7-NI, 100 μM , Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), or catalase (800 U/ml, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) before the relaxation response curves to ACh were generated.

Western blotting analyses

Protein extracts were obtained from isolated thoracic aortas homogenized in RIPA lysis buffer (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) containing phenylmethylsulfonyl fluoride (1 mM PMSF), Na_3VO_4 (1 mM) and a protease inhibitor cocktail (2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ PIC). To investigate the eNOS dimer:monomer ratio, aortas were lysed in buffer (50 mmol/L Tris-HCl pH = 8.0; 0.2% Nonidet P-40; 180 mmol/L NaCl; 0.5 mmol/L EDTA; 25 mmol/L phenylmethylsulphonyl fluoride; 0.1 mmol/L dithiothreitol; and protease inhibitors). Protein samples (40 μg) were electrophoretically separated by SDS-PAGE (4 - 15% Mini-Protean TGX, BioRad, CA, USA) at room temperature. To analyze eNOS dimerization, non-boiled samples (50 μg) were resolved by 6% SDS-PAGE at 4°C. Next, the proteins were transferred onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) overnight at 4°C using a Mini Trans-Blot Cell System (BioRad, Hercules, CA, USA), as previously described [18]. The membranes were subsequently blocked for 90 minutes at room temperature with 5% albumin in Tris-buffer (10 mM Tris, 100 mM NaCl and 0.1% Tween 20) and then incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: anti-eNOS (1:1000; BD Transduction, Franklin Lakes, NJ, USA), anti-p-eNOS Ser1177 (1:500; Cell Signaling), anti-nNOS (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-CuZn-SOD (1:1000, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), anti-Mn-SOD (1:1000, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA), anti-EC-SOD (1:500, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY,

USA), anti-Nox2 (1:1000 Millipore, Billerica, MA, USA) and anti-catalase (1:1000, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Membranes containing non-boiled samples were incubated with anti-eNOS (1:750, BD Transduction, Franklin Lakes, NJ, USA). α -actin (primary antibody 1:5000, Abcam, Cambridge, UK) was used to normalize the expression of the evaluated proteins in each sample. After washing with Tris-buffer, the membranes were incubated for 90 min with a peroxidase-conjugated IgG antibody, according to each primary antibody used. Protein expression was detected using the Pierce ECL (Electrochemiluminescence) kit. Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) was used for chemiluminescent detection using Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare, NY, USA) hardware and software, according to the manufacturer's instructions. The intensity of the blots was quantified using ImageJ 1.46p software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Next, eNOS dimerization of the dimer (260 kDa) to monomer (130 kDa) ratio was calculated.

NO production

NO production was evaluated using the NO-sensitive fluorescent dye 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2A), as previously described [19]. Thoracic aortic rings (approximately 3 mm in length) were embedded in a cryoprotectant freezing medium (Tissue-Tek[®] O.C.T compound 4583, Torrance, CA, USA) to obtain transverse sections (10 μ m) using a cryostat. The slices were equilibrated for 10 min in a phosphate buffer (PB 0.1 mM, pH = 7.4) containing CaCl_2 (0.45 mM) at 37°C. Next, DAF-2A (8 μ M) was topically applied to the slices, and they were maintained for 30 min in a light-protected humidified chamber. Digital images were obtained using a microscope (Eclipse Ti-S, Nikon, Tokyo, Japan) equipped for epifluorescence with a standard fluorescein filter with a 20 $\times$ objective. The images were analyzed using ImageJ 1.46p software by measuring the mean optical density of the fluorescence.

H₂O₂ production

Extracellular H₂O₂ was detected using Amplex Red [20]. To achieve this, four aortic rings (1.5 mm) were placed in a well of a 96-well dark plate and incubated

with Amplex Red (10 $\mu\text{mol/L}$) and horseradish peroxidase (0.2 U/mL) for 60 minutes at 37°C in Krebs Ringer's phosphate glucose buffer (in mmol/L: 145 NaCl, 5.7 sodium phosphate, 4.86 KCl, 0.54 CaCl_2 , 1.22 MgSO_4 , and 5.5 glucose) protected from light. Fluorescence was detected at 590 nm using an excitation of 530 nm every 5 minutes for 60 minutes. H_2O_2 was expressed as fluorescence per minute. In some experiments, catalase (200 U/mL) was added to the tissue samples.

Superoxide anion detection

Hydroethidine was used as an oxidative fluorescent dye [18]. Transverse aortic sections (10 μm) obtained in a cryostat were incubated at 37°C for 10 min with phosphate buffer. Hydroethidine (5 μM) was topically applied to each tissue section, and the slides were incubated in a light-protected, humidified chamber at 37°C for 30 min. Some aortic slices were incubated with phosphate buffer containing the membrane-permeable superoxide dismutase (SOD) mimetic Mn (III) tetrakis (1-methyl-4-pyridyl) porphyrin pentachloride (MnTMPyP, 25 μM , Calbiochem, San Diego, CA, USA), apocynin (30 μM , 30 min), or vehicle (deionized water; time controls). Images were obtained using an optical microscope (Eclipse Ti-S, Nikon, Tokyo Japan) equipped with a rhodamine filter and camera (DS-U3, Nikon, Tokyo, Japan), using a 40 $\times$ objective. The images were analyzed using ImageJ 1.46p software by measuring the mean optical density of the fluorescence.

Statistical analysis

The results are expressed as the mean $\pm$ SEM. Data were analyzed using two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test using GraphPad Prism 5.0 software. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Physical performance, body weight and serum biochemical parameters in sedentary and trained mice

All groups presented similar responses to the acute incremental exercise test before the start of exercise training (Table 1). Exercised mice exhibited increased total time (minutes, approximately 50%), total distance (meters, approximately 100%) and maximal speed (meters/minutes, approximately 35%) values in the final incremental exercise test compared with the respective sedentary groups (Table 1). These results confirmed the effectiveness of the exercise training protocol in improving physical performance in both the WT Ex and the LDLr^{-/-} Ex groups. No differences were observed between the WT and LDLr^{-/-} groups after training (Table 1).

Body weights were similar in all groups at the initial time of the study. After the protocol, exercise training decreased body weight in both the WT Ex (8%) and the LDLr^{-/-} Ex (12%) groups compared with the WT S and the LDLr^{-/-} S groups (Table 2). The LDLr^{-/-} S mice exhibited approximately 3-fold higher CHOL and TG levels than the WT S mice. Exercise training did not modify CHOL or TG levels in either the WT Ex or the LDLr^{-/-} Ex groups (Table 2). Fasting glucose levels were not different among the groups (Table 2).

Aerobic exercise training prevented endothelial dysfunction in the thoracic aorta of LDLr^{-/-} mice

The aorta of LDLr^{-/-} S mice showed reduced endothelium-dependent relaxation in response to ACh compared with that of WT S mice, which was fully prevented by exercise training (Fig. 1A). No significant differences in sodium nitroprusside-induced relaxation or H₂O₂-induced relaxation were observed between the experimental groups, suggesting that neither LDLr deficiency or 4 weeks of physical exercise interferes with aortic smooth muscle sensitivity to NO and H₂O₂ (Fig. 1B-C). Endothelial dysfunction was observed in LDLr^{-/-} S mice despite the lack of evidence of fat deposition in the descending thoracic aorta (data not shown).

Aerobic exercise improves affected NO and H₂O₂ production in LDLr^{-/-} mice

As ACh stimulates endothelial eNOS-derived NO and nNOS-derived H₂O₂ production in the mouse aorta [9], we incubated aortic rings with the non-selective NOS inhibitor L-NAME or with the nNOS inhibitor 7-nitroindazole (7-NI). L-NAME reduced ACh-induced relaxation in all groups (Fig. 2A-B), abolishing the differences between WT S and LDLr^{-/-} S mice (Fig. 2A). The effect of L-NAME in reducing the maximum vasodilator effect (E_{max}) of ACh was less significant in LDLr^{-/-} S than in WT S mice; aerobic training reversed this effect (Fig. 2A-C). 7-NI significantly reduced ACh-induced relaxation, but to a lesser extent than L-NAME, demonstrating the specific role of nNOS in this process (Fig. 2D-E). In contrast to the other groups, the E_{max} of ACh in the aortas of LDLr^{-/-} S mice was not modified by the nNOS inhibitor (Fig. 2F). Together, these data suggest impairment of the NOS component of ACh-induced relaxation in the aortas from LDLr^{-/-} S, which is prevented by aerobic training. No differences were observed regarding the effects of L-NAME and 7-NI between the WT Ex and LDLr^{-/-} Ex mice (Fig. 2B and 2E).

To evaluate the participation of H₂O₂ in endothelium-dependent relaxation, some aortic rings were incubated with catalase, which decomposes H₂O₂. Catalase reduced the vasodilatory effect of ACh in all groups, abolishing the differences among them (Fig. 2G-H). The E_{max} graph in Fig. 2I shows that the inhibitory effect of catalase was less prominent in LDLr^{-/-} S than in WT S mice, while no difference was found for LDLr^{-/-} Ex compared with WT Ex mice (Fig. 2I). These data suggest that exercise training attenuates the effect of H₂O₂ on vasodilation in LDLr-deficient mice.

Regarding the bioavailability of NO, DAF-2A fluorescence analysis revealed a significant reduction in NO levels in the aortas of LDLr^{-/-} S mice compared with the aortas of WT S mice (Fig. 3A). In addition, H₂O₂ production evaluated by Amplex Red fluorescence was also significantly reduced in the aortas of LDLr^{-/-} S mice (Fig. 3B). Exercise training prevented the reductions in both NO and H₂O₂ in LDLr^{-/-} Ex mice but exerted no significant effects in WT Ex mice (Fig. 3A-B). The presence of catalase significantly reduced Amplex Red fluorescence, confirming H₂O₂ as the main factor evaluated using this technique (data not shown).

The protein expression of total eNOS, Ser1177-phosphorylated eNOS, eNOS dimer, and total nNOS was significantly reduced in the aortas of the LDLr^{-/-} S

group, compared with those of WT S group (Fig. A-C). Exercise training restored the expression of Ser1177-phosphorylated eNOS and total nNOS in LDLr^{-/-} Ex mice (Fig. 4A and 4C). The decreased eNOS dimerization in the aortas of LDLr^{-/-} mice was not modified by exercise (Fig. 4B). In addition, the protein expression of catalase did not differ among the groups (Fig. 4D).

Aerobic exercise reduces the synthesis and increases the degradation of the superoxide anion

The participation of superoxide in the endothelial dysfunction of LDLr^{-/-} mice was evaluated in rings incubated with the SOD inhibitor DETCA or the NADPH oxidase inhibitor apocynin. DETCA reduced the ACh-induced relaxation in all groups, indicating the importance of endogenous CuZn-SODs activity to endothelium-dependent vasorelaxation in the mouse aorta (Fig. 5A-B). After SOD inhibition, no differences were found among the groups (Fig. 5A-B). Furthermore, the reduction in E_{max} to ACh induced by DETCA was less significant in LDLr^{-/-} S than in WT S mice; Ex reversed this effect (Fig. 5C). These data revealed that the impaired SOD effect in the endothelium-dependent relaxation of LDLr-deficient mice is prevented by exercise training (Fig. 5A-C). Incubation with apocynin increased ACh-induced relaxation in LDLr^{-/-} S mice, normalizing this response (Fig. 5D). No significant effect for apocynin was observed in the aortic rings of the WT S, WT Ex, and LDLr^{-/-} Ex groups (Fig. 5D-F), indicating that physical training prevents against NADPH oxidase-induced endothelial dysfunction in the aorta of LDL-deficient mice.

Next, we evaluated the expression of proteins related to the synthesis (NADPH oxidase Nox2) and degradation (SOD isoforms) of the superoxide anion. The NADPH oxidase Nox2 was up-regulated, while the protein expression of Cu/Zn-, Mn-, and EC-SOD were reduced in the aorta of the LDLr^{-/-} S group (Fig. 6A-D). Exercise training normalized the alterations of Nox2 (Fig. 6A), Cu/Zn- (Fig. 6B), and EC-SOD (Fig. 6D) with respect to protein expression in LDLr^{-/-} Ex mice.

According to the above results, we evaluated vascular superoxide anion production. Increased fluorescence emitted by hydroethidine-derived oxidation products revealed increased ROS formation in aortic slices from LDLr^{-/-} S compared with those from WT S mice, which was reversed by apocynin or exercise training (Fig. 7A-B). Incubation with the SOD mimetic MnTMPyP dramatically reduced the

fluorescence of hydroethidine in all groups (Fig. 7A), suggesting the superoxide anion as the major vascular ROS up-regulated by LDLr-deficiency and normalized by exercise.

