

BRUNO GONZAGA TEODORO

**EFEITOS DA INTENSIDADE DO TREINAMENTO SOBRE
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E DE PERFIL
LIPÍDICO EM CAMUNDONGOS LDL-/-**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2009**

BRUNO GONZAGA TEODORO

**EFEITOS DA INTENSIDADE DO TREINAMENTO SOBRE
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E DE PERFIL
LIPÍDICO EM CAMUNDONGOS LDL-/-**

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

APROVADA: 6 de novembro de 2009

Prof. Antônio José Natali
(Coorientador)

Prof. Sérgio Luis Pinto da Matta
(Coorientador)

Prof. Ricardo Aurino de Pinho

Prof. Mateus Camaroti Laterza

Prof^a. Maria do Carmo Gouveia Peluzio
(Orientadora)

Aos meus pais e irmãos.

A minha namorada.

Aos meus amigos.

A todos profissionais de Educação Física.

“Há duas coisas com que você deve se preocupar. Se você está bem ou se está doente. Se você está bem não tem com que se preocupar. Se você está doente, há duas coisas com que se preocupar. Se vai se curar ou se vai morrer. Se vai se curar não há nada com que se preocupar. Se vai morrer há duas coisas com que se preocupar. Se vai pro céu ou pro inferno. Se vai pro céu não há nada com que se preocupar. Agora se for pro inferno vai passar tanto tempo cumprimentando os velhos amigos que nem terá tempo pra se preocupar. Então, pra que se preocupar?”

Provérbio Chinês

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de realizar meus sonhos profissionais.

Aos meus pais, Leôncio e Jussânia, pela educação, amor, carinho, dedicação, apoio que sempre me deram. Sem vocês não seria possível a realização desse sonho.

Ao amor da minha vida, Milane, pelo amor que a cada dia me faz renovar e ter vontade de viver mais.

Aos meus irmãos Felipe e Diego pelos conselhos, brigas, brincadeiras. Gostariam que soubesse que sou muito feliz e tenho muito orgulho de fazer parte eternamente da vida de vocês.

Aos meus cunhados Igor e Daiane, por trazerem felicidade para nossa família.

A minha família de Viçosa, Cláudia e Osvaldo, pela amizade, por todos ensinamentos e oportunidades que vocês me proporcionaram. Sou fã de vocês e serei eternamente grato por tudo que fizeram por mim. A Betina, pela amizade, momentos de companheirismo e diversão e ao Klevinho e Sabrina por fazerem parte da família viçosense.

A minha orientadora Maria do Carmo Gouveia Peluzio, por todos ensinamentos, pela confiança depositada em mim, pela oportunidade que me deu em cursar o mestrado e pela atenção sempre dada nos momentos que necessitei.

Ao meu grande amigo Sílvio, por me orientar no começo do mestrado e pela linda amizade que criamos.

Aos amigos Márcia, Bárbara, Juliana, Matheus, Miguel, Frederico, Lucas, Luciano, Víctor, Natália, Bozi, Cynthia e Karina do Biotério de Experimentação Animal da UFV pela imprescindível ajuda e momentos de descontração.

Aos colegas do Departamento de Nutrição, Damiana, Luiz Fernando, Fernanda, Vanessa, Joana, Vânia, Ana Cristina, Fabíola, Ana Carolina, Fred,

Sandra e aos técnicos Ricardo e Cassiano por me ajudarem a treinar minha habilidade motora fina com as vidrarias do laboratório.

Ao co-orientador Sérgio da Matta, por sempre ajudar independente de sua concorrida disponibilidade de tempo.

Ao professor Ricardo Pinho por aceitar o convite de participar da banca e pela ajuda nas análises bioquímicas em seu laboratório. Aos companheiros do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia do Exercício da UNESC - Criciúma, especialmente ao Luciano Acordi, que foi essencial no enriquecimento deste trabalho.

Ao professor Mateus Laterza por aceitar o convite de participar da banca.

Ao professores e amigos incentivadores desta minha jornada acadêmica: Guilherme Goularte, Romeu de Paula, Aníbal Monteiro, Sílvio Soares, Pedro Sarmet.

Aos camundongos.

A todos que de alguma forma me ajudaram nas disciplinas, na coleta de dados, no treinamento dos animais, no sacrifício dos mesmos.

Ao Departamento de Educação Física e Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Viçosa e ao laboratório de Bioquímica e Fisiologia do Exercício da UNESC/Criciúma pelo apoio a esta pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ANEXOS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
Introdução geral.....	xv
Referências	xvii

Capítulo 1: A influência da intensidade do exercício físico aeróbico no processo aterosclerótico

Resumo	1
Abstract.....	2
1. Introdução	3
2. Metodologia.....	4
3. Gênese da aterosclerose.....	5
4. Exercício aeróbico no processo aterosclerótico.....	8
5. Potencial oxidante e antioxidante do exercício físico aeróbico.....	10
6. Exercício físico aeróbico e o sistema vasodilatador.....	13
7. Exercício físico aeróbico e inflamação.....	15

8. Considerações Finais.....	18
9. Referências	19

Capítulo 2: Efeitos do treinamento aeróbio de intensidade leve e moderada na aterosclerose, perfil lipídico e parâmetros de estresse oxidativo em camundongos LDLr^{-/-}.

Resumo	24
Abstract.....	25
1. Introdução	26
2. Material e Métodos.....	28
2.1 Cuidados éticos.....	28
2.2 Delineamento do estudo.....	28
2.3 Protocolo de exercício.....	29
2.4 Coleta de tecidos.....	30
2.5 Avaliação da deposição lipídica das aortas.....	30
2.6 Composição corporal.....	31
2.7 Análise das concentrações séricas de CT, HDL e TG.....	31
2.8 Análises bioquímicas do tecido hepático dos aniamais.....	31
2.8.1 Superóxido Dismutase.....	31

2.8.2 Catalase.....	32
2.8.3 Glutaciona peroxidase.....	32
2.8.4 Hidroperóxidos lipídicos.....	32
2.8.5 Carbonilação de proteínas.....	32
2.9 Análise da enzima citrato sintase no tecido muscular.....	33
2.9 Análise de proteínas.....	33
2.10 Análise estatística.....	33
3. Resultados.....	34
3.1 Área da lesão aterosclerótica aórtica.....	34
3.2 Composição corporal.....	35
3.3 Lipídios séricos.....	36
3.4 Atividade hepática das enzimas antioxidantes.....	36
3.5 Peroxidação Lipídica e carboxilação de proteínas no fígado.....	37
3.6 Atividade enzimática muscular de citrato sintase.....	38
4. Discussão.....	40
5. Conclusão.....	47
6. Referências.....	48

Considerações Finais Gerais.....	56
---	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Estudos de indicadores de aterosclerose em relação à intensidade do exercício aeróbio.....	17
Tabela 2.1 Área total da aorta e percentual de área lesionada.....	34
Tabela 2.2 Composição percentual de água, gordura, proteínas e cinzas dos animais.....	35
Tabela 2.3 Valores de CT, HDL, TG.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Diagrama do processo aterogênico.....	7
Figura 2.1 Desenho Experimental.....	28
Figura 2.2 Progressão do Exercício G2.....	29
Figura 2.3 Progressão do Exercício G3.....	29
Figura 2.4 Área lesionada total das aortas.....	34
Figura 2.5 Representação da área lesionada da aorta.....	35
Figura 2.6 Atividade da enzima SOD.....	36
Figura 2.7 Atividade da enzima catalase.....	37
Figura 2.8 Atividade da enzima GPx.....	37
Figura 2.9 Hidroperóxidos lipídicos no tecido hepático.....	38
Figura 2.10 Carboxilação protéica no tecido hepático.....	38
Figura 2.11 Atividade da enzima CS.....	39

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Aprovação de comitê de ética em pesquisa animal.....	57
--	-----------

RESUMO

TEODORO, Bruno Gonzaga, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2009. **Efeitos da intensidade do treinamento sobre parâmetros de estresse oxidativo e de perfil lipídico em camundongos LDL^{-/-}**. Orientadora: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Co-orientadores: Antônio José Natali e Sérgio Luis Pinto da Matta.

A aterosclerose é um processo inflamatório crônico e degenerativo que acomete os vasos, sendo caracterizada pelo acúmulo de lipídeos no espaço subendotelial da íntima, acúmulo de células inflamatórias e elementos fibrosos. A oxidação de LDL-c parece ser o principal evento para início da aterosclerose. De maneira crônica, exercício aeróbio parece melhorar os sistemas de defesa orgânicos contra aterosclerose, diminuindo o estresse oxidativo e aumentando a síntese de enzimas antioxidantes; aumentando a vasodilatação via óxido nítrico (NO) e óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e diminuindo a inflamação sistêmica com a diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias e aumento de fatores anti-inflamatórios. Porém, de maneira aguda, o exercício aeróbico de alta intensidade aumenta o risco de desenvolvimento de eventos cardiovasculares e de forma crônica pode atuar negativa ou positivamente na prevenção do processo aterosclerótico. Afim de avaliar os efeitos da intensidade do exercício aeróbio na aterosclerose, investigamos as conseqüências de 2 meses de exercício aeróbio em esteira, de intensidade leve (G2) ou moderada (G3) em relação ao controle sedentário (G1), na evolução da aterosclerose em camundongos *knockout* para o receptor de LDL (LDLr^{-/-}) previamente submetidos a 3 meses de dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica, avaliando os efeitos do colesterol total (CT), HDL-c e triglicerídeos (TG) séricos, os danos oxidativos (proteína carbonil e hidroperóxidos lipídicos), a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) no tecido hepático, e a composição corporal da carcaça. Os resultados mostraram que G2 ($0,015 \pm 0,005 \text{ cm}^2$) e G3 ($0,014 \pm 0,001 \text{ cm}^2$) apresentaram menor área de deposição lipídica aórtica em relação aos animais sedentários (G1) ($0,039 \pm 0,005 \text{ cm}^2$). Os grupos G2 e G3 apresentaram maiores valores de HDL-c, TG, maior atividade de CAT e menor peroxidação lipídica, carboniação protéica e percentual de gordura. A SOD apresentou maiores valores apenas em G3 e a GPx somente em G2.

São necessários, porém, estudos que investiguem exercícios de alta intensidade no tratamento e prevenção da aterosclerose e ainda, estudos que investiguem os mecanismos moleculares de como o exercício estimula menores áreas de lesão aterosclerótica.

ABSTRACT

TEODORO, Bruno Gonzaga, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2009. **Effects of intensity training on oxidative stress parameters and lipid profile in LDL^{-/-} mice.** Adviser: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Co-Advisers: Antônio José Natali and Sérgio Luis Pinto da Matta.

Atherosclerosis is a chronic-degenerative inflammatory process that occurs in blood vessels and is characterized by lipid, inflammatory cells and fibroses factors accumulation on the vessels wall. The (LDL-c) oxidation seems to be the first step to atherosclerosis. Aerobic exercise improve the organic system defense against atherosclerosis by decreasing oxidative stress and increasing anti-oxidant enzyme biosynthesis, improving blood vessels vasodilatation by nitric oxide (NO) and endothelium nitric oxide synthase (eNOS), decreasing the pro-inflammatory cytokine production and increasing anti-inflammatory factors. However, acute high intensity aerobic exercises increase the cardiovascular event risk while chronically it may affect either positively or negatively. To evaluate the effects of aerobic exercise intensity on atherosclerosis, we investigated the effects of 2 months of treadmill aerobic exercise, at light (G2) or moderate intensity (G3) in the development of atherosclerosis in LDL receptor knockout mice (LDLr^{-/-}) previously submitted to 3 months of high-fat high-cholesterol diet and assessing the effects of serum total cholesterol (TC), HDL-c and triglycerides (TG), oxidative damage (protein carbonyls and lipid hydroperoxides) and activity of antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) in liver tissue, and body composition of the carcass. The results showed that G2 ($0.015 \pm 0.005 \text{ cm}^2$) and G3 ($0.014 \pm 0.001 \text{ cm}^2$) had a lower aortic fat deposition area than sedentary animals (G1) ($0.039 \pm 0.005 \text{ cm}^2$). G2 and G3, had higher HDL-C, TG, levels, increased CAT activity, lower lipid peroxidation, carbonyl protein and fat percentage. SOD showed higher values only in G3 and GPx only in G2. It is necessary new researches that investigate the role of high intensity aerobic exercise on atherosclerosis and molecular mechanism of how can exercise reduces lesions area.

INTRODUÇÃO GERAL

As principais causas de morte no mundo ocidental são as doenças cardiovasculares, cujas principais manifestações são o infarto, as embolias e os acidentes vasculares cerebrais (AVC). A aterosclerose é a principal representante da síndrome de alterações que envolvem as doenças cardiovasculares, caracterizando-se pelo acúmulo de lipídios no interior de macrófagos, que se depositam na íntima vascular. A gênese do ateroma parece estar diretamente ligada à modificação oxidativa da lipoproteína de baixa densidade LDL¹.

Desde o surgimento da hipótese oxidativa para a aterosclerose, há aproximadamente 15 anos, um grande número de experimentos *in vitro*, em modelos animais e com humanos, mostraram que os lipídios oxidados exibem efeitos pró-aterogênicos². Nos eventos iniciais da aterogênese a lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDLox) é rapidamente internalizada e acumulada nos macrófagos, formando as células espumosas, que se depositam no espaço subendotelial. A LDLox é citotóxica para as células endoteliais, promovendo a expressão de citocinas e a proliferação celular, inibindo o relaxamento vascular induzido pelo óxido nítrico e desencadeando assim, uma cascata de respostas inflamatórias³.

O exercício físico tem sido recomendado na prevenção de doenças cardiovasculares, com evidências do aumento da sensibilidade à insulina e redução da tolerância à glicose, podendo também reduzir a hipertensão arterial, aumentar o colesterol da fração lipoproteína de alta densidade (HDL), diminuir as concentrações de triacilgliceróis e do colesterol da fração LDL, podendo ainda promover redução do peso corporal e do estresse emocional^{4, 5}.

Os benefícios obtidos pelo exercício físico podem ser dependentes da intensidade, mas com relação à aterosclerose permanece uma lacuna na literatura científica sobre qual intensidade do exercício aeróbio traria melhores benefícios para prevenção e tratamento desta doença crônica.

Portanto, o presente trabalho investigou em camundongos susceptíveis à aterosclerose (LDLr^{-/-}), os efeitos da intensidade do exercício

aeróbio sobre o perfil lipídico, composição corporal, estresse oxidativo e evolução da aterosclerose.

REFERÊNCIAS

1. Ishigaki Y, Katagiri H, Gao J, Yamada T, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Kaneko K, Ogihara T, Ishihara H, Sato Y, Takikawa K, Nishimichi N, Matsuda H, Sawamura T, Oka Y. Impact of plasma oxidized low-density lipoprotein removal on atherosclerosis. *Circulation* 2008; 118(1):75-83
2. Meilhac O, Ramachandran S, Chiang K, Santanam N, Parthasarathy S. Role of arterial wall antioxidant defense in beneficial effects of exercise on atherosclerosis in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001; 21: 681-1688.
3. Lusis, AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000; 407 (6801): 233-241.
4. Ensig WY, Mcnamara DJ, Fernandez MF. Exercise improves plasma lipid profiles and modifies lipoprotein composition in guinea pigs. *J. Nutr. Biochem.* 2002; 13: 747-753.
5. Thompson PD, Buchner D, Piña IL, Balady GJ, Williams MA, Marcus BH, Berra K, Blair SN, Costa F, Franklin B, Fletcher GF, Gordon NF, Pate RR, Rodriguez BL, Yancey AK, Wenger NK. Exercise and physical activity in the prevention and exercise treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003; 23 (e42-e49).

CAPÍTULO 01: ARTIGO DE REVISÃO

A INFLUÊNCIA DA INTENSIDADE DO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO NO PROCESSO ATEROSCLERÓTICO

The aerobic physical exercise intensity influence on atherosclerotic process

RESUMO

A aterosclerose é um processo inflamatório crônico e degenerativo que acomete os vasos, sendo caracterizada pelo acúmulo de lipídeos no espaço subendotelial da íntima, acúmulo de células inflamatórias e elementos fibrosos. O objetivo do artigo foi fazer revisão bibliográfica sobre as influências da intensidade do exercício aeróbio nos principais fatores da aterosclerose. Fez-se consulta a base de dados do medline (pubmed) nos últimos dez anos, utilizando-se as palavras-chaves “aterosclerose” e “exercício aeróbio”. A oxidação de LDL-c parece ser o principal evento para início da aterosclerose. O treinamento aeróbio parece melhorar os sistemas de defesa orgânicos contra aterosclerose, diminuindo o estresse oxidativo e aumentando a síntese de enzimas antioxidantes; aumentando a vasodilatação via óxido nítrico (NO) e óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e diminuindo a inflamação sistêmica com a diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias e aumento de fatores anti-inflamatórios. Porém, de maneira aguda, o exercício aeróbio de alta intensidade aumenta o risco de desenvolvimento de eventos cardiovasculares e o treinamento aeróbio pode atuar negativa ou positivamente na prevenção do processo aterosclerótico.

ABSTRACT

Atherosclerosis is a chronic-degenerative inflammatory process that occurs in blood vessels and is characterized by lipid, inflammatory cells and fibroses factors accumulation on the vessels wall. The aim of this study was to review the literature on principal causes of atherosclerosis. Medline database was consulted on the past ten years using the key-words "Aerobic Exercise" and "atherosclerosis" The (LDL-c) oxidation seems to be the first step to atherosclerosis. Aerobic exercise improve the organic system defense against atherosclerosis by decreasing oxidative stress and increasing anti-oxidant enzyme biosynthesis, improving blood vessels vasodilatation by nitric oxide (NO) and endothelium nitric oxide synthase (eNOS), decreasing the pro-inflammatory cytokine production and increasing anti-inflammatory factors. However, acute high intensity aerobic exercises increase the cardiovascular event risk while aerobic training may affect either positively or negatively.

1 - INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de morbidade e mortalidade no Brasil e no mundo. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), um terço de todas as mortes da população mundial (16,7 milhões de pessoas) foram ocasionadas pelas DCV¹.

O exercício físico regular está associado com o decréscimo na incidência de eventos cardiovasculares^{2, 3}. O treinamento físico melhora a função endotelial, a capacidade física e a colaterização de vasos em paciente com Doenças Arteriais Coronarianas (DAC)⁴, melhora a insuficiência cardíaca crônica⁵ e melhora a doença arterial periférica⁶. Além disso, a atividade física está associada com melhora no humor, peso corporal, pressão arterial, sensibilidade à insulina e variáveis inflamatórias e hemostáticas⁷.

A intensidade pela qual se realiza atividade física aeróbica torna-se fator essencial para seus possíveis benefícios nas DAC, por isso o objetivo desta revisão foi verificar em qual intensidade são obtidos os melhores resultados na prevenção e tratamento da aterosclerose.

2 - METODOLOGIA

Fez-se consulta a base de dados do medline (pubmed) nos últimos dez anos, utilizando-se as palavras-chaves “aterosclerose” e “exercício aeróbio” e suas respectivas traduções para o inglês, além disso, artigos com importância histórica e referências importantes encontradas nos artigos pesquisados também foram incluídos, para buscar evidências sobre a influência aguda e crônica da intensidade do treinamento aeróbio no processo envolvido a doença cardiovascular.

3 - GÊNESE DA ATEROSCLEROSE

A aterosclerose pode ser definida como um processo inflamatório crônico e degenerativo que acomete os vasos, sendo caracterizada pelo acúmulo de lipídios no espaço subendotelial da íntima, acúmulo de células inflamatórias e elementos fibrosos. A aterosclerose pode se desenvolver em qualquer vaso, porém os mais comumente afetados e de relevância clínica incluem a aorta e as artérias coronárias, carótidas e cerebrais⁸.

Uma das possíveis hipóteses para o início da aterosclerose é o acúmulo de partículas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) na matriz subendotelial da camada íntima das artérias. Este acúmulo será maior quanto maior o nível de LDL circulante. O transporte da LDL através do endotélio com conseqüente retenção na íntima, será mais eficiente nos locais onde a força de cisalhamento for maior, aumentando suscetibilidade para formação da lesão⁸. Em contraste aos efeitos adversos de uma elevação da LDL, a concentração de lipoproteína de alta densidade (HDL) correlaciona-se inversamente com o desenvolvimento da aterosclerose⁹.

A LDL presente na corrente sanguínea difunde-se passivamente através das células endoteliais e sua retenção na parede do vaso parece envolver interações entre a apolipoproteína B, que faz parte da sua constituição, e as proteoglicanas que estão presentes na camada íntima das artérias. Uma vez retida no espaço subendotelial, a LDL poderá ser quimicamente modificada contribuindo, assim, para o processo inflamatório. A modificação química mais significativa para o início da formação da lesão é a oxidação, com conseqüente formação da LDL oxidada (LDL-ox). A modificação oxidativa das partículas de LDL é resultado da ação de radicais livres e de enzimas, tais como mieloperoxidase, xantina oxidase, NADPH-oxidase, fosfolipases e outras lipases⁸. As interações da LDL oxidada depende da extensão da sua modificação, que pode variar de uma modificação mínima (mmLDL), em que as partículas de LDL ainda são reconhecidas pelos receptores nativos de LDL, até uma oxidação extensa, na qual a apoB é fragmentada, em vez destas partículas serem reconhecidas pelos receptores nativos de LDL, serão identificadas pelos receptores *scavenger* expressos pelos macrófagos¹⁰.

A LDL-ox estimula a camada de células endoteliais a produzir moléculas de adesão celular como VCAM-1 (molécula-1 de adesão da célula vascular), ICAM-1 (molécula-1 de adesão intercelular), fatores de crescimento, tal como M-CSF (fator estimulador de colônia de macrófago) e proteínas quimiotáticas, como MCP-1 (proteína-1 quimiotática para monócitos), resultando na adesão e no recrutamento de monócitos e linfócitos circulantes para dentro da parede arterial⁸. Este processo está expresso de maneira resumida na figura 1.1.

Porém, no organismo humano existem linhas de defesa do processo aterosclerótico, dentre elas as enzimas antioxidantes, o óxido nítrico (NO) e a óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) e moléculas e citocinas anti-inflamatórias que estão envolvidas no processo gerador de aterosclerose.

O sistema antioxidante atua na atenuação das cargas de radicais livres no organismo, sendo importante na prevenção do processo aterosclerótico já que este pode ser iniciado e agravado através da entrada, no endotélio, das lipoproteínas modificadas pelos radicais livres. Basicamente há produção de 3 enzimas atuantes no processo antioxidante: a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutiona peroxidase (GPX).

A SOD converte radical superóxido em peróxido de hidrogênio, e níveis elevados desta enzima relaciona-se com aumento da função endotelial em condições de hipercolesterolemia e prevenção da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) decorrentes de hiperglicemia¹¹ sendo importante, portanto, na prevenção e tratamento da doença aterosclerótica.

A CAT reduz peróxido de hidrogênio à água, catalisando esta reação com taxas extremamente elevadas¹², possuindo importante papel na proteção do organismo quando o mesmo se encontra sob elevado estresse oxidativo.

A GPX, assim como a CAT, reduz peróxido de hidrogênio a água além de reduzir peróxidos lipídicos a álcoois lipídicos. Baixas concentrações de GPX levam a detoxificação ineficiente dos peróxidos lipídicos e de hidrogênio, podendo favorecer a formação de radicais peroxila e hidroxila, respectivamente¹³, fato que contribui para aterogênese.

A função endotelial vascular íntegra é essencial para manutenção da saúde das paredes dos vasos sanguíneos¹⁴.

O NO é um gás volátil, solúvel em lipídios e produzido pelas células endoteliais pela ação da enzima eNOS a partir do aminoácido L-arginina¹⁴. Segundo Dimmeler et al.¹⁵, o NO tem como função principal a vasodilatação, aumentando o lúmen dos vasos sanguíneos e diminuindo a força de cisalhamento. Esta age no endotélio como resultado do fluxo sanguíneo e quanto maior sua ação, mais prejudicial aos vasos sanguíneos.

Além disso, a eNOS está envolvida em processo de neoangiogênese, formação de novos vasos sanguíneos. Em estudo feito por LAUFS et al.¹⁶, animais *knockout* para eNOS não apresentaram produção endotelial de células progenitoras endoteliais (EPC) circulantes, células estas responsáveis pela neoangiogênese em animais e humanos.

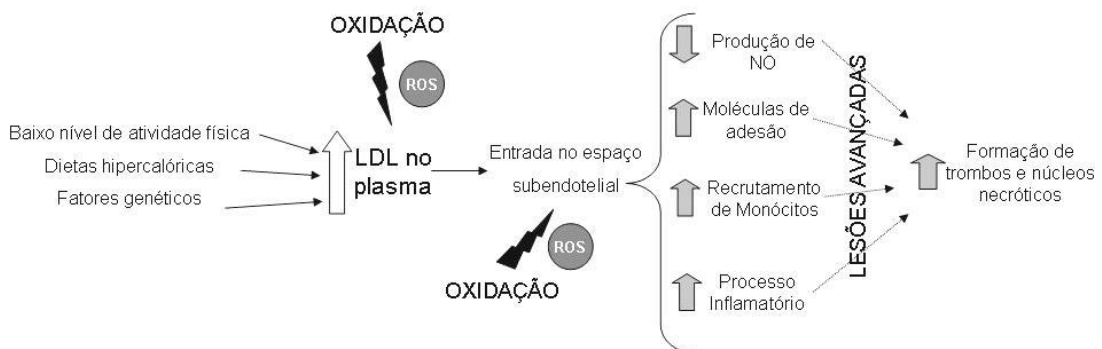


Figura 1.1: Diagrama do processo aterogênico

4 - EXERCÍCIO AERÓBIO NO PROCESSO ATEROSCLERÓTICO

Estudos observacionais sugeriram que a inatividade física e baixo condicionamento cardiorespiratório são fatores preditores de doença cardiovascular aterosclerótica^{17,18} e que o aumento da atividade física habitual¹⁹ e condicionamento cardiorespiratório²⁰ estão associados ao decréscimo na mortalidade.

Siscovick et al.²¹ demonstraram pela primeira vez que o exercício físico vigoroso aumenta o risco coronariano primário durante a sessão do exercício. Em concordância com Siscovick et al.²¹, em estudo mais recente²² demonstrou-se que uma única sessão de exercício aeróbio vigoroso (30 minutos a 70% do VO_{2max}) aumenta a tendência do desenvolvimento de placas trombóticas em voluntários saudáveis e sedentários, ao passo que a intensidade moderada (50% do VO_{2max}) não provocou o mesmo efeito ao realizarem coleta do sangue antes e após a sessão e análise *in vitro* destas células.

No entanto, de maneira crônica, o exercício vigoroso, pode diminuir a ocorrência de eventos cardiovasculares e está associado inversamente com a mortalidade²¹. Adicionalmente, quanto maior a intensidade, maior a diminuição de fatores de risco associados com a doença aterosclerótica, tais como a concentração plasmática de LDL-C e sobrepeso em adolescentes²³.

Para verificar essas associações, Rauramaa et al.²⁴ testaram durante 6 anos, a intervenção da atividade física aeróbica, em um estudo randomizado e controlado (estudo DNASCO) em 140 homens de meia-idade, na evolução da aterosclerose. Mensurou-se a evolução da aterosclerose através da espessura da camada íntima arterial da bifurcação carótida por ultra-sonografia. Os voluntários foram orientados a se exercitar em uma intensidade correspondente ao seu limiar ventilatório (de 40 a 60% do VO_{2max}) de 45 a 60 minutos por sessão e 5 vezes por semana. Como principal achado do estudo, o grupo que sofreu intervenção e não fazia uso de estatina apresentou menor espessura da íntima arterial em relação ao grupo controle (sem exercício), o que demonstra que o exercício aeróbio de baixa a moderada intensidade, representa fator protetor na evolução da lesão aterosclerótica.

Em estudos com animais, Shimada et al.²⁵ demonstraram que a atividade física aeróbica (natação) diminuiu a severidade da lesão aterosclerótica em camundongos *knockout* para apo E submetidos à uma dieta hiperlipídica. Além disso, Napoli et al.²⁶ realizaram experimento com camundongos deficientes para o receptor de LDL e verificaram que a atividade física aeróbica progressiva (natação), além de atenuar a lesão aterosclerótica, aumenta o tempo de vida dos animais submetidos à dieta hiperlipídica. E ainda, Ramachadran et al.²⁷ demonstraram que o exercício aeróbico de moderada intensidade (corrida forçada em esteira, 5 vezes por semana, 30 minutos por dia à 15 m/min) reduziu a lesão aterosclerótica quando comparado ao grupo controle (sem exercício), em camundongos *knockout* para o receptor de LDL, previamente acometidos com aterosclerose mostrando, assim, a possibilidade do exercício não somente prevenir a aterosclerose como também reduzi-la.

Por outro lado, poucos estudos demonstraram que o exercício físico não diminui a evolução do processo aterosclerótico como o de Wilians et al.²⁸ em que 34 meses de exercício aeróbico em macacos não impediu a progressão da lesão aterosclerótica, apesar de melhorias na função cardíaca, tais como diminuição da frequência cardíaca de repouso, melhora do volume de ejeção mensurado por ecocardiografia e na dilatação dos vasos em resposta a fenilefrina em relação aos animais que não se exercitaram.

Dessa maneira, o exercício aeróbico parece atuar na prevenção e tratamento da lesão aterosclerótica. A intensidade mais testada tanto em humanos quanto em animais é a moderada, havendo porém, algumas evidências que exercícios aeróbicos de intensidade alta, de maneira aguda, aumentam a chance eventos cardiovasculares, mas cronicamente se associam com decréscimos na ocorrência desses eventos e da mortalidade.

5 - POTENCIAL OXIDANTE E ANTIOXIDANTE DO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO

Sabendo-se que uma das hipóteses mais aceitas para o início do processo aterogênico refere-se ao processo oxidativo envolvendo a LDL, torna-se importante compreender os efeitos da atividade física aeróbia neste processo.

A maioria do oxigênio consumido é utilizada na mitocôndria para o metabolismo de substrato e produção de ATP. Porém, estima-se que para cada 25 moléculas de oxigênio consumidas durante a respiração normal, um radical livre é produzido²⁹. Alguns estudos demonstraram que existe relação entre o aumento do consumo de oxigênio durante o exercício e a produção de radicais livres.

Segundo Chakraborti et al.³⁰ parte do oxigênio consumido pode ser convertido em vários intermediários tais como $O_2^{\cdot -}$ (radical superóxido), OH^{\cdot} (radical hidroxila) e H_2O_2 (peróxido de hidrogênio). Por definição, apenas os dois primeiros são radicais livres, pois possuem um elétron não pareado em sua estrutura atômica. Coletivamente, eles são chamados de espécies reativas de oxigênio (EROs). Acredita-se que são responsáveis por uma série de mudanças bioquímicas e fisiológicas que ocorrem durante o exercício, sendo indicativos de estresse oxidativo aumentado, levando a danos nas estruturas celulares, como na bicamada lipídica das células, além da oxidação das lipoproteínas plasmáticas, principalmente a LDL, desencadeando o primeiro passo para gênese da aterosclerose³¹.