Discussion

This study investigated the protective mechanisms of exercise in preventing endothelial dysfunction during the early phase of atherosclerotic disease in LDLr-deficient mice. We found that 4 weeks of aerobic exercise training fully reversed the endothelial vasodilatory dysfunction observed in the aortas of LDLr^{-/-} mice by improving NO bioavailability and H₂O₂ production. Aerobic exercise training increased the phosphorylation of eNOS and aortic expression of nNOS in LDLr^{-/-} mice, suggesting that an up-regulation of the signaling pathways of constitutive isoforms of NOS should be involved in the vascular effects of physical training. Furthermore, the improvement of the vascular redox state in trained-LDLr^{-/-} mice was associated with the up-regulation of the antioxidant defense exerted by SOD and the down-regulation of NADPH oxidase-derived superoxide production. The vascular benefits conferred by aerobic physical training occurred despite persistent hypercholesterolemia. Therefore, our data revealed that moderate physical exercise may be an effective non-pharmacological therapy for the early prevention of vascular complications of artery disease in FH.

Endothelial dysfunction has been described in the aorta of LDLr-deficient mice fed a standard diet at 12 to 24 weeks of age [4,5]. Consistent with the findings of these previous studies, we observed impaired ACh-induced relaxation in the aortas of 16-week-old LDLr^{-/-} mice. Previous studies have demonstrated that long periods of training (12 weeks) reduced preexisting atherosclerotic lesion area in arteries from LDLr^{-/-} mice [21] and ApoE^{-/-} mice [22] fed atherogenic diets. Because endothelial dysfunction is an important predictor of atherosclerosis development and future cardiovascular events, we evaluated the effect of aerobic exercise training in controlling this risk factor in a genetic background of hypercholesterolemia.

Here, we report for the first time that 4 weeks of a treadmill-based physical training program fully prevented the early endothelial dysfunction found in the thoracic aortas of LDLr^{-/-} mice without atherosclerotic plaques. In contrast, Langbein et al. (2015) [5] found that 20 weeks of voluntary running did not ameliorate endothelial dysfunction in LDLr^{-/-} mice fed standard or high-fat diets. Importantly, these authors observed a decrease in mice spontaneous activity over time, which may cause a lack-of-exercise effect on endothelial function. Here, the effectiveness

of the training program was confirmed by the significant increases in total time, total distance, and maximal speed reached during the incremental test performed after the 4-week training protocol in WT Ex mice and LDLr^{-/-} Ex mice.

It has been demonstrated that acute aerobic exercise is sufficient to activate eNOS in healthy endothelial cells of the mouse aorta; this effect occurs via a signaling pathway dependent on AMP-activated protein kinase activation (AMPK), resulting in Ser1177 eNOS phosphorylation, without changes in total eNOS expression or in Ser635 and Thr495 eNOS phosphorylation [23]. In the present study, we demonstrated that 4 weeks of exercise training reversed the reduction in Ser1177 eNOS phosphorylation, normalizing the levels of NO in the aortas of LDLr^{-/-} mice to levels similar to those found in WT animals, without increasing the dimerization of eNOS. A similar mechanism was found in the left internal mammary arteries of 4-week exercise-trained patients with stable coronary artery disease [24]. Reduced eNOS dimerization may not necessarily be associated with eNOS uncoupling as other mechanisms are involved in electron transfer in eNOS domains [25]. Because endothelium-derived NO plays a protective role in the vasculature by inhibiting vascular smooth muscle cell proliferation and by suppressing the adhesion of inflammatory cells and platelets [26], exercise activates an important protective mechanism against the progression of atherosclerosis in genetic hypercholesterolemia.

eNOS-derived NO and nNOS-derived H₂O₂ equally contribute to endothelium-dependent vasodilation of the mouse aorta [9]. In young LDLr^{-/-} mice (10 weeks old), increased H₂O₂ release may compensate for reduced eNOS expression in the aorta [27]. However, nNOS mRNA expression and H₂O₂ levels decreased with age [27] or in accelerated atherosclerosis [28]. H₂O₂ and nNOS are considered antiatherogenic factors [29, 30]. Gene deletion of nNOS in ApoE^{-/-} mice accelerates atherosclerotic plaque formation [29], while overexpression of Nox4 forming H₂O₂ reduces the expression of profibrotic and pro inflammatory markers inhibiting vascular remodeling in mice prone to atherosclerosis [30]. We found that reductions in the nNOS and H₂O₂ components of ACh-induced relaxation of the aorta in 16-week-old LDLr^{-/-} mice were reversed by physical exercise. No changes in relaxation with H₂O₂ or in the expression of vascular catalase were observed among the strains. Furthermore, exercise training prevented reductions in H₂O₂ production and nNOS expression in the aortas of LDLr^{-/-} mice. This finding demonstrates the beneficial

effects of exercise training in the maintenance of endothelial function via the up-regulation of nNOS-derived H_2O_2 in the genetic background of hypercholesterolemia.

Recent studies have indicated the beneficial effects of exercise in increasing nNOS signaling in the cardiovascular system. Four weeks of treadmill exercise increased the expression and activity of eNOS and nNOS in the aorta and left ventricle of chronic heart failure rats, respectively [31]. Furthermore, 8 weeks of aerobic exercise resulted in nNOS overexpression in endothelium-denuded mesenteric arteries, enhancing the participation of nitrergic perivascular innervation in spontaneously hypertensive rats [32] and obese rats [16]. For the first time, we demonstrated that an aerobic exercise training program can up-regulate the antiatherogenic eNOS-NO and nNOS- H_2O_2 pathways, which is associated with amelioration of endothelial function in a genetic model of hypercholesterolemia.

Reduced formation of H_2O_2 was associated with increased Nox2 expression in atherosclerosis, but not with Nox1 expression [30]. Judkins et al. (2010) [12] first demonstrated a role for NADPH oxidase Nox2 in enhancing vascular ROS production, thereby reducing NO bioavailability and increasing lesion development in ApoE^{-/-} mice. In addition, we noted up-regulation of Nox2 in the aortas of LDLr^{-/-} S mice. Similarly, inhibition of NADPH oxidase or superoxide anion scavengers reversed endothelial dysfunction and the oxidative stress detected by hydroethidine product fluorescence in the aorta of LDLr^{-/-} S mice, implicating Nox2-derived superoxide in endothelial dysfunction in this hypercholesterolemic strain. Treadmill training reversed Nox2 up-regulation, as well as enhanced vascular NADPH oxidase-derived superoxide production. Our findings are consistent with the beneficial effects of 10-week exercise training normalizing Nox2 protein expression in the aortas of type 2 diabetic mice [33].

SOD isoforms represent a major defense against the inactivation of NO and peroxynitrite formation [34]. However, findings related to the expression of SODs in vessels of experimental models of atherosclerosis are controversial. EC-SOD activity and protein expression were found to be increased [35] or decreased [36] in ApoE^{-/-} mice, whereas CuZn- and Mn-SOD were not modified [36]. Differences may be due to the type of Western diet and/or the stage of development of the atherosclerotic lesion. In the present study, we noted a reduction in the protein expression of the three isoforms of SOD in the early stages of atherosclerosis in LDLr^{-/-} mice fed a standard diet. Inhibition of Cu-Zn dependent SODs activity

(cytoplasmatic CuZn SOD and EC-SOD) with DETCA, a powerful copper chelating agent, exerted a smaller effect on ACh-induced relaxation in LDLr^{-/-} S mice compared with WT S mice. This finding serves as functional proof that down-regulation of Cu-dependent SOD isoforms is a mechanism involved in endothelial dysfunction in genetic hypercholesterolemia.

We observed that 4 weeks of treadmill exercise training normalized both cytoplasmic and extracellular CuZn-SODs expression, concomitant with normalization of the effects of DETCA on ACh-induced relaxation in the aortas of LDLr-deficient mice. These results demonstrated the up-regulation of CuZn-SODs as a vascular protective mechanism in endothelial dysfunction in hypercholesterolemia. Exercise training has been reported to increase vascular expression of CuZn-SOD in healthy [37] and obese animals [14,33]. However, the mechanism by which exercise enhances SOD expression in cardiovascular diseases is not clear, but Fukai et al. (2000) [38] have suggested that increased eNOS-derived NO is a feed-forward mechanism that up-regulates EC-SOD expression in adjacent vascular cells, which in turn increases NO bioavailability.

Conclusion

Taken together, our results suggest that aerobic exercise training improves endothelial dysfunction in the aortas of LDLr-deficient mice via the up-regulation of NO bioavailability and H₂O₂ production. These effects are associated with the up-regulation of p-eNOS, nNOS, and SOD isoforms and reduced Nox2-derived superoxide anion production. The vasculo-protective effects of 4 weeks of physical training were observed in the early stages of atherosclerosis and were independent of changes in the dyslipidemic profile. Taken together, these data highlight aerobic exercise training as a potential early non-pharmacological therapy for the prevention of endothelial dysfunction and changes in vascular redox status in patients with FH.

Table 1. Incremental exercise test performed before (initial) and after (final) 4-week sedentary (S) or exercise-trained (Ex) wild-type (WT) and LDL receptor knockout mice (LDLr^{-/-}).

	Initial				Final			
	WT S	WT Ex	LDLr ^{-/-} S	LDLr ^{-/-} Ex	WT S	WT Ex	LDLr ^{-/-} S	LDLr ^{-/-} Ex
Time (min)	18 ± 0.5	18 ± 0.9	16 ± 0.6	17 ± 0.7	17 ± 0.6	26 ± 1.2 *	17 ± 0.7	26 ± 1.3 #
Distance (m)	243 ± 10	250 ± 22	208 ± 12	225 ± 15	223 ± 14	459 ± 38 *	220 ± 16	486 ± 42 #
Max speed (m/min)	24 ± 0.5	25 ± 0.8	22 ± 0.6	23 ± 0.8	23 ± 0.7	31 ± 1.5 *	22 ± 0.8	32 ± 1.2 #

Data are mean ± SEM (n=7-20 per group). Two-way ANOVA: * p < 0.05 vs. WT S; # p < 0.05 vs. LDLr^{-/-} S.

Table 2. Body weight and plasma biochemical parameters in sedentary (S) and exercise-trained (Ex) wild-type (WT) and LDLr knockout mice (LDLr^{-/-}).

	WT S	WT Ex	LDLr ^{-/-} S	LDLr ^{-/-} Ex
Initial body weight (g)	25 ± 0.2	25 ± 0.5	24 ± 0.6	24 ± 0.2
Final body weight (g)	26 ± 0.3	24 ± 0.4 *	26 ± 0.8	23 ± 0.5 #
CHOL (mg/dL)	82 ± 4	92 ± 6	262 ± 14 *	279 ± 15 \$
TG (mg/dL)	54 ± 4	49 ± 6	151 ± 11 *	147 ± 9 \$
Glucose (mg/dL)	110 ± 6	90 ± 5	114 ± 11	107 ± 6

CHOL: total cholesterol; TG: triacylglycerol. Data are mean ± SEM (n=7-20 per group). Two-way ANOVA: * p < 0.05 vs. WT S; # p < 0.05 vs. LDLr^{-/-} S; \$ p < 0.05 vs. WT Ex.