Em um estudo em que 10 homens saudáveis e bem condicionados, exercitaram aerobicamente numa intensidade leve (caminhada 55% da frequência cardíaca de reserva), sem exaustão, durante seis horas e por dois dias consecutivos demonstrou-se que houve diminuição da concentração plasmática da LDL oxidada³², comprovando que o exercício físico de intensidade leve e longa duração poderá suprimir as cargas de estresse oxidativo de maneira aguda, podendo também se relacionar inversamente com o processo aterogênico.

Para verificar o efeito da intensidade do exercício físico aeróbio no estresse oxidativo, Wang et al.³³ testaram o efeito de três protocolos de atividade física: leve (40% do VO_{2max}), moderado (60% do VO_{2max}) e intenso

(80% do VO_{2max}) por 40 minutos, sobre o aumento da LDL oxidada e EROs pós-exercício, em 25 adultos jovens e sedentários ($VO_{2max} = 35\text{ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$). Verificou-se que quando os voluntários se exercitaram na intensidade de 80% do VO_{2max} , produziram mais LDL oxidada e que esta, provocou maior reatividade das EROs nos monócitos, em relação às atividades leve e moderada. Assim, conclui-se que de maneira aguda, o exercício físico aeróbio de elevada intensidade provoca maior estresse oxidativo em indivíduos previamente sedentários, porém ainda não se sabe o efeito crônico deste exercício no processo aterosclerótico.

Cronicamente, procura-se demonstrar que a atividade física aeróbica, em intensidade de moderada a alta, melhora a função antioxidante, aumentando a expressão e atividade das enzimas antioxidantes. Moraes et al.³⁴ demonstraram em modelo animal que os grupos exercitados (corrida em esteira forçada, de 70 à 80% do VO_{2max} , 60 minutos por dia e 5 dias por semana) obtiveram maior expressão da enzima antioxidante SOD no tecido aórtico e mesentérico, em relação aos grupos sedentários. De maneira semelhante, Napoli et al.³⁵ mostraram em camundongos *knockout* para o receptor de LDL, que a atividade física aeróbica de intensidade leve à moderada (natação) por 18 semanas levou ao aumento da atividade das enzimas antioxidantes, SOD, CAT e GPX no tecido aórtico dos grupos exercitados em relação aos sedentários. Dessa maneira, a atividade física crônica tem demonstrado aumento do sistema antioxidante enzimático, possibilitando ao organismo combater o processo aterogênico na sua origem.

Cabe salientar, porém, que a atividade física não usual, intensa e extrema pode levar ao aumento do estresse oxidativo até mesmo em indivíduos treinados. Para verificar esta hipótese, verificou-se em 31 soldados com alto condicionamento físico ($VO_{2max} = 65\text{ml de O}_2.\text{kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) que após marcha de 50km com 30Kg de sobrecarga houve aumento do estresse oxidativo e danos celulares, mensurados pelos marcadores ácido úrico, ácido ascórbico e conteúdo de proteína carbonil, mesmo sendo os voluntários treinados por 6 meses antes da marcha³⁶.

A atividade física crônica pode levar a adaptações benéficas no sistema de defesa antioxidante, ressaltando, porém, que altas intensidades

podem aumentar o estresse oxidativo de maneira aguda. Entretanto, o efeito crônico dessas atividades e atividades extenuantes sob o dano celular induzido pelas EROs não está claro.

6 - EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO E O SISTEMA VASODILATADOR

O sistema vasodilatador consiste basicamente na vasodilatação provocada pelo NO derivado do endotélio, sintetizado pela eNOS e estimulado por neurotransmissores como acetilcolina (ACh). Melhoras nesse sistema têm demonstrado diminuição dos fatores de risco associados com aterosclerose, tais como hipercolesterolemia, hipertensão e obesidade¹⁴.

O treinamento físico aeróbio de moderada intensidade melhora a função endotelial, diminui a aterosclerose e aumenta o número de vasos sanguíneos (neoangiogênese) em animais e humanos. O aumento dos vasos sanguíneos é dependente, pelo menos em parte, do NO, pois estudo em animais *knockout* para eNOS apresentou menor elevação das EPCs pós exercício, sugerindo que o NO está correlacionado inversamente com o processo aterogênico¹⁶.

Indivíduos idosos com maior condicionamento cardiorespiratório apresentaram melhor função endotelial vasodilatadora do que indivíduos da mesma idade com menor condicionamento cardiorespiratório³⁷. Este mesmo estudo mostrou que, intervenção de 3 meses de exercícios aeróbios de intensidade moderada (75% da FC máxima, 5 vezes por semana) em indivíduos idosos sedentários, melhorou o relaxamento vascular.

A fim de verificar o efeito crônico da intensidade do treinamento aeróbio nas propriedades vasodilatadoras em humanos, Goto et al.³⁸ testaram indivíduos saudáveis por 12 semanas de treinamento em 3 diferentes intensidades, leve (25% do VO_{2max}), moderada (50% do VO_{2max}) e alta (75% do VO_{2max}) com duração de 30 minutos por sessão e frequência semanal de 5 vezes. Verificaram ao final do período da intervenção que a melhora na função vasodilatadora ocorreu no grupo que treinou em intensidade moderada. Este estudo leva-nos a inferir que cronicamente, o treinamento aeróbio de baixa ou alta intensidade não causa efeitos benéficos na vasodilatação, necessitando então mais estudos para recomendação destas intensidades em indivíduos previamente acometidos com aterosclerose.

Similarmente aos achados de Goto et al.³⁸, Sun et al.³⁹, demonstraram diminuição da função vasodilatadora em animais submetidos a treinamento estressante (3h por dia à 50% da velocidade aeróbica

máxima, 5 vezes por semana, durante 6 semanas) em comparação aos animais submetidos a treinamento menos estressante (2h por dia à 50% da velocidade aeróbica máxima, 5 vezes por semana, durante 6 semanas), apesar do aumento da eNOS em ambos os grupos, sugerindo que a função vasodilatadora não é somente dependente da síntese endógena de NO.

Dessa maneira, a vasodilatação induzida pelo exercício aeróbio é importante no tratamento e prevenção da doença arterial-aterosclerótica parecendo ocorrer de maneira mais significativa em protocolos que utilizam a intensidade moderada, tanto em humanos quanto em modelos animais.

7 - EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO E INFLAMAÇÃO

Conscientes da hipótese de oxidação da LDL no espaço subendotelial, dando início a um processo inflamatório que culminará com a lesão aterosclerótica, torna-se importante a compreensão de como o exercício aeróbio modula a inflamação sistêmica, a fim de atenuar o processo aterosclerótico como um todo. A progressão e desenvolvimento da aterosclerose dependem, em parte, da migração de monócitos para vasos sanguíneos, onde eles se tornam ativos para liberação de citocinas⁴⁰.

A concentração plasmática de citocinas é pequena e em alguns casos difícil de ser detectada. Este fato acontece por que, geralmente, na circulação sanguínea essas citocinas desencadeiam funções supressoras do sistema imune, tanto na inflamação excessiva quanto em distúrbios neuro-endócrino-metabólicos sistêmicos. Dessa maneira, Petersen⁴¹ sugere que inflamação sistêmica crônica de baixa intensidade está fortemente associada com as doenças crônico-não-transmissíveis, tais como aterosclerose.

As primeiras citocinas na cascata, são o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e interleucina 1 (IL1), citocinas pró-inflamatórias. Logo após, na continuação da cascata é liberada vem a interleucina 6 (IL6), tida como pró e anti-inflamatória, seguida da liberação do receptor antagonista de IL1 (IL1ra), receptor antagonista de TNF (sTNF-R) e interleucina 10 (IL10), classificados como fatores anti-inflamatórios⁴¹.

Geralmente após o exercício agudo não há aumento das citocinas pró-inflamatórias (IL1 e TNF α). Isto pode ser parcialmente explicado pelo aumento de IL6 que induz a síntese dos receptores antagônicos de IL1 e TNF α (IL1ra e sTNF-R, respectivamente) e ainda, de outras citocinas anti-inflamatórias como IL10⁴². Porém, independentemente de IL6, o exercício por si só consegue suprimir de outras maneiras a entrada destas citocinas pró-inflamatórias no plasma. Por exemplo, em camundongos *knockout* para o gene de IL6, houve modesta diminuição dos níveis plasmáticos de TNF α de repouso após exercício⁴³. Isto sugere que podem existir dois mecanismos de atenuação de pequenos níveis inflamatórios sistêmicos, um IL6 dependente e outro IL6 independente.

Markovitch et al.⁴⁴ não demonstraram aumento nem de marcadores inflamatórios tais como proteína C reativa (PCR), IL6 e células do sistema imunológico e fatores de agregação plaquetária, nem de fatores anti-inflamatórios como IL10, após uma semana de treinamento aeróbio moderado (30 minutos a 50% do VO₂max) em 12 voluntários sedentários. Este resultado sugere que a existência de outro mecanismo na atenuação da inflamação envolvendo poucas sessões de exercício aeróbio moderado.

Por outro lado, Copolla et al.⁴⁵ demonstraram que o exercício físico aeróbio vigoroso agudo (cicloergômetro de pernas, progressivo, até atingir 20 na escala de Borg), aumentou fatores relacionados à inflamação e agregação plaquetária em voluntários treinados e saudáveis. Porém, cronicamente, Sloan et al.⁴⁰ demonstraram que o exercício aeróbio de alta intensidade (75 a 80% da frequência cardíaca máxima, durante 40 minutos, 4 vezes por semana), foi capaz de diminuir ($p < 0,05$) a estimulação de liberação do TNF ao passo que, o exercício aeróbio de moderada intensidade (55 à 60% da frequência cardíaca máxima, durante 40 minutos, 4 vezes por semana) não conseguiu o mesmo efeito em 12 semanas de treinamento, em indivíduos saudáveis. Sugeriu-se que o exercício crônico de alta intensidade pode diminuir a liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF α .

De acordo com algumas evidências científicas^{40,45}, torna-se evidente o risco da prática de exercício aeróbio em indivíduos com acometimento aterosclerótico, já que de maneira aguda o mesmo pode aumentar o risco de inflamação e agregação plaquetária. Por outro lado, indivíduos saudáveis podem fazer o uso desta intensidade de exercício, havendo evidências que, o treinamento aeróbio diminui o estímulo à liberação de citocinas pró-inflamatórias.

A Tabela 1.1, mostra os principais estudos realizados com mais de uma intensidade de treinamento aeróbio em diferentes fatores relacionados à aterosclerose.

TABELA 1.1 – Estudos da relação da intensidade do exercício aeróbio com indicadores de aterosclerose

Primeiro Autor e data	Amostra do estudo	Protocolos de treinamento utilizados	Indicador de aterosclerose utilizado	Resultados Principais
Cadroy ²² , 2002	Homens, sedentários e saudáveis	Comparação aguda de duas intensidades: 50 ou 70% do VO _{2max}	Deposição de plaquetas <i>in vitro</i>	Grupo que fez a sessão à 70% aumentou a tendência de deposição de plaquetas
Goto ³⁸ , 2003	Homens jovens e saudáveis	Comparação crônica (12 semanas) de três intensidades: 25 ou 50 ou 70% do VO _{2max}	Vasodilatação, pela circulação sanguínea do ante-braço em resposta à Acetil-colina	Somente o grupo que treinou a 50% obteve melhora da função vasodilatadora
Wang ³³ , 2006	Homens jovens e sedentários	Comparação aguda de três intensidades: 40 ou 60 e 80% do VO _{2max}	Níveis plasmáticos de LDL-ox ^{***}	Grupo que exercitou a 80% teve maiores níveis de LDL-ox pós-exercício
Sloan ⁴⁰ , 2007	Mulheres e homens saudáveis	Comparação crônica (12 semanas) de duas intensidades: 60 ou 80% da FC _{max} ^{**}	TNF ^{****} plasmático,	Somente o grupo que treinou a 80% obteve melhora na liberação de TNF pós-exercício
Sun ³⁹ , 2008	Ratos Wistar	Comparação crônica (06 semanas) de dois protocolos: 2h ou 3h por dia de esteira forçada	Vasodilatação, pela circulação sanguínea em resposta à Acetil-colina	Somente o grupo que treinou 2h obteve melhora na função vasodilatadora

* → Frequência Cardíaca máxima, ** → LDL oxidada, *** → Fator de Necrose Tumoral

8 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

De maneira geral, o exercício aeróbio atua tanto na prevenção, quanto no tratamento da aterosclerose. Em relação à intensidade do esforço, ainda não há consenso de qual intensidade leva à melhores resultados no processo aterosclerótico. A falta de consenso pode ser pela inexistência de padronização da intensidade do esforço, ora classificando o esforço pelo percentual do VO_{2max} , ora pela frequência cardíaca máxima, ora pela frequência cardíaca de reserva.

Apesar de diferentes metodologias, algumas evidências parecem estar claras. De maneira aguda, o exercício físico de alta intensidade leva ao aumento do risco coronariano primário, aumento do estresse oxidativo, diminuição da função vasodilatadora do organismo, aumento da inflamação e agregação plaquetária sendo, portanto, contra-indicado em pessoas previamente acometidas com aterosclerose. Cronicamente, alguns estudos demonstraram melhora enquanto outros ressaltam efeitos negativos desses fatores, sendo necessários mais estudos, tanto em humanos quanto em modelos animais, para melhor elucidar o papel da intensidade do treinamento aeróbio na aterosclerose.

9 - REFERÊNCIAS

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Informações estatísticas e geocientíficas. [acessado em 2006 jan 20]. Disponível em <http://www.ibge.gov.br>.
2. Manson JE, Greenland P, LaCroix AZ, Stefanick ML, Mouton CP, Oberman A, Perri MG, Sheps DS, Pettinger MB, Siscovick DS. Walking compared with vigorous exercise for the prevention of cardiovascular events in women. *N Engl J Med*. 347 (10): p716-725, 2002.
3. Hakim AA, Petrovitch H, Burchfiel CM, Ross GW, Rodriguez BL, White LR, Yano K, Curb JD, Abbott RD. Effects of walking on mortality among nonsmoking men. *N Engl J Med*. 1998; 338 (2):94-99.
4. Benardineli R, Paolini I, Cianci G, Piva R, Georgiou D, Purcaro A. Exercise training intervention after coronary angioplasty: the ETICA trial. *J Am Coll Cardiol*. 2001; 37 (7):1891-1900.
5. Hambrecht R, Fiehn E, Weigl C, Gielen S, Hamann C, Kaiser R, Yu J, Adams V, Niebauer J, Schuler G. Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 1998; 98 (24): 2709-2715.
6. Stewart KJ, Hiatt WR, Regensteiner JG, Rirsch AT. Exercise training for claudication. *N Engl J Med*. 2002; 347(24): 1941-1951.
7. Wannamethee SG, Lowe GD, Whincup PH, Rumbley A, Alker M, Lenon L. Physical activity and hemostatic and inflammatory variables in elderly men. *Circulation*. 2002; 105 (15): 1785-1790.
8. Lusis, AJ. Atherosclerosis. *Nature Reviews*. 2000; 407: 233-241.
9. Barter P. The inflammation: Lipoprotein cycle. *Atherosclerosis Supplements*. 2005; 6 15-20.
10. Glass KC, Witztum LJ. Atherosclerosis: The road ahead review. 2001; 104: 503 -516.
11. Faraci FM, Didon SP. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004, 24: 1367-1373.

12. Cohen G, Kim M, Ogwu V. A modified catalase assay suitable for a plate reader and for analysis of brain cell cultures. *J Neurosci Methods*. 1996; 67: 53-56.
13. Wassmann S, Wassmann K, Nickening G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension*. v.44, p.381-386, 2004.
14. Green DJ, Maiorana A, O'Driscoll G, Taylor R. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *J Physiol*. 2004, 56 (1): 1-25.
15. Dimmeller SE, Zeiher AM. Exercise and cardiovascular. Get active to AKTivate your endothelial nitric oxid synthase. *Circulation*. 2003; 107 (3118-20) (editorial).
16. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, Miche E, Böhm M, Nickenig G.. Physical training increases endothelial progenitors cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation*. 2004; 109 (2): 2006-226.
17. Lee CD, Blair SN, Jackson AS. Cardiorespiratory fitness, body composition, and all-cause and cardiovascular disease mortality in men. *Am J Clin Nutr*. 1999; 69:373-80.
18. Laukkanen JA, Lakka TA, Rauramaa R, Kuhanen R, Venäläinen JM, Salonen R, Salonen JT. Cardiovascular fitness as a predictor of mortality in men. *Arch Intern Med*. 2001;161:825-31
19. Paffenbarger RS, Hyde RT, Wing AL, Lee IM, Jung DL, Kampert JB. The association of changes in physical-activity level and other lifestyle characteristics with mortality among men. *N Engl J Med*. 1993; 328:538-45.
20. Erikssen G, Liestol K, Bjornholt J, Thaulow E, Sandvik L, Erikssen J. Changes in physical fitness and changes in mortality. *Lancet*. 1998; 352: 759-62.
21. Siscovick DS, Weiss NS, Fletcher RH, Lasky T. The incidence of primary cardiac arrest during vigorous exercise. *N Engl J Med*. 1984; 311: 874-877.
22. Cadroy Y, Pillard F, Sakariassen KS, Thalamas C, Boneu B, Riviere D. Strenuous but not moderate exercise increases the thrombotic

- tendency in healthy sedentary male volunteers. 2002; *J Appl Physiol.* 93: 829–833.
23. Kelley GA, Kelley KS. Aerobic exercise and lipids and lipoproteins in children and adolescents: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis.* 2007; 191(2): 447–453.
 24. Rauramaa R, Halonen P, Väisänen SB, Lakka TA, Schmidt-Trucksäss A, Berg A, Penttilä IM, Rankinen T, Bouchard C. Effects of aerobic physical exercise on inflammation and atherosclerosis in men: The DNASCO study. *Ann Intern Med.* 2004; 140: 1007-1014.
 25. Shimada K, Kishimoto C, Okabe TA, Hattori M, Murayama T, Yokode M, Kita T. Exercise training reduces severity of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice via nitric oxide. *Circ J.* 2007; 71: 1147–1151.
 26. Napoli C, Williams-Ignarro S, de Nigris F, Lerman LO, D'Armiento FP, Crimi E, Byrns RE, Casamassimi A, Lanza A, Gombos F, Sica V, Ignarro LJ. Physical training and metabolic supplementation reduce spontaneous atherosclerotic plaque rupture and prolong survival in hypercholesterolemic mice. *PNAS.* 2006; 103 (27): 10479–10484.
 27. Ramachandran S, Penumetcha M, Merchant NK, Santanam N, Rong R, Parthasarathy S. Exercise reduces preexisting atherosclerotic lesions in LDL receptor knock out mice. *Atherosclerosis.* 2005; 178: 33–38.
 28. Williams JK, Kaplan JA, Suparto IH, Fox JL, Manuck, SB. Effects of exercise on cardiovascular outcomes in monkeys with risk factors for coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23: 864-871.
 29. Chance B, Sies H, Boveris A: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979; 59: 527–605.
 30. Chakraborti T, Ghosh SK, Michael JR, Batabyal SK, Chakraborti S: Targets of oxidative stress in cardiovascular system. *Mol Cell Biochem.* 1998; 187: 1–10.
 31. Jenkins RR: Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Med.* 1988; 5: 156–170.

32. Vuorimaa T, Ahotupa M, Irjala K, Vasankari T. Acute prolonged exercise reduces moderately oxidized LDL in healthy men. *Int J Sports Med.* 2005; 26: 420–425.
33. Wang JS, Lee L, Chow SE. Role of exercise intensities in oxidized low-density lipoprotein-mediated redox status of monocyte in men. *J Appl Physiol.* 2006; 101: 740–744.
34. de Moraes C, Davel APC, Rossoni LV, Antunes E, Zanesco A. 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.
35. Napoli C, Williams-Ignarro S, De Nigris F, Lerman LO, Rossi L, Guarino C, Mansueto G, Di Tuoro F, Pignalosa O, De Rosa G, Sica V, Ignarro LJ. Long-term combined beneficial effects of physical training and metabolic treatment on atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *PNAS* 2004, 101 (23): 8797–8802.
36. Chevion S, Moran DS, Heled Y, Shani Y, Regev G, Abbou B, Berenshtein E, Stadtman ER, Epstein Y. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *PNAS* 2003, 100 (9): 5119–5123.
37. DeSouza CA, Shapiro LF, Clevenger CM, Dinunno FA, Monahan KD, Tanaka H, Seals DR. Regular aerobic exercise prevents and restores age-related declines in endothelium-dependent vasodilation in healthy men. *Circulation.* 2000; 102:1351-1357.
38. Goto C, Higashi Y, Kimura M, Noma K, Hara K, Nakagawa K, Kawamura M, Chayama K, Yoshizumi M, Nara I. Effect of different intensities of exercise on endothelium-dependent vasodilation in humans role of endothelium-dependent nitric oxide and oxidative stress. *Circulation.* 2003;108:530-535.
39. Sun MW, Zhong MF, Gu J, Qian FL, Gu JZ, Chen H.. Effects of different levels of exercise volume on endothelium-dependent vasodilation: roles of nitric oxide synthase and heme oxygenase. *Hypertens Res.* 2008; 31: 805–816.

40. Sloan RP, Shapiro PA, Demeersman RE, McKinley PS, Tracey KJ, Slavov I, Fang Y, Flood PD. Aerobic exercise attenuates inducible TNF production in humans. *J Appl Physiol.* 2007; 103: 1007–1011.
41. Petersen SM, Pedersen, BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol.* 2005; 98: 1154-62.
42. Bruunsgaard H. Physical activity modulation of systemic low-level inflammation. *J Leukoc Biol.* 2005; 78: 819-835.
43. Keller C, Keller P, Giralt M, Hidalgo J, Pedersen BK. Exercise normalizes overexpression of TNF- α in knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 321:179–182.
44. Markovitch D, Tyrrell RM, Thompson D. Acute moderate-intensity exercise in middle-aged men has neither an anti- nor proinflammatory effect. *J Appl Physiol.* 2008; 105: 260–265.
45. Coppola A, Coppola L, dalla Mora L, Limongelli FM, Grassia A, Mastrolorenzo L, Gombos G, Lucivero G. Vigorous exercise acutely changes platelet and B-lymphocyte CD39 expression. *J Appl Physiol.* 2005; 98: 1414–1419.

CAPÍTULO 02: ARTIGO ORIGINAL

EFEITOS DO TREINAMENTO AERÓBIO DE INTENSIDADE LEVE E MODERADA NA ATEROSCLEROSE, PERFIL LIPÍDICO E PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CAMUNDONGOS LDLr^{-/-}.

Effects of low and moderate intensity aerobic training on atherosclerosis, lipid profile and oxidative stress parameters in LDLr^{-/-} mice.

RESUMO

As principais causas de morte no mundo ocidental são as doenças cardiovasculares e a aterosclerose é a sua principal manifestação. A oxidação da LDL (LDLox) representa um importante fator na aterogênese. O treinamento aeróbio tem demonstrado reduzir a progressão da aterosclerose em pacientes com doença arterial coronariana e em diversos modelos animais. Neste estudo investigamos os efeitos de 2 meses de exercício aeróbio em esteira, de intensidade leve (G2) ou moderada (G3) em relação ao controle sedentário (G1), na evolução da aterosclerose em camundongos *knockout* para o receptor de LDL (LDLr^{-/-}) previamente submetidos a 3 meses de dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica, avaliando os efeitos do colesterol total (CT), HDL-c e triglicerídeos (TG) séricos, os danos oxidativos (proteína carbonil e hidroperóxidos lipídicos), a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) no tecido hepático, e a composição corporal da carcaça. Os resultados mostraram que G2 (0,015±0,005 cm²) e G3 (0,014±0,001 cm²) apresentaram menor área de deposição lipídica aórtica em relação aos animais sedentários (G1) (0,039±0,005 cm²). Os grupos G2 e G3 apresentaram maiores valores de HDL-c, TG, maior atividade de CAT e menor peroxidação lipídica, carboniação protéica e percentual de gordura. A SOD apresentou maiores valores apenas em G3 e a GPx somente em G2. O treinamento aeróbio de baixa e moderada intensidade melhoram a aterosclerose.

ABSTRACT

The main causes of death in the Western world are cardiovascular disease and atherosclerosis is its main manifestation. The oxidation of LDL (LDL_{ox}) is an important factor in atherogenesis. The aerobic training has been shown to reduce progression of atherosclerosis in patients with coronary artery disease and in several animal models. We investigated the effects of 2 months of treadmill aerobic exercise, at light (G2) or moderate intensity (G3) in the development of atherosclerosis in LDL receptor knockout mice (LDLr^{-/-}) previously submitted to 3 months of high-fat high-cholesterol diet and assessing the effects of serum total cholesterol (TC), HDL-c and triglycerides (TG), oxidative damage (protein carbonyls and lipid hydroperoxides) and activity of antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) in liver tissue, and body composition of the carcass. The results showed that G2 ($0.015 \pm 0.005 \text{ cm}^2$) and G3 ($0.014 \pm 0.001 \text{ cm}^2$) had a lower aortic fat deposition area than sedentary animals (G1) ($0.039 \pm 0.005 \text{ cm}^2$). G2 and G3, had higher HDL-C, TG, levels, increased CAT activity, lower lipid peroxidation, carbonyl protein and fat percentage. SOD showed higher values only in G3 and GPx only in G2. Aerobic training of low and moderate intensity are able to improve atherosclerosis.

1 - INTRODUÇÃO

Uma variedade de características biológicas e comportamentais tem sido atribuída como desencadeadoras do desenvolvimento das doenças cardiovasculares (DCV)¹. Para uma pequena porcentagem da população, com alto risco genético, a hipercolesterolemia familiar causada por deficiência no receptor de LDL é a maior determinante do desenvolvimento precoce de DCV².

Nos eventos iniciais da aterogênese a lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDLox) é rapidamente internalizada e acumulada nos macrófagos, formando as células espumosas, que se depositam no espaço subendotelial³.

O controle do estado oxidativo e do metabolismo de lipoproteínas do organismo torna-se importante ferramenta no combate à aterosclerose. Os ácidos graxos poliinsaturados presentes na membrana celular podem ser um alvo das espécies reativas de oxigênio (ERO), desencadeando reações químicas denominadas peroxidação lipídica⁴. Além disso, o processo oxidativo nas células pode também envolver a oxidação de proteínas, que por sua vez podem estar intimamente relacionadas aos processos de envelhecimento e modificação de apoproteínas constituintes das lipoproteínas plasmáticas. Uma vez oxidadas, as proteínas tornam-se alvos de degradação por proteases endógenas³.

O exercício físico regular parece ser efetivo na redução do risco cardiovascular⁵⁻⁷. Especificamente, o exercício tem demonstrado reduzir a progressão da aterosclerose em pacientes com doença arterial coronariana⁸. De maneira similar, em diversos modelos animais, o exercício regular exerce um efeito benéfico no processo aterosclerótico⁹⁻¹². Desta forma, vários consensos e diretrizes de órgãos nacionais e internacionais recomendam um mínimo de 30 minutos de exercício aeróbio por dia, na maioria dos dias da semana, como sendo um elemento chave na redução da magnitude do risco cardiovascular.

Embora os benefícios do aumento no consumo máximo de oxigênio (VO₂ máx) sejam bem estabelecidos, um paradoxo bioquímico é verificado. O aumento no consumo de O₂ é essencial para aptidão cardiovascular e *performance*, porém o aumento no consumo durante ou após o exercício

pode ser prejudicial, quando é excedida a capacidade normal do indivíduo¹³.

O exercício físico intenso provoca um aumento de 10 a 20 vezes no consumo total de oxigênio do organismo e um aumento de 100 a 200 vezes na captação de oxigênio pelo tecido muscular, favorecendo o aumento na produção de EROs¹⁴. Entretanto, tem sido demonstrado que o treinamento de *endurance* aumenta as defesas antioxidantes, assim como a capacidade oxidativa do músculo¹⁵. Assim, a mensuração do estresse oxidativo (balanço entre danos oxidativos e defesas antioxidantes) é importante sinalizador do estado aterosclerótico em que se encontra o indivíduo.

O treinamento aeróbio leva à adaptações benéficas na aterosclerose, no estresse oxidativo e no perfil lipídico tanto em humanos quanto em animais⁸⁻¹². Entretanto, os estudos utilizam com maior frequência protocolos de intensidade moderada. Faltam estudos que demonstrem o benefício do treinamento aeróbio de baixa intensidade nesses parâmetros, bem como a comparação entre intensidade leve e moderada.

Sendo o objetivo deste estudo, verificar a influência do treinamento aeróbio nas intensidades leve e moderada na evolução da lesão aterosclerótica, perfil lipídico sérico, balanço oxidativo hepático e composição corporal em camundongos LDLr^{-/-}, previamente submetidos a dieta hiperlipídica.

2 - MATERIAL E MÉTODOS:

2.1 - Cuidados Éticos:

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com animais do Departamento de Veterinária/Universidade Federal de Viçosa (protocolo nº 46/2008) (ANEXO 1).

2.2 - Delineamento do estudo:

Camundongos C57/Bl/6J $LDLr^{-/-}$, machos (12 semanas de idade, $n = 29$, com peso inicial de $23,80 \pm 1,91g$) provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV, foram alimentados com dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica (colesterol = 1.5 g/kg de dieta; gordura total = 210 g/kg de dieta) durante 3 meses. Esta fase foi chamada de fase de indução da aterosclerose, segundo Ramachadran et al.¹². Após esta fase, os animais foram submetidos à dieta comercial normolipídica (colesterol = 0,002 g/kg de dieta; gordura total = 45 g/kg de dieta) durante 2 meses (fase de reabilitação) e divididos aleatoriamente em 3 grupos experimentais: sedentário (G1; $n=9$), exercício leve (G2; $n=10$) e exercício moderado (G3; $n=10$). O desenho experimental do estudo está representado na Figura 2.1

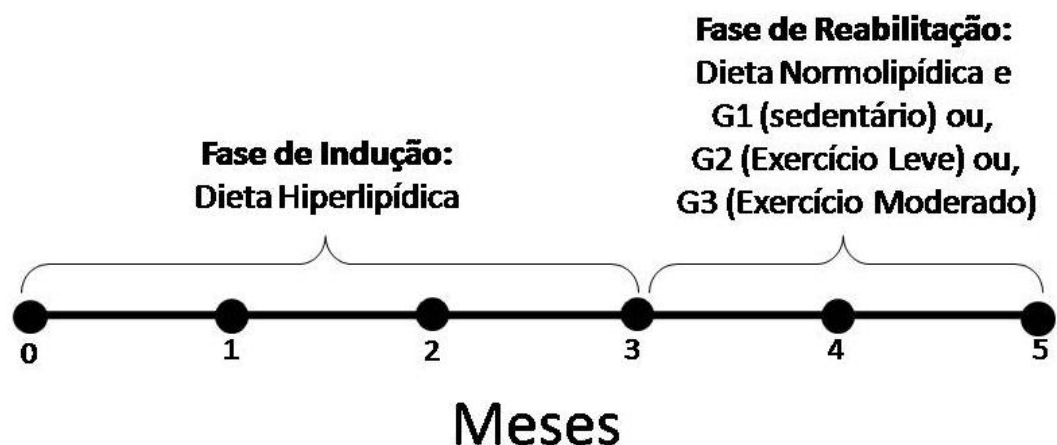


FIGURA 2.1: Desenho Experimental

2.3 - Protocolo do Exercício:

Os animais foram exercitados em esteira rolante própria para animais (Insight Equipamentos Científicos[®], Ribeirão Preto, Brasil) no biotério de experimentação animal da UFV.