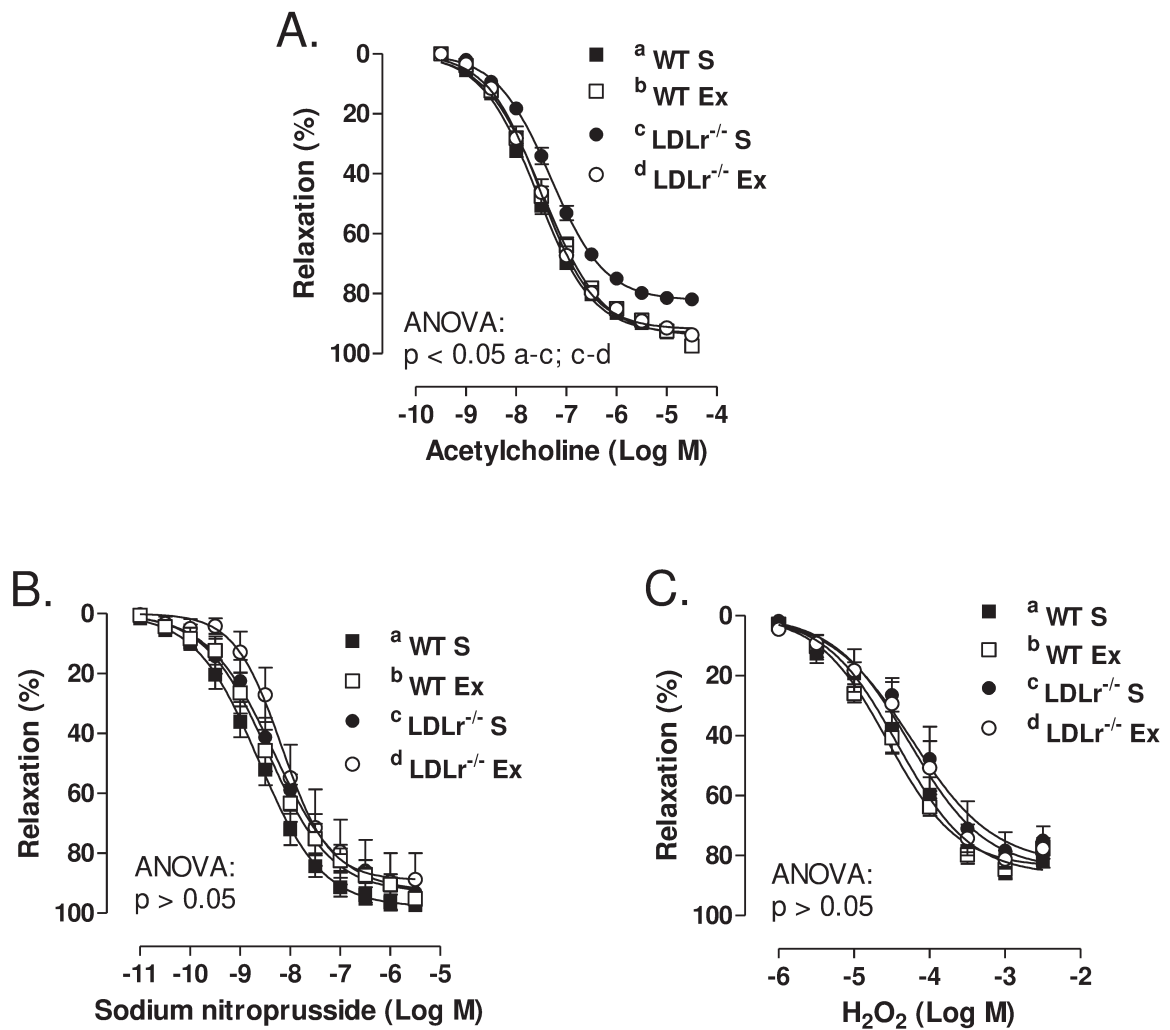


Figure 1. Concentration-response curves to acetylcholine (A), to sodium nitroprusside (B) and to hydrogen peroxide, (H₂O₂, C) in thoracic aortic rings from sedentary (S) and exercise-trained (Ex) wild-type (WT) and LDLr knockout mice (LDLr^{-/-}). Data are mean $\pm$ SEM (n=5-14 per group). 2-way ANOVA.

Sedentary

Exercise-trained

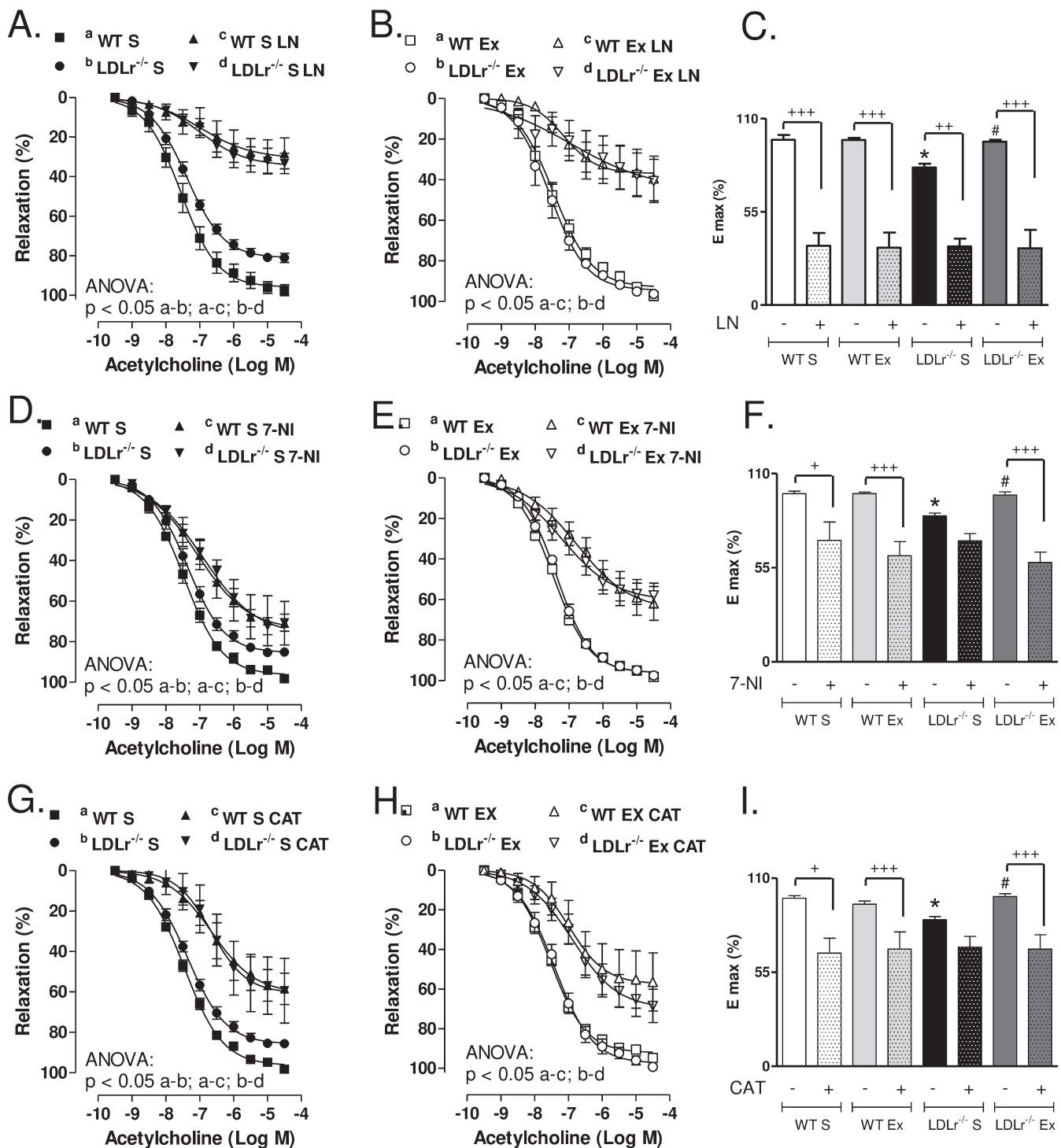


Figure 2. Concentration-response curves to acetylcholine before and after incubation with L-NAME (LN, A and B), 7-Nitroindazole (7-NI, C and D) or catalase (CAT, E and F) in thoracic aortic rings from sedentary (S) and exercise-trained (Ex) wild-type (WT) and LDLr knockout mice (LDLr^{-/-}). Bar graphs show the acetylcholine maximal vasodilator effect (E_{max}) in the presence or absence of L-NAME (C), 7-NI (F) and CAT (I). ANOVA: * $p < 0.05$ vs WT S; # $p < 0.05$ vs LDLr^{-/-} S; + indicates $p < 0.05$, ++ indicates $p < 0.001$, and +++ indicates $p < 0.0001$ vs without incubation ring. Data are mean $\pm$ SEM (n=5-8 per group).

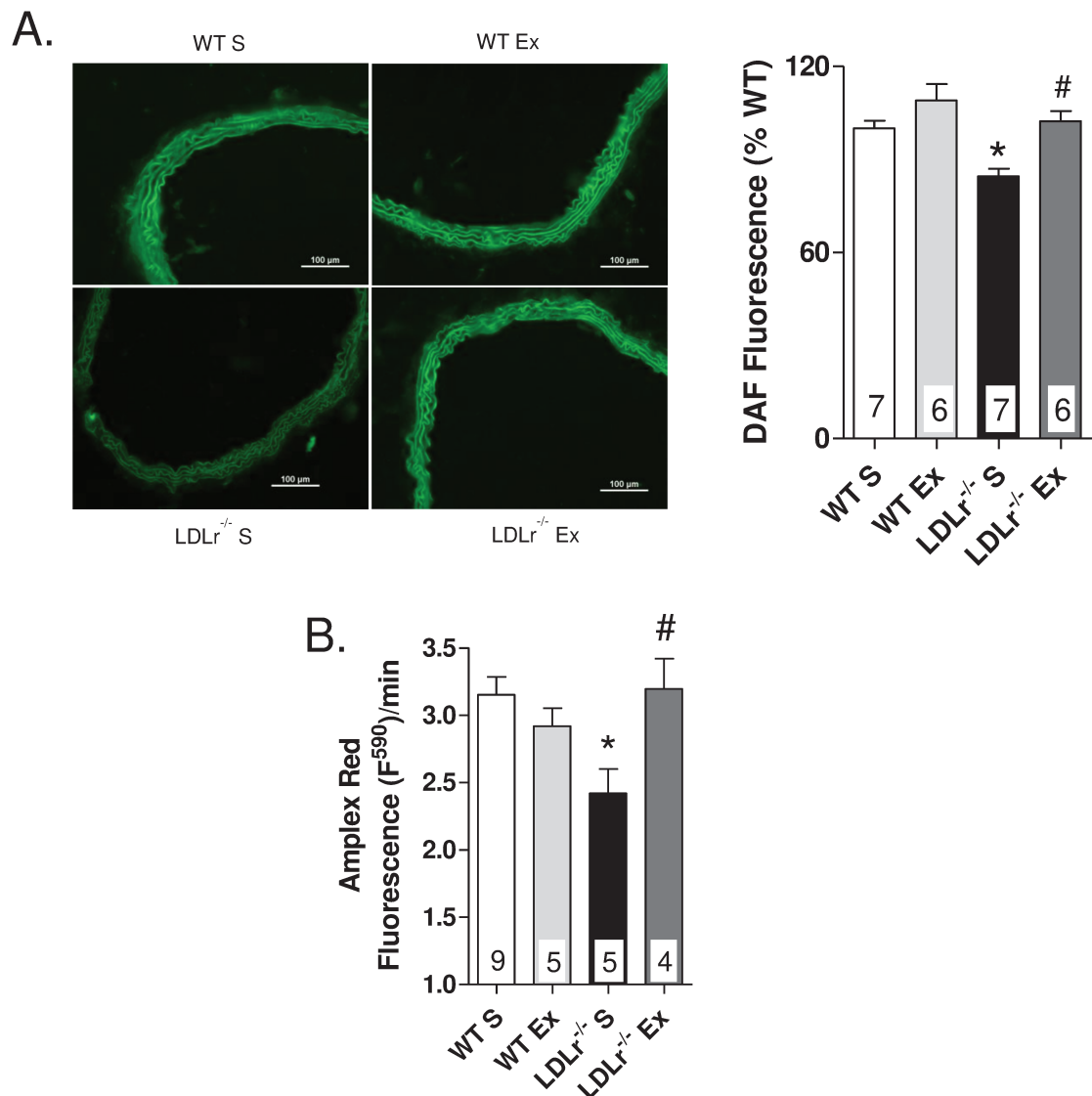


Figure 3. Representative fluorographs (A, left panel) and quantitative analysis (A, bar graphic right) of NO production evaluated by DAF-2A fluorescence in transverse sections of thoracic aorta. DAF-2A fluorescence is expressed as the percentage of intensity per vessel area obtained in WT S group (bar scale= 100 µm). The bar graph (B) represents the fluorescence curve slope to Amplex Red estimating the production of H₂O₂ per minute in aortic rings from sedentary (S) and exercise-trained (Ex) wild-type (WT) and LDLr knockout mice (LDLr^{-/-}). Data are mean ± SEM. Two-way ANOVA: * p < 0.05 vs. WT S; \$ p < 0.05 vs. WT Ex; # p < 0.05 vs. LDLr^{-/-} S. Numbers into the bars represent N of animals used in each group.