Os animais do grupo G2 exercitaram 30 minutos por dia, 5 dias por semana, durante 8 semanas, em velocidade de esteira correspondente à intensidade leve¹⁶ de exercício conforme progressão demonstrada na Figura 2.2.

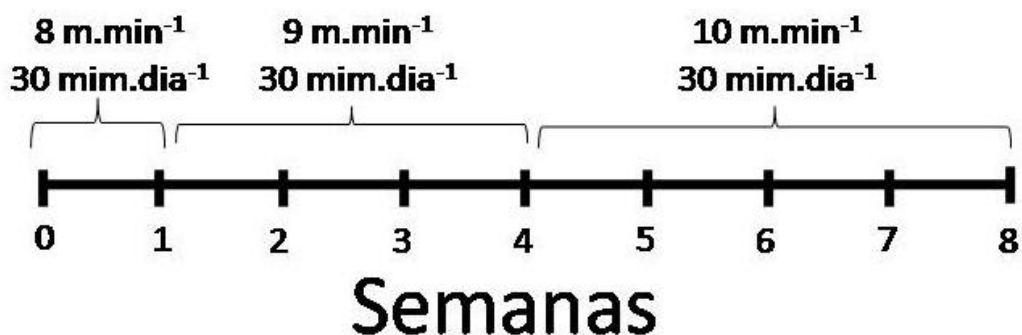


FIGURA 2.2: Progressão do Exercício G2

Os animais do grupo G3 exercitaram 30 minutos por dia, 5 dias por semana, durante 8 semanas, em velocidade de esteira correspondente à intensidade moderada¹⁶ de exercício conforme progressão demonstrada na Figura 2.3.

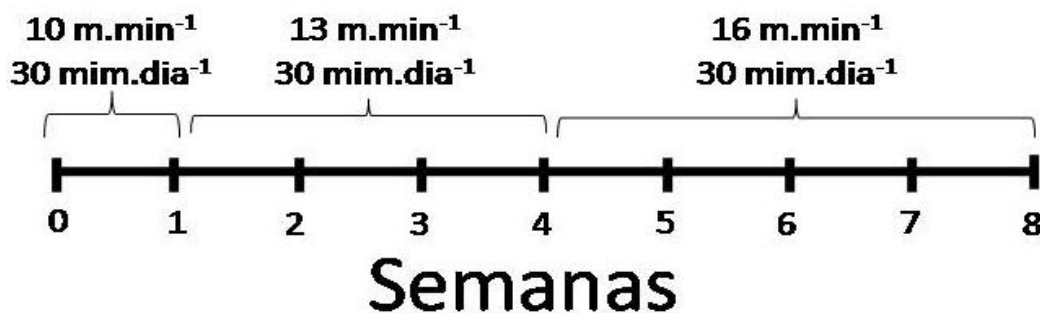


FIGURA 2.3: Progressão do Exercício G3

2.4 - Coleta dos tecidos

Os animais foram eutanasiados 48 horas após a última sessão de exercício. Fígado, aorta e a porção vermelha do músculo gastrocnêmio foram removidos cirurgicamente e imediatamente congelados em nitrogênio líquido para posteriores análises. O sangue foi removido por punção na aorta abdominal, imediatamente centrifugado a 3000rpm, por 10 minutos à 4°C. O soro foi retirado e armazenado à -20°C para posteriores análises.

2.5 - Avaliação da deposição lipídica das aortas

A deposição lipídica foi determinada no arco aórtico, nas aortas torácica e abdominal, utilizando a análise *en face* pela coloração Sudan IV¹⁷. As aortas foram dissecadas, removendo cuidadosamente toda a adventícia a partir da válvula aórtica até a bifurcação ilíaca. A aorta foi aberta longitudinalmente e fixada, durante 12 horas, na solução de formol-sacarose (4% paraformaldeído, 5% de sacarose, 20 µmol/L de BHT, e 2 µmol/L EDTA, pH 7,4) a 4°C. Após fixadas, as aortas foram colocadas em solução de etanol 70% durante cinco minutos. Posteriormente, foram coradas por 10 minutos sob agitação em uma solução filtrada contendo 0,5% de Sudan IV, 35% de etanol e 50% de acetona, sendo em seguida descoradas em solução de 80% de etanol, por cinco minutos. As aortas coradas com Sudan IV foram fotografadas utilizando câmera digital de resolução 8.1 megapixels, com função macro ativada e distância, zoom e luminosidade controlados. A análise foi feita através do programa Image-Pro Plus. Pixels foram convertidos em milímetros quadrados usando uma escala microscópica padrão nas mesmas condições em que aortas foram submetidas, de acordo com o software. A soma das áreas das lesões ateroscleróticas (local onde houve acúmulo lipídico) foi calculada pelo programa, sendo o resultado expresso em centímetros quadrados. Para garantir que não houvesse diferença entre os animais quanto ao tamanho total da aorta, esta área foi também mensurada.

2.6 - Composição corporal

Após a eutanásia descartaram-se as vísceras, restando apenas ossos, músculos e pele (carcaça vazia) para a análise quantitativa de água, gordura e proteína, conforme Pitts et al.¹⁸. Na determinação do conteúdo de água, as carcaças vazias foram colocadas individualmente em pratos de alumínio e introduzidas num secador a temperatura de 105°C por 24 horas. A água da carcaça foi calculada pela diferença do peso pré e pós-secagem. Após a secagem, as carcaças vazias foram maceradas e colocadas em cartuchos de papel filtro para a extração da gordura pelo método de Soxhlet durante oito horas, utilizando éter de petróleo como solvente. A percentagem de gordura foi determinada pela diferença do peso do cartucho contendo a carcaça pré e pós-desengordurada. O percentual de proteína foi calculado em triplicata pelo método indireto de determinação do nitrogênio, pelo método de Kjeldahl¹⁹, utilizando-se o fator 6,25 para conversão em proteína. As análises foram realizadas nos laboratórios do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa.

2.7 - Determinação das concentrações séricas de colesterol total, HDL e triglicerídeos

O colesterol total, HDL e triglicerídeos foram determinados utilizando-se Kits comerciais (Bioclin[®], Brasil) por método colorimétrico enzimático e analisador automático Cobas[®] pelo laboratório especializado em análises clínicas da Divisão de Saúde/UFV.

2.8 - Análises bioquímicas no tecido hepático dos animais

2.8.1 - Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada segundo Bannister e Calabrese²⁰. Basicamente, os tecidos foram homogeneizados em tampão glicina (50mmol.L⁻¹, pH 10,1) e atividade enzimática foi estimada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente (480nm).

2.8.2 - Catalase (CAT)

Para determinar a atividade da CAT a amostra dos tecidos foram sonicadas em tampão fosfato 50mmol.L^{-1} e a suspensão resultante foi centrifugada à $3000g$ à 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para mensuração da atividade enzimática. A atividade da CAT foi determinada pela taxa de decaimento do peróxido de hidrogênio (10 mmol.L^{-1}) lido em espectrofotômetro a 240nm , segundo metodologia de Aebi²¹.

2.8.3 - Glutathiona Peroxidase (GPx)

A determinação da atividade da Glutathiona Peroxidase foi feita a partir da taxa de decaimento da NADPH (coeficiente de extinção molar = 6220), determinada por espectrofotômetro (340nm) conforme descrito por Flohé²². Brevemente, a amostra dos tecidos foram sonicadas em tampão fosfato 50mmol.L^{-1} e a suspensão resultante foi centrifugada à $3000g$ à 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para leitura em espectrofotômetro utilizando glutathiona reduzida, glutathiona redutase e azida sódica.

2.8.4 - Hidroperóxidos Lipídicos

Foi detectado conforme metodologia de Jiang et al.²³. O Xilenol Orange, ao se ligar aos íons férrico, produz um cromóforo azul-arroxeadado com coeficiente de extinção de $1,5 \times 10^{-4}\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ à 560 nm . A concentração de hidroperóxidos pode ser estimada uma vez que o coeficiente de extinção dos hidroperóxidos é de $4,3 \times 10^{-4}\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ à 560 nm .

2.8.5 - Carbonilação de Proteínas

Os danos oxidativos em proteínas foram determinados pela determinação de grupos carbonil baseado na reação com dinitrofenilhidrazina metodologia de Levine et al.²⁴. Brevemente, as amostras de proteínas do fígado foram precipitadas pela adição de ácido tricloroacético 20% e reagidas com dinitrofenilhidrazina. As amostras foram redissolvidas em hidrócloro de guanidina e o conteúdo de carbonil foi

determinado espectrofotometricamente em 370nm usando um coeficiente de absorção molar de 22.0000 mol.L⁻¹.cm⁻¹.

2.9 - Análise da enzima Citrato Sintase (CS) do tecido muscular

Os tecidos (gastrocnêmio) foram pesados e homogeneizados com homogenizador de vidro no gelo em uma solução de Tris-HCl à 100 mmol.L⁻¹ à uma taxa peso/volume constante. O homogenato foi depois adicionado à um mix de reação contendo Tris-HCl à 100 mmol.L⁻¹, dithio-bis (ácido 2-nitrobenzóico) à 1,0 mmol.L⁻¹ e acetil coenzima A à 3,9 mmol.L⁻¹. Após a adição de oxalacetato à 1,0 mmol.L⁻¹, foi feita a leitura da absorvância à 412nm por um período de dois minutos. A absorvância média em variação.min⁻¹, foi registrada para cada amostra e a atividade de CS foi calculada utilizando um coeficiente de extinção de 13600 mol.L⁻¹.cm⁻¹ segundo a metodologia de Alp et al.²⁵.

2.10 - Determinação de proteínas

A quantidade de proteínas das análises de CAT, SOD, GPx, hidroperóxidos, carbonilação de proteínas e CS foram mensuradas pela metodologia de Lowry et al.²⁶.

2.11 - Análise estatística:

Para todas análises foi realizado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov utilizando-se posteriormente ANOVA one way e quando necessário o post hoc de Student-Newman-Keuls, adotando nível de significância de p<0,05. O software utilizado para as análises foi o SPSS versão 12.0 para Windows. Todos os dados foram apresentados em média ± erro padrão (EP).

3 - RESULTADOS:

3.1 - Área da lesão aterosclerótica aórtica:

Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos quando avaliada a área total da aorta. Havendo confirmação de que as aortas tinham a mesma área (Tabela 2.1), tornou-se possível a análise da área lesionada total.

Os animais dos grupos G2 ($0,015 \pm 0,005 \text{ cm}^2$) e G3 ($0,014 \pm 0,001 \text{ cm}^2$) apresentaram menor área lesionada total ($p < 0,05$) em relação aos do grupo G1 ($0,039 \pm 0,005 \text{ cm}^2$), conforme demonstrado nas Figuras 2.4 e 2.5. Além disso, os grupos G2 e G3 apresentaram menor ($p < 0,05$) percentual de área lesionada (área lesionada total/área total da aorta) conforme se verifica na Tabela 2.1.

TABELA 2.1: Área total da aorta e percentual de área lesionada

	G1	G2	G3
Área Total da Aorta (cm^2)	$0,46 \pm 0,02^a$	$0,46 \pm 0,03^a$	$0,47 \pm 0,03^a$
% de área lesionada	$8,58 \pm 1,35\%^a$	$3,25 \pm 0,91\%^b$	$3,19 \pm 0,67\%^b$

* Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$) para mesma linha.

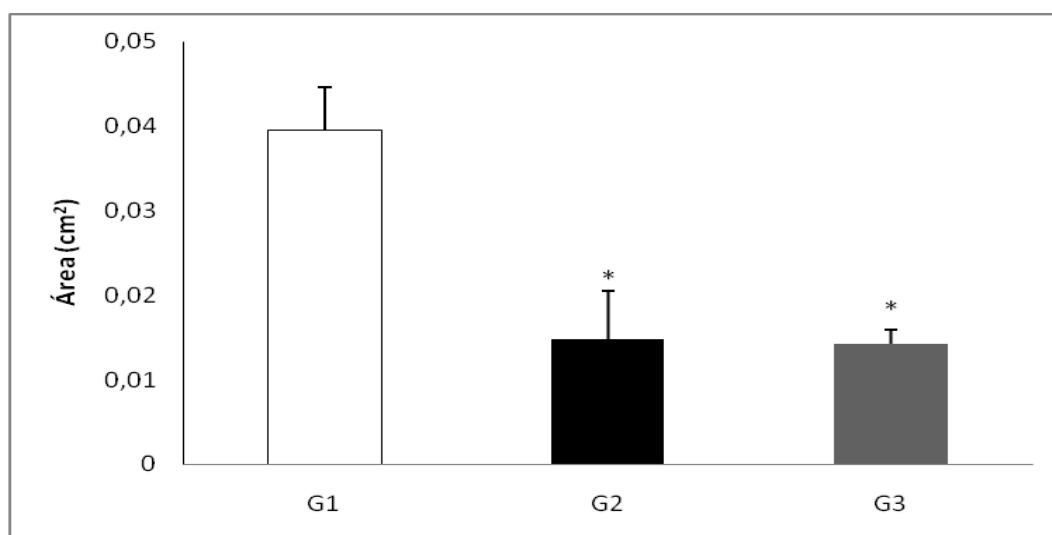


FIGURA 2.4: Área lesionada total das aortas. * $p < 0,0001$ em relação à G1.

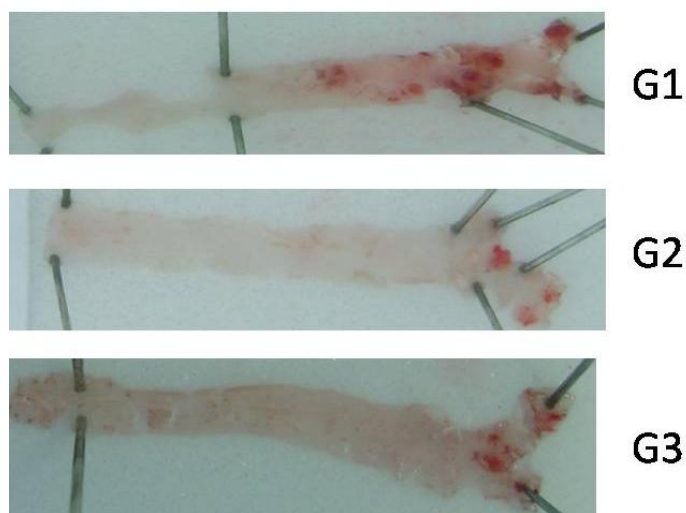


FIGURA 2.5 Representação da área lesionada da aorta.

3.2 - Composição corporal:

O resultados demonstraram redução significativa na gordura corporal nos animais dos grupos G2 e G3 em relação à G1. Para os outros componentes da composição corporal não houve diferença estatística. Os resultados estão descritos na Tabela 2.2.

TABELA 2.2: Composição percentual de água, gordura, proteínas e cinzas dos animais

	G1	G2	G3
% Água	63,22 ± 5,46 ^a	63,43 ± 3,42 ^a	65,59 ± 4,6 ^a
% Gordura	18,81 ± 2,17 ^a	10,82 ± 1,58 ^b	10,45 ± 0,91 ^b
% Proteína	16,39 ± 2,66 ^a	16,94 ± 1,91 ^a	16,18 ± 3,21 ^a
% Cinzas	6,81 ± 1,02 ^a	6,38 ± 1,23 ^a	6,09 ± 0,76 ^a

* Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$) para mesma linha.

3.3 - Lipídios séricos:

O CT não sofreu alterações entre os grupos, enquanto HDL e TG apresentaram maiores valores ($p < 0,05$) nos grupos G2 e G3 em relação a G1, conforme descrito na tabela 2.2.

TABELA 2.2: Valores de CT, HDL, TG

	G1	G2	G3
HDL-C (mg.dL ⁻¹)	60,5 ± 3,83 ^a	75,33 ± 4,76 ^b	69,33 ± 4,61 ^b
CT (mg.dL ⁻¹)	308,87 ± 22,75 ^a	318,44 ± 15,83 ^a	331,5 ± 25,77 ^a
Triglicerídeos (mg.dL ⁻¹)	141,25 ± 18,21 ^a	212,77 ± 19,74 ^b	183,3 ± 24,79 ^b

* Letras diferentes representam diferença estatística (p<0,05) para mesma linha.

3.4 - Atividade hepática das enzimas antioxidantes:

Com relação à SOD, o grupo G3 (1,33 ± 0,14 U.mg⁻¹ de proteína) demonstrou aumento significativo em relação à G2 (0,82 ± 0,04 U.mg⁻¹ de proteína) e G1 (0,62 ± 0,03 U.mg⁻¹ de proteína), conforme observado na Figura 2.6.

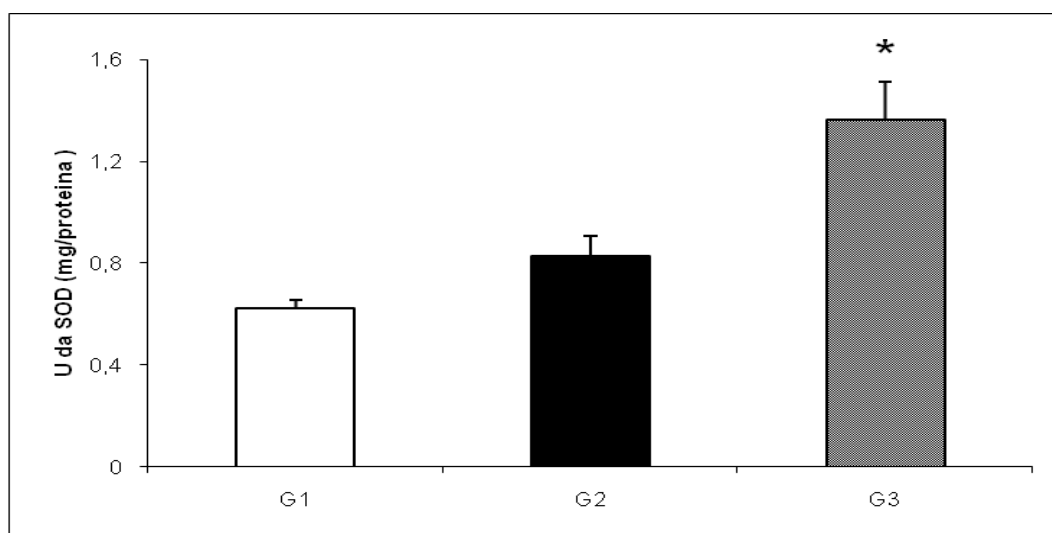


FIGURA 2.6: Atividade da enzima SOD. * p<0,05 em relação aos grupos G1 e G2.

A atividade da enzima catalase aumentou no grupo G2 (0,93 ± 0,05 U.mg⁻¹ de proteína) e G3 (0,90 ± 0,05 U.mg⁻¹ de proteína) em relação à G1 (0,65 ± 0,02 U.mg⁻¹ de proteína), conforme demonstrado na Figura 2.7.

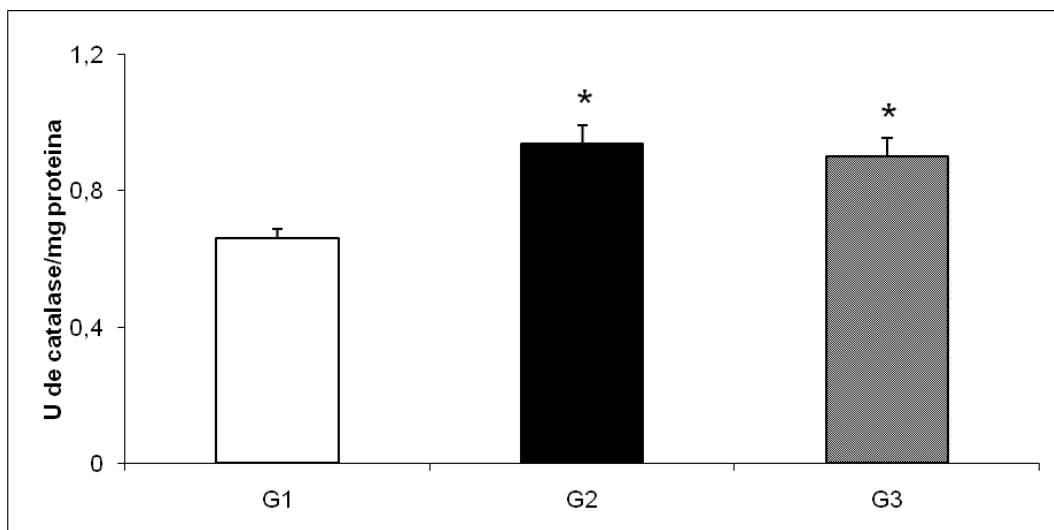


FIGURA 2.7: Atividade da enzima catalase. * $p < 0,05$ em relação a G1

Para atividade da GPx o grupo G2 ($0,20 \pm 0,03 \text{ uM} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína) demonstrou aumento significativo em relação à G3 ($0,12 \pm 0,008 \text{ uM} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína) e G1 ($0,09 \pm 0,01 \text{ uM} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína) conforme observado na Figura 2.8.

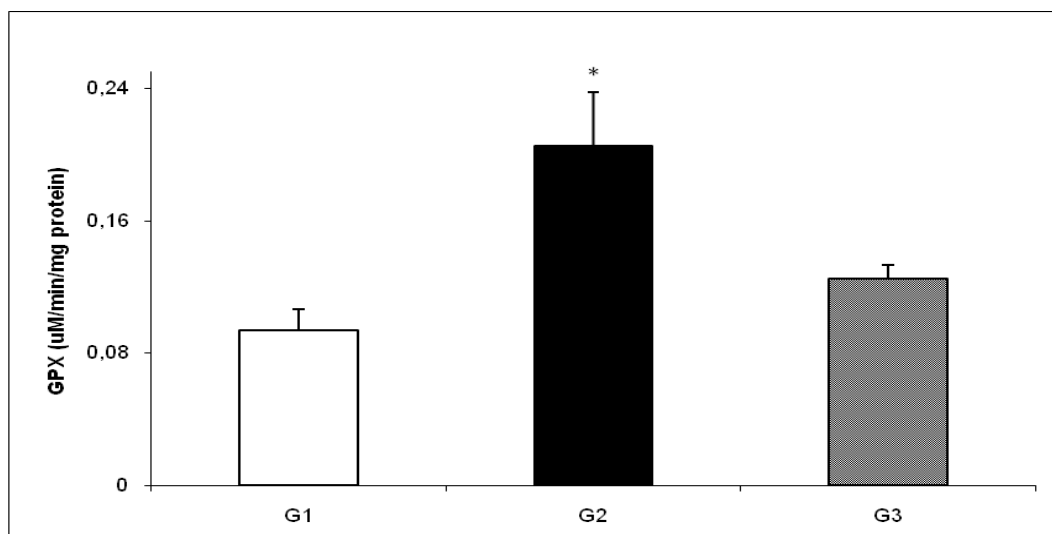


FIGURA 2.8: Atividade da enzima GPx * $p < 0,05$ em relação aos grupos G1 e G3.

3.5 - Peroxidação Lipídica e carboxilação de proteínas no fígado

Os resultados demonstraram um decréscimo na peroxidação lipídica hepática do grupo G2 ($0,55 \pm 0,02 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína) e G3 ($0,56 \pm 0,01$

nmol.mg⁻¹ de proteína) em relação à G1 (0,81 ± 0,10 nmol.mg⁻¹ de proteína), como pode ser visualizado na Figura 2.9.

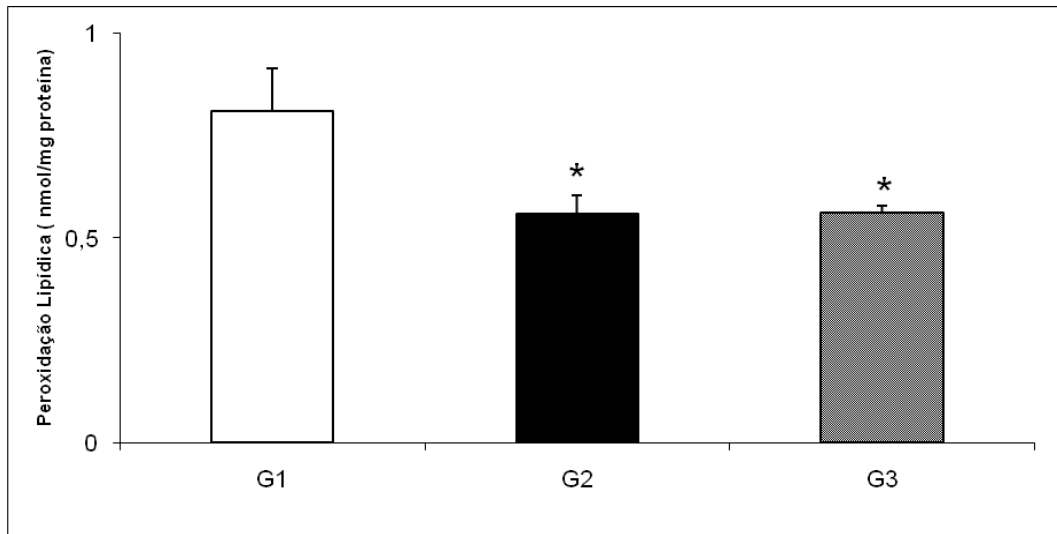


FIGURA 2.9: Hidroperóxidos lipídicos no tecido hepático. * → p < 0,05 em relação a G1

O mesmo ocorreu com a oxidação de proteínas no tecido hepático dos animais (G2 = 0,70 ± 0,19; G3 = 0,91 ± 0,17; G1= 1,59 ± 0,51 nmol.mg⁻¹ de proteína) como pode ser visualizado na Figura 2.10.

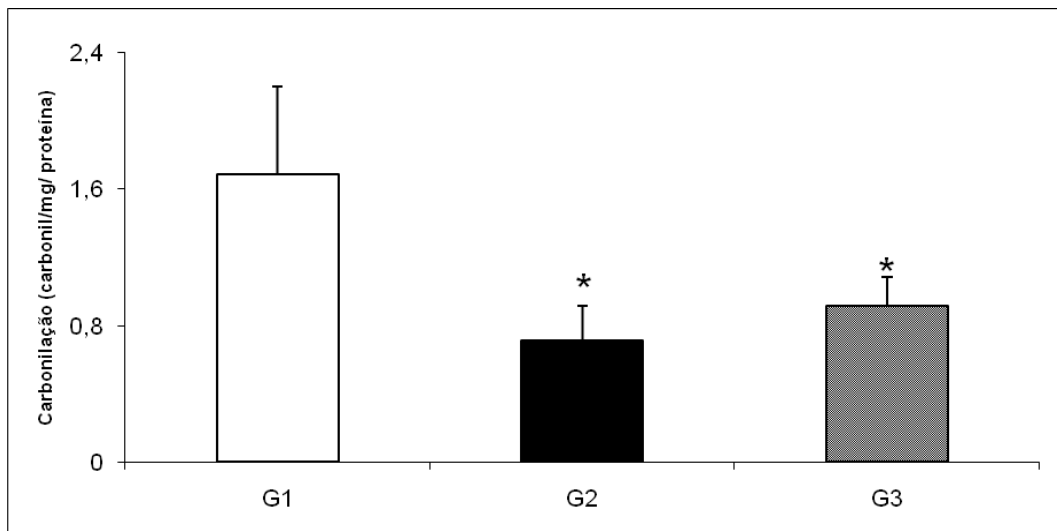


FIGURA 2.10: Carboxilação protéica no tecido hepático. * p<0,05 em relação a G1

3.6 - Atividade enzimática muscular de citrato sintase

A atividade da enzima CS aumentou no grupo G2 (23,61 ± 1,85 μmol.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína) em relação à G1 (16,87 ± 3,47 μmol.min⁻¹.mg⁻¹

de proteína) e, em G3 ($28,60 \pm 1,69 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína) em relação à G1 e G2, conforme demonstrado na Figura 2.11.

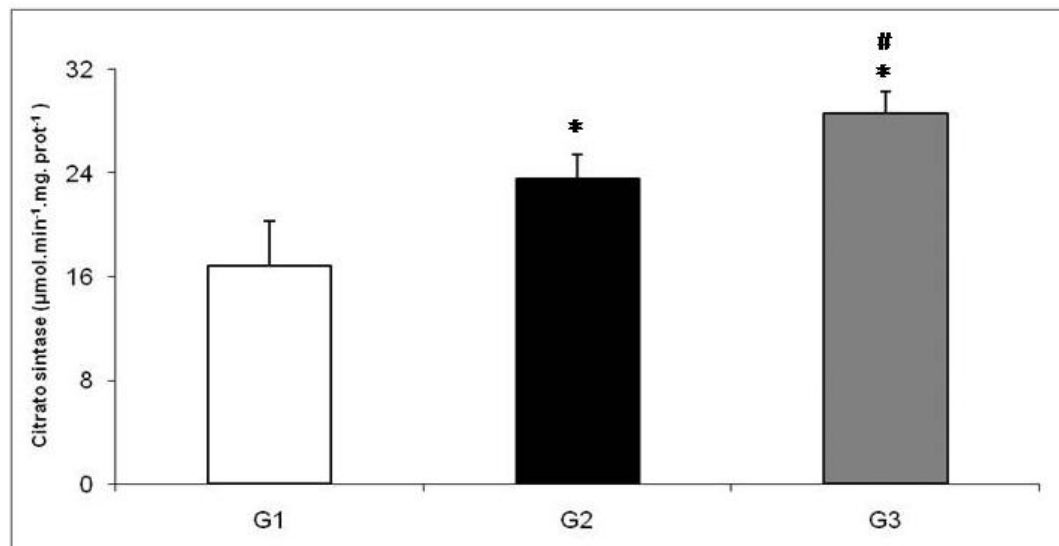


FIGURA 2.11: Atividade da enzima CS. * p<0,05 em relação a G1, # p<0,05 em relação a G2.