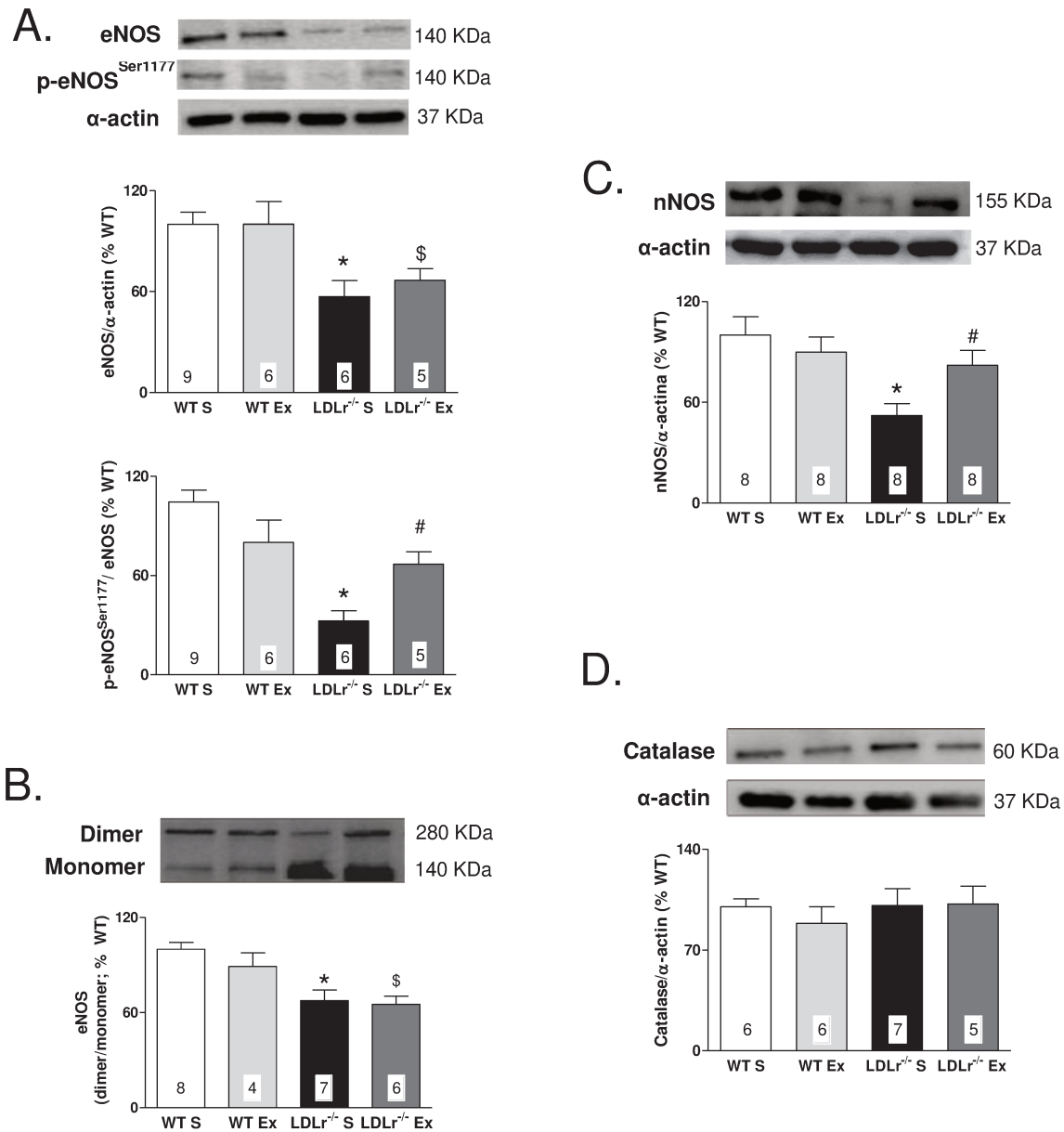


Figure 4. Representative blots (top) and quantitative protein expression (bottom) of total and phosphorylated eNOS (p-eNOS) at Ser1177 (A); dimerized eNOS (B); total nNOS (C) and catalase (D) in aorta from sedentary (S) and exercise-trained (Ex) wild-type (WT) and LDLr knockout mice (LDLr^{-/-}). Proteins expression were normalized to α-actin content in each sample, and protein expression of p-eNOS were normalized to total eNOS expression. eNOS dimerization was expressed as a ratio of dimer:monomer band intensity. The results were expressed as the percentage of the protein expression values obtained in WT S group. Data are mean ± SEM. Two-way ANOVA: * $p < 0.05$ vs. WT S; \$ $p < 0.05$ vs. WT Ex; # $p < 0.05$ vs. LDLr^{-/-} S. Numbers into the bars represent N of animals used in each group.

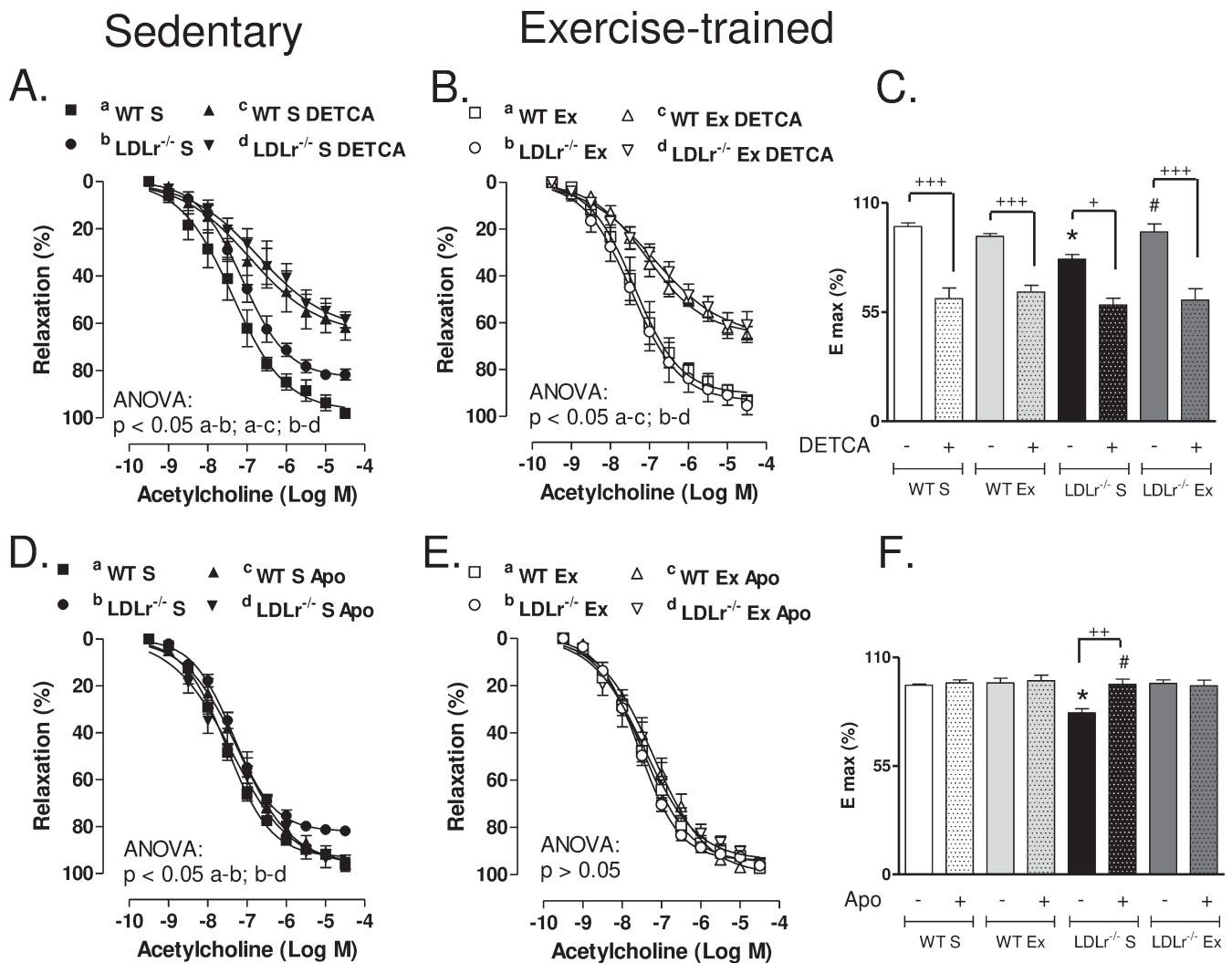


Figure 5. Concentration-response curves to acetylcholine before and after incubation with diethyldithiocarbamate (DETCA, A and B), or apocynin (Apo, D and E) in thoracic aortic rings from sedentary (S) and exercise-trained (Ex) wild-type (WT) and LDLr knockout mice (LDLr^{-/-}). Bar graphs show the acetylcholine maximal vasodilator effect (E_{max}) in the presence or absence of DETCA (C) and Apo (F). ANOVA: * $p < 0.05$ vs WT S; # $p < 0.05$ vs LDLr^{-/-} S; + indicates $p < 0.05$, ++ indicates $p < 0.001$, and +++ indicates $p < 0.0001$ vs without incubation rings. Data are mean $\pm$ SEM ($n=5-8$ per group).

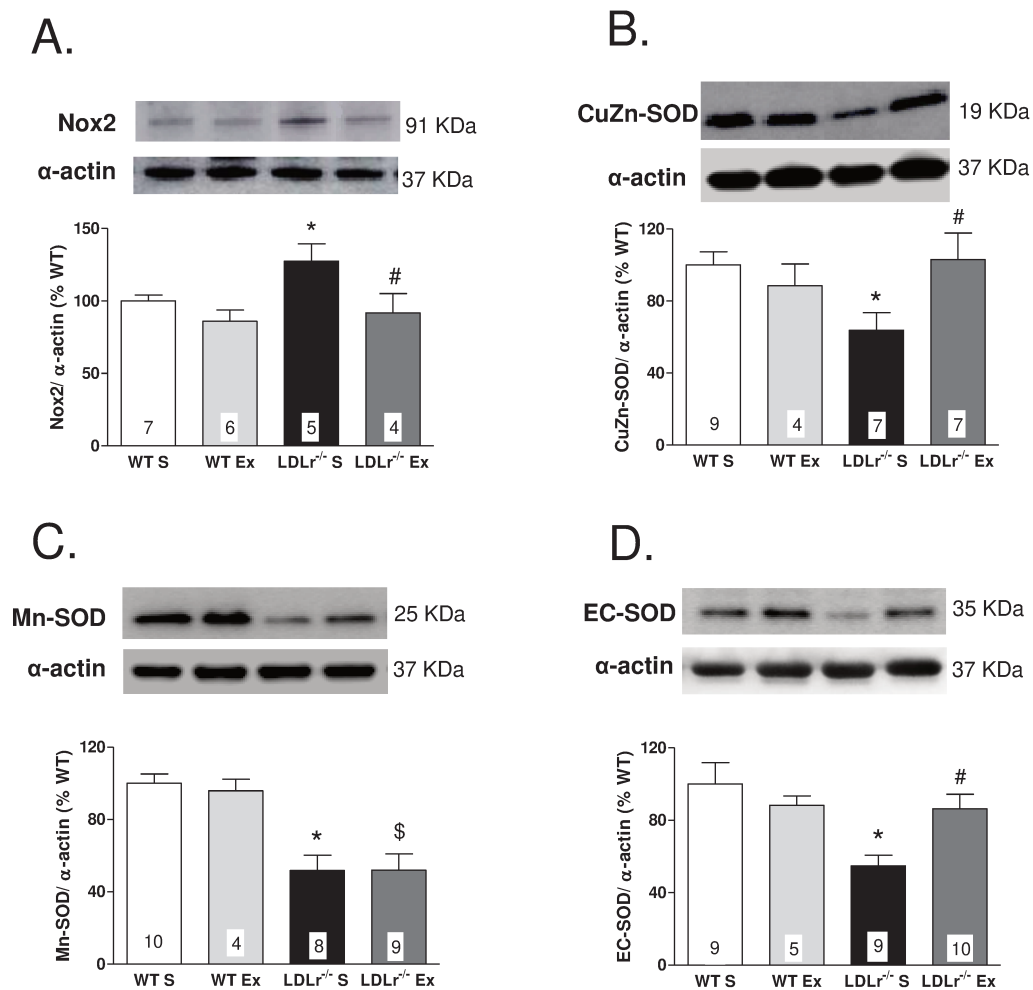


Figure 6. Representative blots (top) and quantitative protein expression (bottom) of Nox2 subunit of NADPH oxidase (A); CuZn-SOD (B); Mn-SOD (C) and EC-SOD (D) in aorta from sedentary (S) and exercise-trained (Ex) wild-type (WT) and LDLr knockout mice (LDLr^{-/-}). Proteins expression were normalized to α -actin content in each sample. The results were expressed as the percentage of the protein expression values obtained in WT S group. Data are mean $\pm$ SEM. Two-way ANOVA: * $p < 0.05$ vs. WT S; \$ $p < 0.05$ vs. WT Ex; # $p < 0.05$ vs. LDLr^{-/-} S. Numbers into the bars represent N of animals used in each group.

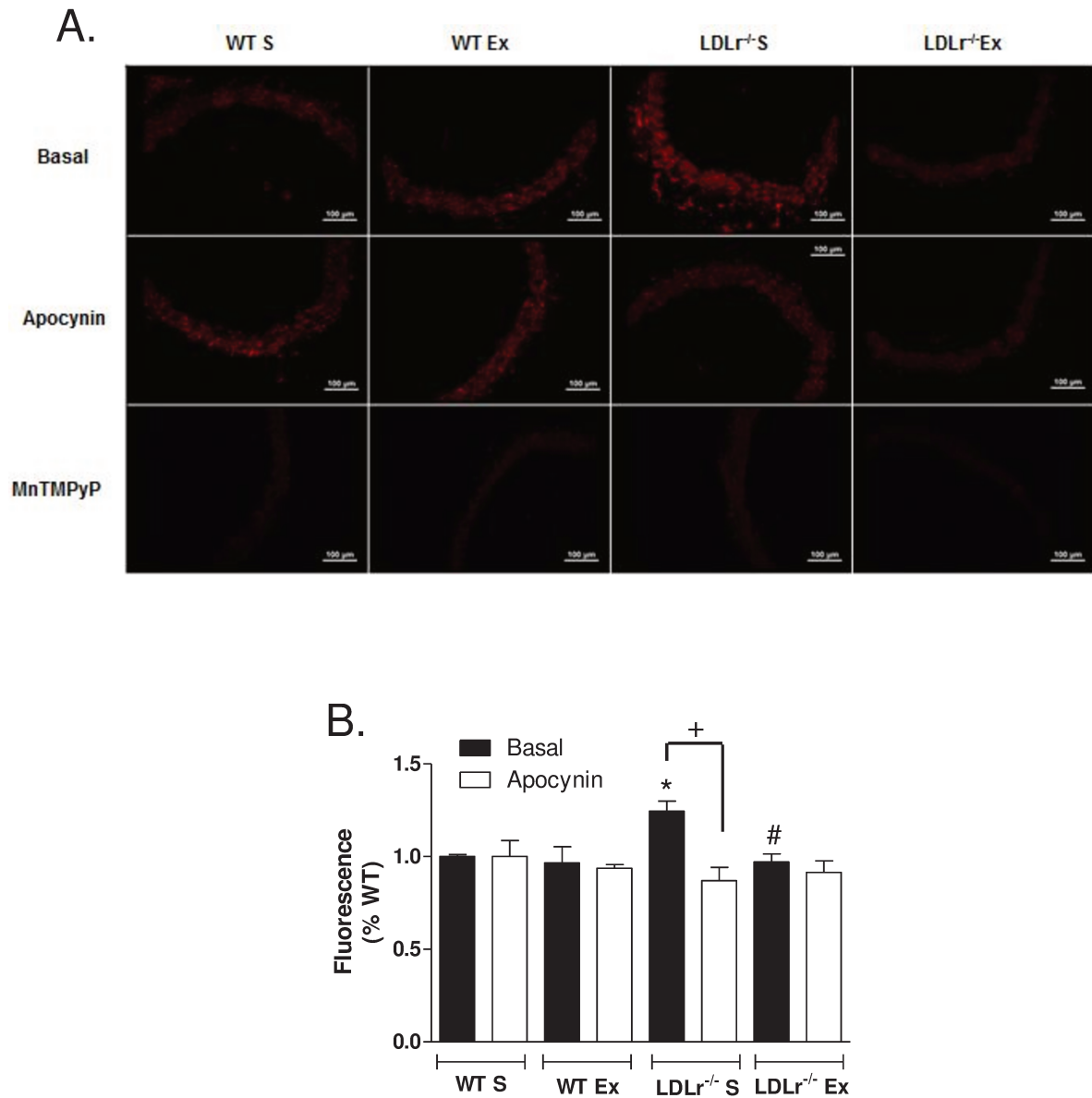


Figure 7. Representative fluorographs (A) and quantitative analysis of reactive oxygen species production in transverse sections of aorta (B) evaluated by the ethidium-bromide-positive nuclei under basal conditions and after incubation with apocynin (30 mM), or with Mn(III) tetrakis(1-methyl-4-pyridyl) porphyrin pentachloride (MnTMPyP, 25μM). Bar scale= 100 μm. Sedentary and exercised (Ex) wild-type (WT) and LDLr knockout mice (LDLr^{-/-}). Data are mean ± SEM (n=4-15 per group). 2-way ANOVA: * p < 0.05 vs. WT S; # p < 0.05 vs. LDLr^{-/-} S; + p < 0.05 apocynin vs. basal.

Grants

This work was supported by grants from FAPESP and CNPq. D. M. Guizoni received a Ph.D. fellowship from CAPES. H. C. F. Oliveira and A. P. Davel are CNPq research fellows.

Disclosures

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

Author contribution

D.M.G. and G.G.D. performed experiments; D.M.G., G.G.D., M.H.K., and A.P.D. analyzed data; D.M.G., H.C.F.O., M.A.D., M.H.K., and A.P.D. interpreted results of experiments; D.M.G. and A.P.D. prepared figures; D.M.G. and A.P.D. drafted manuscript; D.M.G., H.C.F.O., M.A.D., and A.P.D. edited and revised manuscript; D.M.G., M.H.K., M.A.D., and A.P.D. conceived and designed the studies; A.P.D. approved final version of manuscript.

References

1. Vlahos AP, Naka KK, Bechlioulis A, Theoharis P, Vakalis K, Moutzouri E, et al. Endothelial dysfunction, but not structural atherosclerosis, is evident early in children with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Pediatr Cardiol.* 2014;35:63-70.
2. Vita JA, Keaney JF Jr. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? *Circulation.* 2002;106:640-2.
3. Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest.* 1993;92:883-93.
4. Rabelo LA, Cortes SF, Alvarez-Leite JI, Lemos VS. Endothelium dysfunction in LDL receptor knockout mice: a role for H₂O₂. *Br J Pharmacol.* 2003;138:1215-20.
5. Langbein H, Hofmann A, Brunssen C, Goettsch W, Morawietz H. Impact of high-fat diet and voluntary running on body weight and endothelial function in LDL receptor knockout mice. *Atheroscler Suppl.* 2015;18:59-66.
6. Ishibashi S, Goldstein JL, Brown MS, Herz J, Burns DK. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J Clin Invest.* 1994;93:1885-93.
7. Moore RE, Kawashiri MA, Kitajima K, Secreto A, Millar JS, Pratico D, et al. Lipoprotein A-I deficiency results in markedly increased atherosclerosis in mice lacking the LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1914-20.
8. Dorighello GG, Rovani JC, Luhman CJ, Paim BA, Raposo HF, Vercesi AE, et al. Food restriction by intermittent fasting induces diabetes and obesity and aggravates spontaneous atherosclerosis development in hypercholesterolaemic mice. *Br J Nutr.* 2014;111:979-86.
9. Capettini LS, Cortes SF, Lemos VS. Relative contribution of eNOS and nNOS to endothelium-dependent vasodilation in the mouse aorta. *Eur J Pharmacol.* 2010;643:260-6.
10. Sorescu D, Weiss D, Lassegue B, Clempus RE, Szöcs K, Sorescu GP, et al. Superoxide production and expression of NOX family proteins in human atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105:1429-35.

11. Laufs U, Wassmann S, Czech T, Münzel T, Eisenhauer M, Böhm M, et al. Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:809-14.
12. Judkins CP, Diep H, Broughton BR, Mast AE, Hooker EU, Miller AA, et al. Direct evidence of a role for Nox2 in superoxide production, reduced nitric oxide bioavailability, and early atherosclerotic plaque formation in ApoE^{-/-} mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;298:H24-H32.
13. Pellegrin M, Berthelot A, Houdayer C, Gaume V, Deckert V, Laurant P. New insights into the vascular mechanisms underlying the beneficial effect of swimming training on the endothelial vasodilator function in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis.* 2007;190:35-42.
14. de Moraes C, Davel AP, Rossoni LV, Antunes E, Zanesco A. Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from highcaloric diet-fed rats. *BMC Physiol.* 2008;8:12.
15. Li G, Liu JY, Zhang HX, Li Q, Zhang SW. Exercise training attenuates sympathetic activation and oxidative stress in diet-induced obesity. *Physiol Res.* 2015;64:355-67.
16. Sastre E, Caracuel L, Balfagón G, Blanco-Rivero J. Aerobic exercise training increases nitrergic innervation function and decreases sympathetic innervation function in mesenteric artery from rats fed a high-fat diet. *J Hypertens.* 2015;33:1819-30.
17. Ferreira JC, Rolim NP, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E, Brum PC. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007;34:760-5.
18. Davel AP, Ceravolo GS, Wenceslau CF, Carvalho MH, Brum PC, Rossoni LV. Increased vascular contractility and oxidative stress in β_2 -adrenoceptor knockout mice: the role of NADPH oxidase. *J Vasc Res.* 2012;49:342-52.
19. Delbin MA, Davel AP, Couto GK, Araújo GG, Rossoni LV, Antunes E, et al. Interaction between advanced glycation end products formation and vascular responses in femoral and coronary arteries from exercised diabetic rats. *PLoS One.* 2012;7:e53318.
20. Dikalov S, Griendling KK, Harrison DG. Measurement of reactive oxygen species in cardio-vascular studies. *Hypertension.* 2007;49:717-27.

21. Ramachandran S, Penumetcha M, Merchant NK, Santanam N, Rong R, Parthasarathy S. Exercise reduces preexisting atherosclerotic lesions in LDL receptor knockout mice. *Atherosclerosis*. 2005;178:33-38.
22. Pellegrin M, Miguët-Alfonsi C, Bouzourene K, Aubert JF, Deckert V, Berthelot A, et al. Long-term exercise stabilizes atherosclerotic plaque in ApoE knockout mice. *Med Sci Sports Exerc*. 2009;41:2128-35.
23. Cacicedo JM, Gauthier MS, Lebrasseur NK, Jasuja R, Ruderman NB, Ido Y. Acute exercise activates AMPK and eNOS in the mouse aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301:1255-65.
24. Hambrecht R, Adams V, Erbs S, Linke A, Kränkel N, Shu Y, et al. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2003;107:3152-58.
25. Whitsett J, Martásek P, Zhao H, Schauer DW, Hatakeyama K, Kalyanaraman B, et al. Endothelial cell superoxide anion radical generation is not dependent on endothelial nitric oxide synthase-serine 1179 phosphorylation and endothelial nitric oxide synthase dimer/monomer distribution. *Free Radic Biol Med*. 2006;40:2056-68.
26. Shimokawa H. Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31:23-37.
27. Langbein H, Brunssen C, Hofmann A, Cimalla P, Brux M, Bornstein SR, et al. NADPH oxidase 4 protects against development of endothelial dysfunction and atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Eur Heart J*. 2015;ehv564.
28. Capettini LS, Cortes SF, Silva JF, Alvarez-Leite JI, Lemos VS. Decreased production of neuronal NOS-derived hydrogen peroxide contributes to endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Br J Pharmacol*. 2011;164:1738-48.
29. Kuhlencordt PJ, Hötten S, Schödel J, Rützel S, Hu K, Widder J, et al. Atheroprotective effects of neuronal nitric oxide synthase in apolipoprotein e knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:1539-44.
30. Gray SP, Di Marco E, Kennedy K, Chew P, Okabe J, El-Osta A, et al. Reactive Oxygen Species Can Provide Atheroprotection via NOX4-Dependent Inhibition of Inflammation and Vascular Remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36:295-307.