4 - DISCUSSÃO

Atividade de CS tem sido considerada indicador do efeito do treinamento aeróbio. Nossos resultados mostraram que ambos os protocolos foram efetivos para aumentar a atividade muscular de CS, sendo que o protocolo de intensidade moderada (G3) foi mais efetivo em provocar adaptações aeróbias que o protocolo de intensidade leve (G2). A atividade de CS é uma das enzimas chave na regulação do ciclo do ácido cítrico²⁷ e alguns estudos têm demonstrado aumento da atividade de CS na musculatura esquelética de ratos¹⁵ e camundongos^{28,29}. Esses resultados indicam que o treinamento aeróbio em esteira (G2 e G3) foi suficiente para aumentar a capacidade aeróbia e demonstram ainda que o treinamento de intensidade moderada (G3) é mais efetivo que o de intensidade leve (G2) para o aumento da capacidade aeróbia nos camundongos LDLr^{-/-}.

No presente estudo demonstramos que os animais que realizaram exercício leve apresentaram perfil da lesão aterosclerótica semelhante aos animais que realizaram exercício moderado e ambos os grupos exercitados apresentaram melhora em relação ao controle sedentário, após 3 meses de dieta de indução de aterosclerose em camundongos LDLr^{-/-}. Até o presente momento, este é o primeiro estudo a demonstrar que o exercício leve possui efeitos benéficos semelhantes ao moderado na evolução da lesão aterosclerótica neste modelo animal. Vários estudos demonstraram regressão ou menor grau de aterosclerose em animais experimentais propícios para o desenvolvimento da aterosclerose, principalmente em camundongos LDLr^{-/-} e ApoE^{-/-}, submetidos a exercícios aeróbios, tanto em esteira quanto em natação⁹⁻¹². Além disso, há evidências³⁰ da melhoria da evolução da aterosclerose em humanos submetidos a exercícios aeróbios, sendo que a maioria dos protocolos dos estudos acima utilizaram intensidades moderadas e não de intensidade leve como no nosso estudo.

Vários são os fatores que tem sido relacionados com aterosclerose, destacando-se dentre eles, distúrbios do metabolismo de lipoproteínas plasmáticas, aumentos sistêmicos da pressão arterial e angiotensina II⁹, níveis alterados de glicose sanguínea e aumento da resistência à insulina³¹, percentual de gordura corporal³², relaxamento vascular, fatores agregatórios

plaquetários, inflamatórios e o balanço oxidativo do organismo³. Neste trabalho, investigamos as mudanças decorrentes do metabolismo lipídico, do balanço oxidativo hepático e da composição corporal para elucidarmos alguns dos mecanismos relacionados com aterosclerose.

A fração do HDL-c aumentou nos grupos exercitados, fato que pode ter contribuído para diminuição da placa aterosclerótica já que o aumento dos níveis séricos desta proteína relaciona-se inversamente com o aparecimento da placa aterosclerótica³³. Segundo Kodama et al.³⁴, a variável que melhor explica o aumento do HDL-c é a duração do exercício, o que justifica a inexistência de diferença entre os grupos exercitados, já que G2 e G3 tiveram a duração do exercício igual. O HDL-c aumentado possui benefícios antioxidantes por ter em sua constituição a enzima antioxidante paraoxonase; antiinflamatório, inibindo as moléculas de adesão VCAM1 e ICAM1 e as citocinas pró-inflamatórias IL1 e IL8; antiagregante plaquetário, pró-fibrinolítico, e anticoagulante, pela inibição da ativação do fator X, da ativação plaquetária, e da secreção de plasminogênio tecidual (tPA) e de inibidor do plasminogênio (PAI)^{33,35,36}; e de proteção endotelial pela inibição da infiltração de LDLoxi e conseqüente proteção por estimular a vasodilatação^{37,38}.

O nosso estudo não foi demonstrado o efeito benéfico do exercício em relação ao CT e TG nos animais experimentais. Ramachadran et al.¹² encontraram resultados semelhantes em estudo com o mesmo modelo animal. Em animais experimentais Apo E^{-/-} a diminuição da lesão aterosclerótica houve sem mudanças do CT e TG séricos³⁹. O aumento nos níveis séricos de TG, pode ser explicado, pelo fato do exercício aumentar a necessidade da utilização de TG como fonte energética, o que pode ter aumentado os níveis séricos de VLDL, sendo esta provavelmente acumulada no soro pela diminuição do seu *clearance*, pois a meia vida desta lipoproteína, pode estar aumentada em até 30 vezes neste modelo em relação a animais selvagens⁴⁰, podendo ter contribuído para o aumento de TG nos grupos exercitados. Braz Jr et al.⁴¹ mostraram que o nível de CT e TG séricos exerce pouca ou nenhuma influência na deposição lipídica da artéria coronária em indivíduos com aterosclerose severa, justificando a redução da lesão aterosclerótica por outros fatores que não sejam a

diminuição do CT e TG, tais como inflamação, disfunção endotelial, estresse oxidativo e fatores genéticos. O mesmo pode ter acontecido com os animais de G2 e G3, cuja melhora evidenciada na deposição lipídica das aortas ocorreram sem mudanças no nível sérico de CT e TG.

Em relação à composição corporal, os grupos G2 e G3 apresentaram menores percentuais de gordura na carcaça em relação a G1. Sabe-se que exercício aeróbio pode levar a esta adaptação. De maneira semelhante ao nosso estudo, Gollisch et al.⁴² mostraram que 4 semanas de exercício aeróbio na roda voluntária foi capaz de reverter completamente o aumento do tecido adiposo subcutâneo e visceral provocado pela dieta hiperlipídica em ratos Sprague-Dawley. Adicionalmente, Bhattacharya et al.⁴³ mostraram o mesmo efeito do exercício aeróbio em esteira em camundongos Balb/C submetidos a 14 semanas de treinamento em esteira.

Tsitsilonis et al.³² demonstraram que o tecido adiposo subcutâneo, mensurado pela espessura mínima da camada subcutânea abdominal (Smin), correlacionou-se de maneira significativa com aterosclerose da artéria femoral, mensurada por sonografia em indivíduos obesos. Além disso, um estudo demonstrou que exercício aeróbio agudo aumentou a expressão de IL-6 (interleucina 6) e IL1-ra (receptor antagonista de interleucina 1) no tecido adiposo subcutâneo de ratos Sprague-Dawley⁴². Essas citocinas são essenciais no controle da inflamação crônica de baixa intensidade provocada pelo exercício, o que diminui a aterosclerose. Assim, os menores valores de percentual de gordura da carcaça, que é predominantemente a gordura subcutânea, apresentados por G2 e G3, podem ter contribuído para diminuição da aterosclerose.

Sendo o fígado considerado o maior órgão metabólico, responsável pela detoxificação de várias substâncias e os produtos metabólicos nocivos produzidos em outros órgãos podem indiretamente afetá-lo, avaliamos o balanço entre danos e defesas oxidativas neste órgão. O fígado apresenta conteúdo substancial de proteínas e enzimas com grande capacidade antioxidante^{44,45} e pode ser um dos principais locais para a oxidação da LDL pela citocromo P450⁴⁶. Assim, o balanço oxidativo do fígado é de fundamental importância para compreensão dos mecanismos da

aterosclerose e tem sido amplamente estudados em avaliações experimentais⁴⁷⁻⁴⁹.

Em relação à atividade enzimática hepática de SOD, somente animais do grupo G3 obtiveram aumento significativo em relação a G1. Silva et al.²⁹ mostraram em camundongos CF1, que o treinamento em esteira, em protocolo similar com o utilizado para G3, aumentou a atividade enzimática hepática da SOD.

A SOD exerce papel fundamental na contenção da aterosclerose, pois a superexpressão desta enzima juntamente com a catalase diminuiu a aterosclerose induzida por *Benzo(a)pyrene* em animais *knockout* para ApoE³⁹. O aumento da SOD pode diminuir a aterosclerose por meio de co-ativação do relaxamento vascular induzido por NO mediado por e-NOS, pois a dismutação do radical O_2^{\cdot} , aumenta a biodisponibilidade de NO nas células endoteliais, já que em presença do radical O_2^{\cdot} , o NO é desviado para formação do peróxido nitrito⁵⁰. Assim o aumento da atividade da SOD nos animais do grupo G3 pode ter aumentado o relaxamento vascular, contribuindo para diminuição da aterosclerose. Em nosso estudo somente G3 aumentou a atividade de SOD, o que pode ser explicado pelo fato de exercícios em maiores intensidades aumentarem o consumo de O_2 , estando este aumento intimamente ligado com maior produção de O_2^{\cdot} ¹⁴, os animais de G3 apresentaram maior atividade de CS em relação aos demais grupos, fato que pode indicar também, maior adaptação aeróbia e maior produção deste radical. Desta maneira, maior atividade de SOD pode ter acontecido para compensar produção aumentada deste radical em G3. Uma limitação deste estudo foi não ter mensurado o radical O_2^{\cdot} , o que poderia contribuir para explicação do comportamento da SOD do nosso experimento.

Os animais dos grupos exercitados tiveram maior atividade enzimática hepática de catalase em relação aos animais sedentários. Yin et al.⁵¹ demonstraram que co-expressão da catalase é importante para que não haja elevação da proliferação de células musculares lisas, induzidas pela LDL-ox, pois foi demonstrado, por estes autores, que a espécie reativa H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) aumenta a proliferação destas células, aumentando o processo aterosclerótico. Na presença da catalase esta proliferação não ocorreu, demonstrando a importância desta enzima para contenção do

processo aterosclerótico⁵¹. Além disso, em animais manipulados para a superexpressão de catalase houve diminuição da aterosclerose induzida por *Benzo(a)pyrene* em animais *knockout* para apo E³⁹. No nosso estudo, atividade enzimática de catalase aumentada pode ter contribuído para a diminuição da proliferação destas células, diminuindo assim a área de deposição lipídica nas aortas de G2 e G3. Outros experimentos também demonstram que o treinamento de baixa⁵² e moderada⁵³ intensidade são capazes de aumentar a atividade enzimática de catalase.

Em relação à GPx, somente o grupo G2 obteve melhora significativa em relação à G1. Outros estudos também mostram aumento da atividade de GPx em exercícios de baixa intensidade. A literatura científica carece de informações sobre o efeito treinamento de baixa intensidade na atividade hepática de GPx. Porém alguns estudos demonstram o efeito do treinamento de baixa intensidade em outros tecidos, Faist et al.⁵⁴ mostraram aumento da atividade mitocondrial de GPx do tecido muscular após 6 semanas de treinamento de baixa intensidade (2 vezes de 30 min.dia⁻¹; velocidade de 8,3m/min, durante 6 semanas) em camundongos DMX. Já Kaczor et al.⁵², no mesmo modelo animal, mostraram que o treinamento em esteira de baixa intensidade (2 vezes por semana, 30min.dia⁻¹ à uma velocidade de 9m/min) foi eficaz para aumentar o conteúdo protéico de GPx nas fibras musculares brancas.

Lewis et al. demonstraram a importância da GPx na prevenção e contenção da aterosclerose já que camundongos manipulados para não expressarem GPx aumentaram o processo de aterosclerose em relação aos camundongos controle e, a não expressão de GPx foi relacionada com aumento de moléculas pró-inflamatórias tais como VCAM e aumento de macrófagos pró-inflamatórios⁵⁵. Além disso, camundongos ApoE^{-/-} manipulados para superexpressão de GPx, diminuíram a evolução da aterosclerose, sendo essa redução justificada pela diminuição da peroxidação lipídica na parede arterial e diminuição da expressão das proteínas das moléculas de adesão VCAM e ICAM na aorta dos animais⁵⁶. Adicionalmente, a administração de diphenyl diselenide (PhSe)₂, um composto organoselênico, que imita a ação da GPx, inibiu a formação de LDLox humana *in vitro*⁵⁷, sugerindo um efeito protetor da GPx contra a

aterosclerose. Assim, o aumento da atividade enzimática de GPx observado em G2 pode ter contribuído para redução da aterosclerose nesses animais.

Em conjunto as enzimas antioxidantes exercem papel fundamental na contenção da aterosclerose. Interessantemente no nosso estudo, os animais de G2 demonstraram aumento na atividade hepática CAT e GPx sem ter aumentado a atividade da SOD. Sabendo que a SOD é a primeira linha de defesa do organismo no combate dos radicais livres, algum outro mecanismo pode ter explicado o aumento de CAT e GPx. Neste estudo, mensuramos apenas a atividade total da SOD, sem mensurar as atividades específicas das isoenzimas da SOD. Ravi Kiran et al.⁵⁸ mostraram que a atividade cardíaca da isoenzima Mn-SOD (SOD manganês), aumentou após treinamento de natação em baixa intensidade, o mesmo pode ter ocorrido nos animais de G2, sendo uma limitação deste estudo não ter mensurado as isoenzimas da SOD.

Os animais dos grupos G2 e G3 apresentaram menores valores de peroxidação lipídica e conteúdo de proteína carbonil quando comparados com G1. Em corroboração com os nossos resultados, Teixeira et al.⁵⁹ mostraram menores níveis de peroxidação lipídica avaliada pela metodologia de TBARS no fígado de ratos após 12 semanas de treinamento em natação. Silva et al.²⁹ demonstraram também queda na peroxidação lipídica pela mesma metodologia e na carboxilação de proteínas em camundongos CF1, após 8 semanas de treinamento, em diferentes modelos de exercício.

Sabe-se que o aumento da peroxidação lipídica pode ser consequência do estresse oxidativo e que a aterosclerose pode modificar as propriedades físicas das membranas celulares, o que pode facilitar o escape dos radicais livres da cadeia transportadora de elétrons⁶⁰. A peroxidação lipídica pode modificar covalentemente os resíduos dos amino-grupos de lisina, o que pode gerar a formação de LDL-ox, e o excesso de hidroperóxidos pode levar à modificação da estrutura protéica da ApoB, fato que contribui para o reconhecimento das LDL-ox pelos macrófagos formando-se então as células espumosas³. As ERO do fígado podem modificar os aminoácidos através de uma cadeia de reações pela agregação de proteínas susceptíveis à degradação proteolítica¹⁵. A redução da carbonilação de proteínas é importante indicador da redução da

de dano oxidativo. Assim, a diminuição dos hidroperóxidos lipídicos e do conteúdo de proteína carbonil nos grupos exercitados pode ter ajudado na contenção da aterosclerose como evidenciado nesses grupos. O aumento da atividade das enzimas antioxidantes observado neste estudo pode ter contribuído para a diminuição dos hidroperóxidos e da peroxidação protéica observadas em G2 e G3.

Uma possível explicação para os efeitos da redução do estresse oxidativo, comportamento do metabolismo lipídico e redução da aterosclerose nos grupos G2 e G3 é a ativação do receptor nuclear hepático LXR. Este receptor é responsável pela remoção de derivados de colesterol oxidados. A ativação do LXR tem sido relacionada com a diminuição da aterosclerose por diminuição da proliferação de células musculares lisas⁶¹, supressão da expressão gênica de fatores inflamatórios como TNF α , IL1b, MCP1, ICAM e MMP-9⁶⁰, todos envolvidos na aterosclerose, e inibição do fator tecidual⁶³. Sabendo-se que a diminuição do estresse oxidativo⁶² e o exercício físico⁶⁴ são dois fatores que ativam a expressão gênica de LXR, os animais de G2 e G3 podem ter ativado esse receptor, o que pode ter sido uma possível explicação para a diminuição da lesão aterosclerótica. Além disso, a ativação exógena de LXR hepático em camundongos LDLr^{-/-}, associou-se com aumento de VLDL e TG⁶⁵ pela diminuição do *clearance* de VLDL que este modelo possui, o que também aconteceu em nosso estudo. Assim, a possível ativação de LXR no tecido hepático dos animais de G2 e G3 pode ter contribuído para os efeitos observados neste estudo, o que indica mais pesquisas levando-se em conta a mensuração da expressão protéica ou gênica deste fator nuclear.