31. Ito D, Ito O, Mori N, Cao P, Suda C, Muroya Y, et al. Exercise training upregulates nitric oxide synthases in the kidney of rats with chronic heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2013;40:617-25.
32. Blanco-Rivero J, Roque FR, Sastre E, Caracuel L, Couto GK, Avendaño MS, et al. Aerobic exercise training increases neuronal nitric oxide release and bioavailability and decreases noradrenaline release in mesenteric artery from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2013;31:916-26.
33. Lee S, Park Y, Dellsperger KC, Zhang C. Exercise training improves endothelial function via adiponectin-dependent and independent pathways in type 2 diabetic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301:H306-H314.
34. Davis KL, Martin E, Turko IV, Murad F. Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:203-36.
35. Fukai T, Galis ZS, Meng XP, Parthasarathy S, Harrison DG. Vascular expression of extracellular superoxide dismutase in atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1998;101:2101-11.
36. Wang X, Pu H, Ma C, Jiang T, Wei Q, Zhang C, et al. Adiponectin abates atherosclerosis by reducing oxidative stress. *Med Sci Monit*. 2014;20:1792-1800.
37. Rush JW, Turk JR, Laughlin MH. Exercise training regulates SOD-1 and oxidative stress in porcine aortic endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284:H1378-H1387.
38. Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Cheng Y, Kojda G, Harrison DG. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest*. 2000;105:1631-9.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Aerobic exercise training prevents against endothelial dysfunction by increasing nitric oxide and hydrogen peroxide production in LDL receptor-deficient mice

Daniele M Guizoni, Gabriel G Dorighello, Helena C F Oliveira, Maria A Delbin, Marta H Krieger, Ana P Davel

Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, University of Campinas - UNICAMP, Campinas, Sao Paulo, Brazil

Running title: Running training improves endothelial function in LDLr^{-/-} mice

Corresponding author:

Ana P. Davel, PhD

Department of Structural and Functional Biology

Institute of Biology

P.O. Box 6109

University of Campinas -UNICAMP

Campinas, SP, Brazil

Telephone: +55 19 35216189

Fax: +55 19 35216185

E-mail: anadavel@unicamp.br

Supplemental method

Aortic en face lesions

The analysis of atherosclerotic lesions in the thoracic aorta was performed according to Daugherty and Rateri (Daugherty & Rateri, 2006). Briefly, aortas were placed in a freshly prepared paraformaldehyde solution (4% in phosphate-buffered saline) overnight. Adventitial and adipose tissues were removed the next day. The aortas were cut longitudinally along their length and placed on a black ethylene vinyl acetate sheet. Next, aortas were stained with oil red O. Images of the intimal surface were acquired using a digital camera connected to a precision zoom stereo microscope (WPI-World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA).

Supplemental reference

Daugherty A, Rateri DL. Hyperlipidemia-induced Atherosclerosis. *A Handbook of Mouse Models of Cardiovascular Disease*, edited by **Qinbo Xu**, Lexington, KY: Cardiovascular Research Center, University of Kentucky, 53-66, 2006.

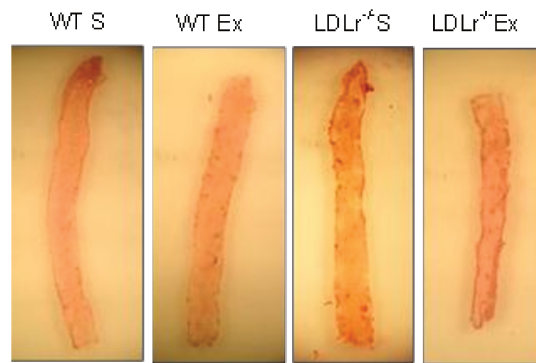
Supplemental figure

Figure S1: Representative photographs of oil red O staining in the thoracic aorta from sedentary and exercise-trained wild-type (WT) and LDLr knockout mice (LDLr^{-/-}).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

Uma variedade de trabalhos tem evidenciado os efeitos benéficos do exercício físico aeróbico no tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares, assim como no controle de fatores de risco como obesidade e diabetes. Entretanto, são escassos na literatura estudos que avaliem os efeitos benéficos de um protocolo de treinamento físico aeróbico nos estágios iniciais do desenvolvimento da aterosclerose como uma estratégia preventiva. Pacientes com hipercolesterolemia familiar (HF) apresentam um grande fator de risco para desenvolvimento de aterosclerose que é o aumento dos níveis circulantes de LDL. Sendo assim, encontrar uma estratégia que previna o desenvolvimento acelerado da doença aterosclerótica, mesmo sem reduzir os níveis plasmáticos de colesterol, é uma importante estratégia contra o desenvolvimento do ateroma e o desfecho clínico nestes pacientes.

Neste trabalho verificamos que a aorta torácica de camundongos hipercolesterolêmicos LDLr^{-/-}, modelo experimental de estudo da HF, apresentaram disfunção endotelial caracterizada pela redução no relaxamento vascular dependente do endotélio à acetilcolina, associada à redução na produção e biodisponibilidade de NO e H₂O₂, com redução na expressão proteica de eNOS total e fosforilada em Ser1177 e da nNOS total. Além disso, esses camundongos também apresentaram aumento na produção de ânion superóxido, associado à redução na expressão proteica das três isoformas da SOD e elevada expressão da subunidade catalítica Nox2 da NADPH oxidase. Estas alterações funcionais foram detectadas na ausência de depósitos evidentes de gordura na aorta torácica. O protocolo de 4 semanas de treinamento físico aeróbico de moderada intensidade em esteira rolante, mesmo sem melhorar a dislipidemia dos animais, normalizou o relaxamento dependente do endotélio associado a uma mudança no estado redox vascular: redução da produção do ânion superóxido com concomitante aumento da produção e biodisponibilidade de NO e H₂O₂. O aumento de NO e H₂O₂ foi combinado ao aumento da expressão proteica das enzimas antioxidantes de p-eNOS^{Ser1177} e de nNOS; já a redução dos níveis de superóxido associou-se a maior expressão de SOD1 e 3, além da redução da NADPH oxidase Nox2.

Tendo em vista estes resultados, o presente estudo sugere que o treinamento físico aeróbio pode prevenir a disfunção endotelial nos estágios iniciais da aterosclerose, mesmo antes do desenvolvimento do ateroma. Estes efeitos benéficos foram independentes de redução nos níveis séricos de colesterol total e triglicérides. Além disso, os resultados demonstram pela primeira vez que um treinamento físico aeróbio de 4 semanas aumenta a expressão da nNOS juntamente com aumento da produção de H_2O_2 em aorta de camundongos hipercolesterolêmicos, o que contribui para a melhora da função endotelial nestes camundongos. Estes dados são relevantes em vista de trabalhos recentes evidenciando o papel ateroprotetor do H_2O_2 (Langbein et al. 2015a; Gray et al. 2016). Sendo assim, o exercício físico aeróbio destaca-se como potencial terapia na prevenção da disfunção endotelial associada à dislipidemia da HF.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adachi T, Weisbrod RM, Pimentel DR, et al.** S-glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med* 2004; 10:1200-1207.
- Adak S, Santolini J, Tikunova S, et al.** Neuronal nitric-oxide synthase mutant (Ser-1412 - Asp) demonstrates surprising connections between heme reduction, NO complex formation, and catalysis. *J Biol Chem* 2001; 276:1244-1252.
- Ambasta RK, Kumar P, Griendling KK, et al.** Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J Biol Chem* 2004; 279:45935-45941.
- Andrew PJ, Mayer B.** Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 1999; 43:521-531.
- Antoniades C, Cunningham C, Antonopoulos A, et al.** Induction of vascular GTP-cyclohydrolase I and endogenous tetrahydrobiopterin synthesis protect against inflammation-induced endothelial dysfunction in human atherosclerosis. *Circulation* 2011; 124:1860-1870.
- Ardanaz N, Pagano PJ.** Hydrogen peroxide as a paracrine vascular mediator: regulation and signaling leading to dysfunction. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006; 231:237-251.
- Bánfi B, Molnár G, Maturana A, et al.** A Ca²⁺-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem* 2001; 276:37594-37601.
- Barhoumi T, Briet M, Kasal DA, et al.** Erythropoietin-induced hypertension and vascular injury in mice overexpressing human endothelin-1: exercise attenuated hypertension, oxidative stress, inflammation and immune response. *J Hypertens* 2014; 32:784-794.
- Bengtsson SH, Gulluyan LM, Dusting GJ, et al.** Novel isoforms of NADPH oxidase in vascular physiology and pathophysiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003; 30:849-854.
- Blanco-Rivero J, Roque FR, Sastre E, et al.** Aerobic exercise training increases neuronal nitric oxide release and bioavailability and decreases noradrenaline release in mesenteric artery from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2013; 31:916-926.
- Bleys J, Miller ER 3rd, Pastor-Barriuso R, et al.** Vitamin-mineral supplementation and the progression of atherosclerosis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2006; 84:880-887.
- Bogdan C, Rollingshoff M, Diefenbach A.** Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 2000; 12:64-76.
- Boo YC, Kim HJ, Song H, et al.** Coordinated regulation of endothelial nitric oxide synthase activity by phosphorylation and subcellular localization. *Free Radic Biol Med* 2006; 41:144-53.
- Bossaller C, Habib GB, Yamamoto H, et al.** Impaired muscarinic endothelium-dependent relaxation and cyclic guanosine 5'-monophosphate formation in atherosclerotic human coronary artery and rabbit aorta. *J Clin Invest* 1987; 79:170-217.
- Bretón-Romero R, González de Orduña C, Romero N, et al.** Critical role of hydrogen peroxide signaling in the sequential activation of p38 MAPK and eNOS in laminar shear stress. *Free Radic Biol Med* 2012; 52:1093-1100.
- Briones AM, Touyz RM.** Oxidative stress and hypertension: current concepts. *Curr. Hypertens* 2010; 12:135-142.
- Brown MS, Goldstein JL.** A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986 ;232:34-47.
- Cai H, Griendling KK, Harrison DG.** The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24:471-478.
- Cangemi R, Angelico F, Loffredo L, et al.** Oxidative stress-mediated arterial dysfunction in patients with metabolic syndrome: effect of ascorbic acid. *Free Radic Biol Med* 2007; 43:853-859.
- Capettini LS, Cortes SF, Gomes MA, et al.** Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 295:2503-2511.

- Capettini LS, Cortes SF, Lemos VS.** Relative contribution of eNOS and nNOS to endothelium-dependent vasodilation in the mouse aorta. *Eur J Pharmacol* 2010; 643:260-266.
- Capettini LS, Cortes SF, Silva JF, et al.** Decreased production of neuronal NOS-derived hydrogen peroxide contributes to endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Br J Pharmacol* 2011; 164:1738-1748.
- Chen CA, Wang TY, Varadharaj S, et al.** S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function. *Nature* 2010; 468:1115-1118.
- Chen K, Kirber MT, Xiao H, et al.** Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization. *J Cell Biol* 2008; 181:1129-1139.
- Cheng G, Cao Z, Xu X, et al.** Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* 2001; 269:131-140.
- Coleman R, Hayek T, Keidar S, et al.** A mouse model for human atherosclerosis: Long-term histopathological study of lesion development in the aortic arch of apolipoprotein E-deficient (E0) mice. *Acta histochem* 2006; 108:415-424.
- Cosentino F, Barker JE, Brand MP, et al.** Reactive oxygen species mediate endothelium-dependent relaxations in tetrahydrobiopterin-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:496-502.
- Custodis F, Baumhäkel M, Schlimmer N, et al.** Heart rate reduction by ivabradine reduces oxidative stress, improves endothelial function, and prevents atherosclerosis in apolipoprotein e deficient mice. *Circulation* 2008; 117:2377-2387.
- de Moraes C, Davel AP, Rossoni LV, et al.** Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from high-caloric diet-fed rats. *BMC Physiol* 2008; 8:12.
- de Oliveira RB, Carvalho CP, Polo CC, et al.** Impaired compensatory beta-cell function and growth in response to high-fat diet in LDL receptor knockout mice. *Int J Exp Pathol* 2014; 95: 296-308.
- Delbin MA, Davel AP, Couto GK, et al.** Interaction between advanced glycation end products formation and vascular responses in femoral and coronary arteries from exercised diabetic rats. *PLoS One* 2012; 7:e53318.
- Dias RG, Negrão CE, Krieger MH.** Óxido Nítrico e Sistema Cardiovascular: Ativação Celular, Reatividade Vascular e Variante Genética. *Arq Bras Cardiol* 2011; 96:68-75.
- Didion SP, Ryan MJ, Didion LA, et al.** Increased superoxide and vascular dysfunction in CuZnSOD-deficient mice. *Circ Res* 2002; 91:938-944.
- Dikalov SI, Dikalova AE, Bikineyeva AT, et al.** Distinct roles of Nox1 and Nox4 in basal and angiotensin II-stimulated superoxide and hydrogen peroxide production. *Free Radical Biol Med* 2008; 45:1340-1351.
- Dong ZM, Brown AA, Wagner DD.** Prominent Role of P-Selectin in the Development of Advanced Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice. *Circulation* 2000; 101:2290-2295.
- Doran AC, Meller N, McNamara CA.** The role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28:812-819.
- Dorighello GG, Rovani JC, Luhman CJ, et al.** Food restriction by intermittent fasting induces diabetes and obesity and aggravates spontaneous atherosclerosis development in hypercholesterolaemic mice. *Br J Nutr* 2014; 111:979-986.
- Dusting GJ, Selemidis S, Jiang F.** Mechanisms for suppressing NADPH oxidase in the vascular wall. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 100:97-103.
- El-Mili N, Rodrigo R, Naghizadeh B, et al.** Chronic hyperammonemia reduces the activity of neuronal nitric oxide synthase in cerebellum by altering its localization and increasing its phosphorylation by calcium-calmodulin kinase II. *J Neurochem* 2008; 106:1440-1449.
- Fang X, Weintraub NL, Rios CD, et al.** Overexpression of human superoxide dismutase inhibits oxidation of low-density lipoprotein by endothelial cells. *Circ Res* 1998; 82:1289-1297.
- Fisslthaler B, Loot AE, Mohamed A, et al.** Inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity by proline-rich tyrosine kinase 2 in response to fluid shear stress and insulin. *Circ Res* 2008; 102:1520-1528.

- Förstermann U, Sessa WC.** Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 2012; 33:829-837.
- Francis SH, Busch JL, Corbin JD, et al.** cGMP-Dependent Protein Kinases and cGMP Phosphodiesterases in Nitric Oxide and cGMP Action. *Pharmacol Rev* 2010; 62:525-563.
- Fukai T, Galis ZS, Meng XP, et al.** Vascular expression of extracellular superoxide dismutase in atherosclerosis. *J Clin Invest* 1998; 101:2101-2111.
- Fukai T, Ushio-Fukai M.** Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15:1583-1606.
- Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, et al.** Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 1999; 399:597-601.
- Fulton DJ.** Nox5 and the regulation of cellular function. *Antioxid Redox Signaling* 2009; 11:2443-2452.
- Furchgott RF, Zawadzki JV.** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-376.
- Getz GS, Reardon CA.** Diet and murine atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:242-249.
- Godo S, Sawada A, Saito H, et al.** Disruption of Physiological Balance Between Nitric Oxide and Endothelium-Dependent Hyperpolarization Impairs Cardiovascular Homeostasis in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016; 36:97-107.
- Goligorsky MS.** Endothelial cell dysfunction: can't live with it, how to live without it. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288:F871-F880.
- Gordillo G, Fang H, Park HA, et al.** Nox-4 dependent nuclear H₂O₂ drives DNA oxidation resulting in 8-OHdG as urinary biomarker and hemangioendothelioma formation. *Antioxid. Redox Signaling* 2010; 12:933-943.
- Gray SP, Di Marco E, Kennedy K, et al.** Reactive Oxygen Species Can Provide Atheroprotection via NOX4-Dependent Inhibition of Inflammation and Vascular Remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016; 36:295-307.
- Gryglewski RJ, Palmer RMJ, Moncada S.** Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelial-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986; 320:454-456.
- Gupte SA, Kaminski PM, George S, et al.** Peroxide generation by p47phox-Src activation of Nox2 has a key role in protein kinase C-induced arterial smooth muscle contraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296:1048-1057.
- Guzik TJ and Harrison DG.** Vascular NADPH oxidases as drug targets for novel antioxidant strategies. *Drug Discov Today* 2006; 11:524-533.
- Hambrecht R, Adams V, Erbs S, et al.** Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2003; 107: 3152-3158.
- Han CI, Campbell GR, Campbell JH.** Circulating bone marrow cells can contribute to neointimal formation. *J Vasc Res* 2001; 38:113-119.
- Haskell WL, Lee IM, Pate RR, et al.** Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Circulation* 2007; 116:1081-1093.
- Hasty AH, Shimano H, Osuga J, et al.** Severe hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, and atherosclerosis in mice lacking both leptin and the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 2001; 276:37402-37408.
- Hayabuchi Y, Nakaya Y, Matsuoka S, et al.** Hydrogen peroxide-induced vascular relaxation in porcine coronary arteries is mediated by Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Heart Vessels* 1998; 13:9-17.
- Hort MA, Schuldts EZ, Bet AC, et al.** Anti-Atherogenic Effects of a Phenol-Rich Fraction from Brazilian Red Wine (*Vitis labrusca* L.) in Hypercholesterolemic Low-Density Lipoprotein Receptor Knockout Mice. *J Med Food* 2012; 15:936-944.
- Hort MA, Straliootto MR, Netto PM, et al.** Diphenyl Diselenide Effectively Reduces Atherosclerotic Lesions in LDLr 2/2 Mice by Attenuation of Oxidative Stress and Inflammation. *J Cardiovasc Pharmacol* 2011; 58:91-101.
- Huang PL, Huang Z, Mashimo H, et al.** Hypertension in mice lacking the gene for

- endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 1995; 377:239-242.
- Hwang J, Ing MH, Salazar A, et al.** Pulsatile versus oscillatory shear stress regulates NADPH oxidase subunit expression: implication for native LDL oxidation. *Circ Res* 2003; 93:1225–1232.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, et al.** Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:9265-9269.
- Ignarro LJ, Harbison RG, Wood KS, et al.** Activation of Purified Soluble Guanylate Cyclase by Endothelium-Derived Relaxing Factor from Intrapulmonary Artery and Vein: Stimulation by Acetylcholine, Bradykinin and Arachidonic Acid'. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 237:893-900.
- Iida Y, Katusic ZS.** Mechanisms of cerebral arterial relaxations to hydrogen peroxide. *Stroke* 2000; 31:2224-2230.
- Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, et al.** Patterns of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 and Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression in Rabbit and Mouse Atherosclerotic Lesions and at Sites Predisposed to Lesion Formation. *Circ Res* 1999; 85:199-207.
- Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, et al.** Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* 1993; 92:883-893.
- Ismail S, Sturrock A, Wu P, et al.** NOX4 mediates hypoxia-induced proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells: the role of autocrine production of transforming growth factor- β 1 and insulin-like growth factor binding protein-3. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009; 296:489–499.
- Jayakody L, Senaratne M, Thomson A, et al.** Endothelium-dependent relaxation in experimental atherosclerosis in the rabbit. *Circ Res* 1987; 60:251-64.
- Ju H, Zou R, Venema VJ, et al.** Direct interaction of endothelial nitric oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem* 1997; 272:18522-18525.
- Judkins CP, Diep H, Broughton BR, et al.** Direct evidence of a role for Nox2 in superoxide production, reduced nitric oxide bioavailability, and early atherosclerotic plaque formation in ApoE^{-/-} mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 298:H24-H32.
- Katsuyama M, Ozgur Cevik M, Arakawa N, et al.** Myocyte enhancer factor 2B is involved in the inducible expression of NOX1/NADPH oxidase, a vascular superoxide-producing enzyme. *Febs J* 2007; 274:5128–5136.
- Kausar K, Cunha V, Fitch R, et al.** Role of endogenous nitric oxide in progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278:H1679-H1685.
- Kawahara T, Quinn MT, Lambeth JD.** Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes. *BMC Evol Biol* 2007; 7:109.
- Krieger MH, Santos KF, Shishido SM, et al.** Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. *Nitric Oxide* 2006; 14:12-20.
- Kuvin JT, Karas RH.** The effects of LDL reduction and HDL augmentation on physiologic and inflammatory markers. *Curr Opin Cardiol* 2003; 18:295-300.
- Langbein H, Brunssen C, Hofmann A, et al.** NADPH oxidase 4 protects against development of endothelial dysfunction and atherosclerosis in LDL receptor deficient mice. *Eur Heart J* 2015 (a).
- Langbein H, Hofmann A, Brunssen C, et al.** Impact of high-fat diet and voluntary running on body weight and endothelial function in LDL receptor knockout mice. *Atheroscler Suppl* 2015; 18:59-66 (b).
- Lassègue B, Clempus RE.** Vascular NAD(P)H oxidase: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Comp Physiol* 2003; 285:R277-R297.
- Lassègue B, Griendling KK.** NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30:653-661.
- Li H, Förstermann U.** Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Curr Opin Pharmacol* 2013; 13:161-167.

- Li H, Horke S, Förstermann U.** Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2014; 237: 208-219.
- Li H, Wallerath T, Förstermann U.** Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide* 2002; 7:132-147.
- Lichtman AH, Clinton SK, Iiyama K, et al.** Hyperlipidemia and atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice fed defined semipurified diets with and without cholate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:1938-1944.
- Lyle AN, Deshpande NN, Taniyama Y, et al.** Poldip2, a novel regulator of Nox4 and cytoskeletal integrity in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2009; 105:249–259.
- Ma Y, Wang W, Zhang J, et al.** Hyperlipidemia and atherosclerotic lesion development in Ldlr-deficient mice on a long-term high-fat diet. *PLoS One* 2012; 7:e35835.
- Madamanchi NR, Runge MS.** Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ Res* 2007; 100:460-473.
- Mancini G, Oliveira J, Hort MA, et al.** Diphenyl diselenide differently modulates cardiovascular redox responses in young adult and middle-aged low-density lipoprotein receptor knockout hypercholesterolemic mice. *J Pharm Pharmacol* 2014; 66:387-97.
- Manduteanu I, Simionescu M.** Inflammation in atherosclerosis: a cause or a result of vascular disorders? *J Cell Mol Med* 2012; 16:1978-1990.
- Martyn KD, Frederick LM, von Loehneysen K, et al.** Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal* 2006; 18:69-82.
- Matoba T, Shimokawa H, Kubota H, et al.** Hydrogen peroxide is an endothelium derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290:909-913.
- Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, et al.** Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest* 2000; 106:1521–1530.
- Meilhac O, Ramachandran S, Chiang K, et al.** Role of arterial wall antioxidant defense in beneficial effects of exercise on atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1681-1688.
- Miller VM, Burnett JCJ.** Modulation of NO and endothelin by chronic increases in blood flow in canine femoral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1992; 263:H103–H108.
- Minatti J, Wazlawik E, Hort MA, et al.** Green tea extract reverses endothelial dysfunction and reduces atherosclerosis progression in homozygous knockout low-density lipoprotein receptor mice. *Nutr Res* 2012; 32:684-693.
- Mitra S, Goyal T, Mehta JL.** Oxidized LDL, LOX-1 and atherosclerosis. *Cardiovasc Drugs Ther* 2011; 25:419-429.
- Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, et al.** Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circ Res* 2003; 92:31-40.
- Modlinger P, Chabrashvili T, Gill PS, et al.** RNA silencing in vivo reveals role of p22phox in rat angiotensin slow pressor response. *Hypertension* 2006; 47:238–244.
- Montezano AC, Burger D, Ceravolo GS, et al.** Novel Nox homologues in the vasculature: focusing on Nox4 and Nox5. *Clin Sci (Lond)* 2011; 120:131-141.
- Moore KJ, Freeman MW.** Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:1702-1711.
- Moses C.** Development of Atherosclerosis in Dogs with Hypercholesterolemia and Chronic Hypertension. *Circ Res* 1954; 2:243-247.
- Mount PF, Kemp BE, Power DA.** Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42:271-279.
- Nadaud S, Philippe M, Arnal JF, et al.** Sustained increase in aortic endothelial nitric oxide synthase expression in vivo in a model of chronic high blood flow. *Circ Res* 1996; 79:857-863.
- Napoli C, Williams-Ignarro S, Nigris F, et al.** Long-term combined beneficial effects of physical training and metabolic treatment on atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 8797-8802.