5 - CONCLUSÃO

Em conclusão, o exercício físico aeróbio de intensidade leve e moderada apresentou menores valores de lesão aterosclerótica e este resultado foi acompanhado com melhora no HDL sérico, no balanço oxidativo hepático e da diminuição do percentual de gordura da carcaça, sem alterações no nível de CT sérico.

6 - REFERÊNCIAS

1. Haskell WL. Cardiovascular disease prevention and lifestyle interventions—effectiveness and efficacy. *J Cardiovasc Nurs* 2003;18:245–55.
2. Kolansky DM, Cuchel M, Clark BJ, Paridon S, McCrindle BW, Wiegers SE, Araujo L, Vohra Y, Defesche JC, Wilson JM, Rader DJ. Longitudinal evaluation and assessment of cardiovascular disease in patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol.* 2008 1;102(11):1438-43.
3. Parthasarathy S, Litvinov D, Selvarajan K, Garelnabi M. Lipid peroxidation and decomposition--conflicting roles in plaque vulnerability and stability. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1781(5):221-31.
4. Shao B, Heinecke JW. HDL, lipid peroxidation, and atherosclerosis. *J Lipid Res* 2009; 50(4):599-601.
5. Bassuk SS, Manson JE. Epidemiological evidence for the role of physical activity in reducing risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease. *J Appl Physiol.* 2005;99:1193–1204.
6. Gaesser GA. Exercise for prevention and treatment of cardiovascular disease, type 2 diabetes, and metabolic syndrome. *Curr Diab Rep.* 2007; 71:14 –19.
7. Thompson PD, Buchner D, Pina IL, Balady GJ, Williams MA, Marcus BH, Berra K, Blair SN, Costa F, Franklin B, Fletcher GF, Gordon NF, Pate RR, Rodriguez BL, Yancey AK, Wenger NK. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: a statement from the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention) and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity). *Circulation.* 2003;107:3109 –3116.
8. Niebauer J, Hambrecht R, Velich T, Hauer K, Marburger C, Kalberer B, Weiss C, von HE, Schlierf G, Schuler G, Zimmermann R, Kubler W. Attenuated progression of coronary artery disease after 6 years of multifactorial risk intervention: role of physical exercise. *Circulation.* 1997; 96:2534 –2541.

9. Pellegrin M, Alonso F, Aubert JF, Bouzourene K, Braunersreuther V, Mach F, Haefliger JA, Hayoz D, Berthelot A, Nussberger J, Laurant P, Mazzolai L. Swimming prevents vulnerable atherosclerotic plaque development in hypertensive 2-kidney, 1-clip mice by modulating angiotensin II type 1 receptor expression independently from hemodynamic changes. *Hypertension* 2009; 53(5):782-9.
10. Shimada K, Kishimoto C, Okabe TA, Hattori M, Murayama T, Yokode M, Kita T. Exercise training reduces severity of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice via nitric oxide. *Circ J.* 2007; 71: 1147–1151.
11. Napoli C, Williams-Ignarro S, de Nigris F, Lerman LO, D'Armiento FP, Crimi E, Byrns RE, Casamassimi A, Lanza A, Gombos F, Sica V, Ignarro LJ. Physical training and metabolic supplementation reduce spontaneous atherosclerotic plaque rupture and prolong survival in hypercholesterolemic mice. *PNAS.* 2006; 103 (27): 10479–10484.
12. 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.
13. Jenkins RR: Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Med:* 5: 156–170, 1988
14. Chakraborti T, Ghosh SK, Michael JR, Batabyal SK, Chakraborti S: Targets of oxidative stress in cardiovascular system. *Mol Cell Biochem.* 187: 1–10, 1998.
15. Pinho, R.A., Andrades, M.E., Oliveira, M.R., Pirola, A.C., Zago, M.S., Silveira, P.C.. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biol Int* 2006; 30: 848–853.
16. Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007; 14(6):753-60.
17. Palinski W, Ord VA, Plump AS, Breslow JL, Steinberg D, Witztum JL. ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions

- and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arterioscler Thromb* 1994; 14(4):605-16.
18. Pitts GC, Ushakov AS, Pace N, Smith AH, Rahlmann DF, Smirnova TA. Effects of weightlessness on body composition in the rat. *Am J Physiol* 1983; 244(3):R332-7.
 19. AOAC – Association of Official Analytical Chemists Official methods of analysis. Washington, D.C.; 1998.
 20. Bannister JV, Calabrese L. Assays for SOD. *Methods Biochem. Anal* 1987; 32: 279–312.
 21. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-6.
 22. Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984; 105:114-21.
 23. Jiang Y, Woollard ACS, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xilenol orange. Comparison with the TBA assay and an Iodometric method *Lipids* 1991; 26:853-856.
 24. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol* 1990; 186: 464-478.
 25. Alp PR, Newsholme EA, Zammit VA. Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochem J* 1976; 154(3):689-700.
 26. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RH. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1):265-75.
 27. Siu PM, Donley DA, Bryner RW, Alway SE. Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. *J Appl Physiol* 2003; 94(2):555-60.
 28. Aguiar AS Jr, Tuon T, Pinho CA, Silva LA, Andreatza AC, Kapczinski F, Quevedo J, Streck EL, Pinho RA. Intense exercise induces mitochondrial dysfunction in mice brain. *Neurochem Res* 2008 33(1):51-8.

29. Silva LA, Pinho CA, Rocha LG, Tuon T, Silveira PC, Pinho RA. Effect of different models of physical exercise on oxidative stress markers in mouse liver. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2009; 34(1):60-5.
30. Rauramaa R, Halonen P, Väisänen SB, Lakka TA, Schmidt-Trucksäss A, Berg A, Penttilä IM, Rankinen T, Bouchard C. Effects of Aerobic Physical Exercise on Inflammation and Atherosclerosis in Men: The DNASCO Study. *Ann Intern Med* 2004; 140: 1007-1014.
31. Duncan ER, Walker JS, Ezzat VA, Wheatcroft SB, Li J-M, Shah AM, Kearney MT. Accelerated endothelial dysfunction in mild prediabetic insulin resistance: the early role of reactive oxygen species. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: e1311–e1319.
32. Tsitsilonis S, Vlachos IS, Bampali A, Revenas K, Votteas V, Perrea DN. Sonographic measurements of subcutaneous fat in obese individuals may correlate better with peripheral artery disease indices. *J Clin Ultrasound* 2009; 37(5):263-9.
33. Nofer JR, Kehrel B, Fobker M, Levkau B, Assmann G, von Eckardstein A. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 2002; 161:1-16.
34. Kodama S, Tanaka S, Saito K, Shu M, Sone Y, Onitake F, Suzuki E, Shimano H, Yamamoto S, Kondo K, Ohashi Y, Yamada N, Sone H. Effect of aerobic exercise training on serum levels of high-density lipoprotein cholesterol: a meta-analysis. *Arch Intern Med* 2007; 167(10):999-1008.
35. Assmann G, Gotto AM. HDL-cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation* 2004;109:III8-14.
36. Rosenson RS, Loewe GD. Effects of lipids and lipoproteins on thrombosis and rheology. *Atherosclerosis* 1998;140:271-80.
37. Rämetsä ME, Rämetsä M, Lu Q, Nickerson M, Savolainen MJ, Malzone A, Karas RH. High-density lipoprotein increase the abundance of eNOS protein in human vascular endothelial cells by increasing its half-life. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41:2288-97.
38. Kuvini JT, Patel AR, Sidhu M, Rand WM, Sliney KA, Pandian NG, Karas RH. Relation between high-density lipoprotein cholesterol and peripheral vasomotor function. *Am J Cardiol* 2003; 92:275-9.

39. Yang H, Zhou L, Wang Z, Roberts LJ, Lin X, Zhao Y, Guo, Z. Overexpression of antioxidant enzymes in ApoE-deficient mice suppresses Benzo(a)pyrene-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2009 (epub ahead of print).
40. 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(2):883-93.
41. Braz Jr DJ, Gutierrez PS, da Luz PL. Coronary fat content evaluated by morphometry in patients with severe atherosclerosis has no relation with serum lipid levels. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40(4): 467-473.
42. Gollisch KS, Brandauer J, Jessen N, Toyoda T, Nayer A, Hirshman MF, Goodyear LJ. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 297(2):E495-504.
43. Bhattacharya A, Rahman MM, Sun D, Lawrence R, Mejia W, McCarter R, O'Shea M, Fernandes G. The combination of dietary conjugated linoleic acid and treadmill exercise lowers gain in body fat mass and enhances lean body mass in high fat-fed male Balb/C mice. *J Nutr* 2005; 135(5):1124-30.
44. Ji LL. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med. Sci. Sports Exerc* 1993; 25: 225–231.
45. Burneik, RC, Diniz YS, Galhardi CM, Rodrigues HG, Ebaid GM, Faine LA. Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. *Food Chem. Toxicol* 2006. 44: 1167–1172.
46. Aviram M, Kent UM, Hollenberg PF. Microsomal cytochromes P450 catalyze the oxidation of low density lipoprotein. *Atherosclerosis*. 1999; 143(2):253-60.
47. Ramirez-Tortosa MC, Granados S, Ramirez-Tortosa CL, Ochoa JJ, Camacho P, García-Valdés L, Battino M, Quiles JL. Oxidative stress status in liver mitochondria and lymphocyte DNA damage of atherosclerotic rabbits supplemented with water soluble coenzyme Q10. *Biofactors* 2008; 32(1-4):263-73.

48. Décordé K, Ventura E, Lacan D, Ramos J, Cristol JP, Rouanet JM. An SOD rich melon extract Extramel((R)) prevents aortic lipids and liver steatosis in diet-induced model of atherosclerosis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009 Aug 18. [Epub ahead of print].
49. Ishigaki Y, Katagiri H, Gao J, Yamada T, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Kaneko K, Ogihara T, Ishihara H, Sato Y, Takikawa K, Nishimichi N, Matsuda H, Sawamura T, Oka Y. Impact of plasma oxidized low-density lipoprotein removal on atherosclerosis. *Circulation* 2008; 118(1):75-83.
50. Asif AR, Hecker M, Cattaruzza M. Disinhibition of SOD-2 Expression to Compensate for a Genetically Determined NO Deficit in Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29 (epub ahead of print).
51. Yin C-C, Huang KT, H₂O₂ but not O₂⁻ elevated by oxidized LDL enhances human aortic smooth muscle cell proliferation. *Journal of Biomedical Science* 2007; 14:245–254.
52. Kaczor JJ, Hall JE, Payne E, Tarnopolsky MA. Low intensity training decreases markers of oxidative stress in skeletal muscle of mdx mice. *Free Radical Biology & Medicine* 2007; 43: 145–154.
53. Meilhac O, Ramachandran S, Chiang K, Santanam N, Parthasarathy S. Role of Arterial Wall Antioxidant Defense in Beneficial Effects of Exercise on Atherosclerosis in Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001;21;1681-1688.
54. Faist V, König J, Höger H, Elmadf I. Decreased Mitochondrial Oxygen Consumption and Antioxidant Enzyme Activities in Skeletal Muscle of Dystrophic Mice after Low-Intensity Exercise. *Ann Nutr Metab* 2001;45:58–66.
55. Lewis P, Stefanovic P, Pete J, Calkin AC, Giunti S, Thallas-Bonke V, Jandeleit-Dahm KA, Allen TJ, Kola I, Cooper ME, de Haan JB. Lack of the Antioxidant Enzyme Glutathione Peroxidase-1 Accelerates Atherosclerosis in Diabetic Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Circulation* 2007; 115: 2178-2187.
56. Guo Z, Ran Q, Roberts LJ, Zhou L, Richardson A, Sharan C, Wu U, Yang H. Suppression of Atherogenesis by Overexpression of

- Glutathione Peroxidase-4 in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Free Radic Biol Med* 2008; 44(3): 343–352.
57. de Bem AF, Farina M, Portella RL, Nogueira CW, Dinis TCP, Laranjinha JAN, Almeida LM, Rocha JBT. Diphenyl diselenide, a simple glutathione peroxidase mimetic, inhibits human LDL oxidation in vitro. *Atherosclerosis* 201; 2008: 92–100
58. Ravi Kiran T, Subramanyam MV, Asha Devi S. Swim exercise training and adaptations in the antioxidant defense system of myocardium of old rats: relationship to swim intensity and duration. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2004; 137(2):187-96.
59. Teixeira A, Müller L, dos Santos AA, Reckziegel P, Emanuelli T, Rocha JB, Bürger ME. Beneficial effects of gradual intense exercise in tissues of rats fed with a diet deficient in vitamins and minerals: a pilot study. *Nutrition* 2009; 25(5):590-6.
60. Yang RL, Shi YH, Hao G, Li W, Le GW. Increasing Oxidative Stress with Progressive Hyperlipidemia in Human: Relation between Malondialdehyde and Atherogenic Index. *J Clin Biochem Nutr* 2008; 43(3):154-8.
61. Blaschke F, Leppanen O, Takata Y, Caglayan E., Liu J., Fishbein M.C., Kappert K., Nakayama K.I., Collins A.R., Fleck E., Hsueh W.A., Law R.E., Bruemmer D.: Liver X receptor agonists suppress vascular smooth muscle cell proliferation and inhibit neointima formation in balloon-injured rat carotid arteries. *Circ Res* 2004; 95: e110–e123.
62. Jamroz-Wiśniewska A, Wójcicka G, Horoszewicz K, Bełtowski J. Liver X receptors (LXRs). Part II: non-lipid effects, role in pathology, and therapeutic implications. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2007; 61:760-85.
63. Terasaka N., Hiroshima A., Koieyama T., Ubukata N., Morikawa Y., Nakai D., Inaba T.: T-0901317, a synthetic liver X receptor ligand, inhibits development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *FEBS Lett.*, 2003; 536: 6–11
64. Butcher LR, Thomas A, Backx K, Roberts A, Webb R, Morris K. Low-intensity exercise exerts beneficial effects on plasma lipids via PPARgamma. *Med Sci Sports Exerc.* 2008 Jul;40(7):1263-70.

65. Peng D, Hiipakka RA, Xie JT, Reardon CA, Getz GS, Liao S. Differential effects of activation of liver X receptor on plasma lipid homeostasis in wild-type and lipoprotein clearance-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2009 Jul 8. [Epub ahead of print].

CONSIDERAÇÕES FINAIS GERAIS

A discussão sobre a intensidade do exercício aeróbio ideal para prevenir a aterosclerose ainda permanece em dúvida. Porém, para o tratamento da lesão aterosclerótica observamos que no modelo animal utilizado, tanto o exercício de baixa quanto de moderada intensidade, foi efetivo e apresentando menores área de lesão e menor porcentagem de área lesionada. Essa redução foi relacionada com o aumento da HDL-c sérica, melhora do balanço oxidativo hepático e diminuição do percentual de gordura corporal.

São necessários, porém, estudos que investiguem exercícios de alta intensidade no tratamento e prevenção da aterosclerose e ainda, estudos que investiguem os mecanismos moleculares de como o exercício estimula menores áreas de lesão aterosclerótica.