- Napoli C, Williams-Ignarro S, Nigris F, et al.** Physical training and metabolic supplementation reduce spontaneous atherosclerotic plaque rupture and prolong survival in hypercholesterolemic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:10479-10484.
- Newcomer SC, Thijssen DH, Green DJ.** Effects of exercise on endothelium and endothelium/smooth muscle cross talk: role of exercise-induced hemodynamics. *J Appl Physiol* 2011; 111:311-320.
- Nishiyama A, Yoshizumi M, Hitomi H, et al.** The SOD mimetic tempol ameliorates glomerular injury and reduces mitogen-activated protein kinase activity in Dahl salt-sensitive rats. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:306-315.
- Ohashi M, Runge MS, Faraci FM, et al.** MnSOD deficiency increases endothelial dysfunction in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:2331-2336.
- Oliveira HC, Cosso RG, Alberici LC, et al.** Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria. *Faseb J* 2005; 19:278-280.
- OMS** 2012. Organização Mundial de Saúde. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>>. Acesso em: 20 Fev. 2016.
- Oury TD, Day BJ, Crapo JD.** Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab Invest* 1996; 75:617-636.
- Paravicini TM, Gulluyan LM, Dusting GJ, et al.** Increased NADPH oxidase activity, gp91phox expression, and endothelium-dependent vasorelaxation during neointima formation in rabbits. *Circ Res* 2002; 91:54-61.
- Paravicini TM, Touyz RM.** NADPH oxidase, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 2008; 31:S170-S180.
- 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* 2007; 190: 35-42.
- Peshavariya H, Dusting GJ, Jiang F, et al.** NADPH oxidase isoform selective regulation of endothelial cell proliferation and survival. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2009; 380:193-204.
- Petry A, Weitnauer M, Gorlach A.** Receptor activation of NADPH oxidases. *Antioxid. Redox Signaling* 2010; 13:467-487.
- Pryszazhna O, Rudyk O, Eaton P.** Single atom substitution in mouse protein kinase G eliminates oxidant sensing to cause hypertension. *Nat Med* 2012; 18:286-290.
- Qian J, Fulton D.** Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium. *Front Physiol* 2013; 4:347.
- Rabelo LA, Cortes SF, Alvarez-Leite JL, et al.** Endothelium dysfunction in LDL receptor knockout mice: a role for H₂O₂. *Br J Pharmacol* 2003; 138:1215-1220.
- Rabelo LA, Souza VN, Fonseca LJS, et al.** Desbalanço Redox: NADPH Oxidase como um Alvo Terapêutico no Manejo Cardiovascular. *Arq Bras Cardiol* 2010; 94:684-693.
- Ramachandran S, Penumetcha M, Merchant NK, et al.** Exercise reduces preexisting atherosclerotic lesions in LDL receptor knockout mice. *Atherosclerosis* 2005; 178:33-38.
- Rameau GA, Chiu LY, Ziff EB.** Bidirectional regulation of neuronal nitric oxide synthase phosphorylation at serine 847 by the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem* 2004; 279:4307-4314.
- Reaven P, Parthasarathy S, Grasse BJ, et al.** Effects of oleate-rich and linoleate-rich diets on the susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in mildly hypercholesterolemic subjects. *J Clin Invest* 1993; 91:668-676.
- Rosen GM, Tsai P, Weaver J, et al.** The role of tetrahydrobiopterin in the regulation of neuronal nitric-oxide synthase-generated superoxide. *J Biol Chem* 2002; 277:40275-40280.
- Ross R.** Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-126.
- San Martin A, Foncea R, Laurindo FR, et al.** Nox1-based NADPH oxidase-derived superoxide is required for VSMC activation by advanced glycation end-products. *Free Radic Biol Med* 2007; 42:1671-1679.
- Santos RD, Gagliardi AC, Xavier HT, et al.** Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (HF). *Arq Bras Cardiol* 2012; 99:1-28.

- Sastre E, Caracuel L, Balfagón G, et al.** Aerobic exercise training increases nitrergic innervation function and decreases sympathetic innervation function in mesenteric artery from rats fed a high-fat diet. *J Hypertens* 2015; 33:1819-1830.
- Schürmann C, Rezende F, Kruse C, et al.** The NADPH oxidase Nox4 has anti-atherosclerotic functions. *Eur Heart J* 2015; 36:3447-3456.
- Seto SW, Krishna SM, Yu H, et al.** Impaired acetylcholine-induced endothelium-dependent aortic relaxation by caveolin-1 in angiotensin II-infused apolipoprotein-E (ApoE^{-/-}) knockout mice. *PLoS One* 2013; 8:e58481.
- Shaul PW, Smart EJ, Robinson LJ, et al.** Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem* 1996; 271:6518-6522.
- Signorello MG, Segantin A, Passalacqua M, et al.** Homocysteine decreases platelet NO level via protein kinase C activation. *Nitric Oxide* 2009; 20:104-113.
- Simionescu M.** Implications of early structural- functional changes in the endothelium for vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27:266-274.
- Simionescu N, Vasile E, Lupu F, et al.** Prelesional events in atherogenesis: accumulation of extracellular cholesterol rich liposomes in the arterial intima and cardiac valves of hyperlipidemic rabbits. *Am J Pathol* 1986; 123:85–101.
- Skovgaard N, Goulliaev A, Aalling M, et al.** The Role of Endogenous H₂S in Cardiovascular Physiology. *Curr Pharm Biotechnol* 2011; 12:1385-1393.
- Sorescu D, Weiss D, Lassegue B, et al.** Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105:1429-1435.
- Stapleton PA, Goodwill AG, James ME, et al.** Hypercholesterolemia and microvascular dysfunction: interventional strategies. *J Inflamm (Lond)* 2010; 7:54.
- Steioff K, Rütten H, Busch AE, et al.** Long term Rho-kinase inhibition ameliorates endothelial dysfunction in LDL-Receptor deficient mice. *Eur J Pharmacol* 2005; 512:247-249.
- Sturrock A, Huecksteadt TP, Norman K, et al.** Nox4 mediates TGF- β 1-induced retinoblastoma protein phosphorylation, proliferation, and hypertrophy in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292:1543–1555.
- Szocs K, Lassegue B, Sorescu D, et al.** Upregulation of Nox-based NAD(P)H oxidases in restenosis after carotid injury. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 2002; 22:21–27.
- Tabas I, Tall A, Accili D.** The impact of macrophage insulin resistance on advanced atherosclerotic plaque progression. *Circ Res* 2010; 106:58–67.
- Takaya T, Hirata K, Yamashita T, et al.** A specific role for eNOS-derived reactive oxygen species in atherosclerosis progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27:1632-1637.
- Takenouchi Y, Kobayashi T, Matsumoto T, et al.** Gender differences in age-related endothelial function in the murine aorta. *Atherosclerosis* 2009; 206:397– 404.
- Teodoro BG, Natali AJ, Fernandes SA, et al.** Improvements of atherosclerosis and hepatic oxidative stress are independent of exercise intensity in LDLr^{-/-} mice. *J Atheroscler Thromb* 2012; 19:904-911.
- Tiwari RL, Singh V, Barthwal MK.** Macrophages: an elusive yet emerging therapeutic target of atherosclerosis. *Med Res Rev* 2008; 28:483–544.
- Touyz RM, Schiffrin EL.** Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol* 2004; 122:339-352.
- Trask AJ, Delbin MA, Katz PS, et al.** Differential coronary resistance microvessel remodeling between type 1 and type 2 diabetic mice: impact of exercise training. *Vascul Pharmacol* 57: 187-193, 2012.
- Tsai P, Weaver J, Cao GL, et al.** L-arginine regulates neuronal nitric oxide synthase production of superoxide and hydrogen peroxide. *Biochem Pharmacol* 2005; 69:971-979.
- Veniant MM, Withycombe S, Young SG.** Lipoprotein size and atherosclerosis susceptibility in ApoE(-/-) and Ldlr(-/-) mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1567–1570.
- Verreth W, De Keyser D, Davey PC, et al.** Rosuvastatin restores superoxide dismutase expression and inhibits accumulation of oxidized LDL in the aortic arch of obese dyslipidemic mice. *Br J Pharmacol* 2007; 151:347-355.

- Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, et al.** Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1262-1275.
- Wang P, Tang F, Li R, et al.** Contribution of different Nox homologues to cardiac remodeling in two-kidney two-clip renovascular hypertensive rats: effect of valsartan. *Pharmacol Res* 2007; 55:408–417.
- Weaver J, Porasuphatana S, Tsai P, et al.** A comparative study of neuronal and inducible nitric oxide synthases: generation of nitric oxide, superoxide, and hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1726:302-308.
- Wendt MC, Daiber A, Kleschyov AL, et al.** Differential effects of diabetes on the expression of the gp91phox homologues nox1 and nox4. *Free Radic Biol Med* 2005; 39:381-391.
- Wenzel P, Schuhmacher S, Kienhofer J, et al.** Manganese superoxide dismutase and aldehyde dehydrogenase deficiency increase mitochondrial oxidative stress and aggravate age-dependent vascular dysfunction. *Cardiovasc Res* 2008; 80:280-289.
- Wright CE, Angus JA.** Effects of hypertension and hypercholesterolemia on vasodilatation in the rabbit. *Hypertension* 1986; 8:361-371.
- Wrobel TP, Mateuszuk L, Kostogrys RB, et al.** Quantification of plaque area and characterization of plaque biochemical composition with atherosclerosis progression in ApoE/LDLR(-/-) mice by FT-IR imaging. *Analyst* 2013; 138:6645-6652.
- Xing SS, Yang XY, Zheng T, et al.** Salidroside improves endothelial function and alleviates atherosclerosis by activating a mitochondria-related MPK/PI3K/Akt/eNOS pathway. *Vascul Pharmacol* 2015; 72:141-152.
- Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, et al.** Hydrogen peroxide, an endogenous endothelium-derived hyperpolarizing factor, plays an important role in coronary autoregulation in vivo. *Circulation* 2003; 107:1040-1045.
- Yamashita M, Tamasawa N, Matsuki K, et al.** Insulin suppresses HDL-mediated cholesterol efflux from macrophages through inhibition of neutral cholesteryl ester hydrolase and ATP-binding cassette transporter G1 expressions. *J Atheroscler Thromb* 2010; 17:1183-1189.
- Yang AL, Chen HI.** Chronic exercise reduces adhesion molecules/iNOS expression and partially reverses vascular responsiveness in hypercholesterolemic rabbit aortae. *Atherosclerosis* 2003; 169:11-17.
- Yang Z, Zhang A, Altura BT, et al.** Hydrogen peroxide-induced endothelium-dependent relaxation of rat aorta involvement of Ca²⁺ and other cellular metabolites. *Gen Pharmacol* 1999; 33:325-336.
- Yu XH, Fu YC, Zhang DW, et al.** Foam cells in atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2013; 424:245-252.
- Zaragoza C, Gomez-Guerrero C, Martin-Ventura JL, et al.** Animal models of cardiovascular diseases. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011:497841.
- Zembowicz A, Hatchett RJ, Jakubowski AM, et al.** Involvement of nitric oxide in the endothelium-dependent relaxation induced by hydrogen peroxide in the rabbit aorta. *Br J Pharmacol* 1993; 110:151-158.
- Zhang DX, Borbouse L, Gebremedhin D, et al.** H₂O₂-induced dilation in human coronary arterioles: role of protein kinase G dimerization and large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel activation. *Circ Res* 2012; 110:471-480.

7. ANEXOS



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

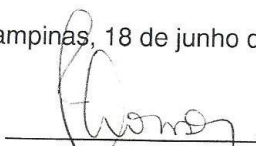
Certificamos que o projeto "Influência do treinamento físico na disfunção endotelial e no desenvolvimento do ateroma em camundongos knockout para o receptor de lipoproteínas de baixa densidade" (protocolo nº **3420-1**), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Marta Helena Krieger/ Profa. Dra. Ana Paula Couto Davel / Daniele Mendes Guizoni, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

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

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **18 de junho de 2014**.

Campinas, 18 de junho de 2014.

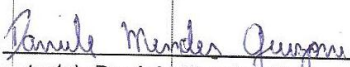

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente

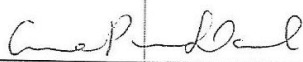

Fátima Alonso
Secretária Executiva

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Influência do treinamento físico na disfunção endotelial e no desenvolvimento do ateroma em camundongos knockout para o receptor de lipoproteínas de baixa densidade**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 02 de Fevereiro de 2016

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Daniele Mendes Guizoni**
RG n.º 44015096-6 SSP/SP

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Ana Paula Couto Davel**
RG n.º 1326305 SSP/ES

Prof.ª Dra. Ana Paula Couto Davel
Instituto de Biologia/UNICAMP
Matrícula: 296411