Paula Ramos Pinto

**Treinamento físico aeróbio em camundongos selvagens e
transgênicos para CETP não altera a remoção de colesterol
celular e a expressão de genes envolvidos no fluxo de lípidos
em macrófagos e arco aórtico**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Dra. Marisa Passarelli

São Paulo

2015

Paula Ramos Pinto

**Treinamento físico aeróbio em camundongos selvagens e
transgênicos para CETP não altera a remoção de colesterol
celular e a expressão de genes envolvidos no fluxo de lípidos
em macrófagos e arco aórtico**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Dra. Marisa Passarelli

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Pinto, Paula Ramos

Treinamento físico aeróbio em camundongos selvagens e transgênicos para CEPT não altera a remoção de colesterol celular e a expressão de genes envolvidos no fluxo de lípidos em macrófagos e arco aórtico / Paula Ramos Pinto. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Endocrinologia.

Orientador: Marisa Passarelli.

Descritores: 1.Exercício 2.Aterosclerose 3.Colesterol 4.Lipoproteínas
5.Macrófagos

USP/FM/DBD-158/15

Este estudo foi realizado no Laboratório de Lípidos (LIM10) do Departamento de Clínica Médica, Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Bolsa de Mestrado processo: 2011/15153-1

DEDICATÓRIA

À Heloisa, minha mãe, amiga e porto seguro.

À minha irmã Márcia e meu namorado Rafael.

AGRACEDIMENTOS

Primeiramente, ao Dr. Raphael Souza Pinto, por abrir as portas do laboratório para mim, quando o desejo de desenvolver um projeto de mestrado parecia distante de se tornar realidade. Agradeço também por todo carinho, ensinamento, ajuda e atenção.

À Dra. Marisa Passarelli, imensamente, por me ajudar ao enveredar pelos caminhos da pós-graduação, tornando possível esta grande realização. Obrigada pela sua clareza e maturidade nos momentos de decisão; pela paciência em me ensinar a fazer pesquisa; por dividir com seus alunos entusiasmo e empolgação ao falar de novas ideias e; pelas engraçadas conversas sobre escalas de fofura e jovialidade. Minha admiração e respeito ao seu profissionalismo e amor a pesquisa serão eternos.

Ao Dr. Sergio Catanozi, confesso ser difícil encontrar palavras para agradecer todo carinho e incansável dedicação ao meu projeto. Obrigada por acompanhar de perto todos os dilemas que passei na pós-graduação, por não deixar nada por falar, tanto na hora de fazer advertências como na hora de reconhecer meu trabalho e esforço; pela paciência nos momentos em que meu equilíbrio emocional estava abalado. E o mais importante, obrigada pela amizade e as brincadeiras do dia-a-dia.

Ao Prof. Dr. Eder Quintão, pela honra de dividir comigo seus conhecimentos; por nos inspirar todos os dias e nos incentivar a olhar de forma diferente ao que parece óbvio.

À Dra. Edna Nakandakare, por estar sempre presente para auxiliar e tirar nossas dúvidas; por chefiar com carinho e dedicação e, principalmente, por fazer do LIM-10 uma família.

À Dra. Valeria Nunes por ser sempre solícita e sempre arranjar um tempo para me ajudar e tirar dúvidas; pela companhia nos cafés da tarde, que levaram às conversas produtivas sobre a pesquisa e também a vida e, por enriquecer o laboratório com sua experiência e conhecimento.

À Dra. Patrícia Cazita, pelas ajudas com metodologias e dúvidas sobre os animais CETP; pelas conversas divertidas sobre nosso cotidiano e gosto musical.

À Dra. Ana Maria Lottenberg, por toda atenção e carinho, pelas conversas descontraídas e pelas guloseimas que muitas vezes adoçaram os meus dias.

Ao Dr. Rodrigo Iborra, meu companheiro de profissão, por toda paciência e tempo dedicado a me ensinar inúmeras metodologias; por sempre estar à disposição para me ajudar com cálculos e discutir artigos e por ser meu parceiro nas brincadeira, piadas e desabafos do dia-a-dia.

À Dra. Adriana Saldiba, sem dúvida no grupo das pessoas mais fofas do laboratório, por toda ajuda com a padronização dos ensaios com células e PCR; por todo o tempo que dedicou a me aconselhar sobre pesquisa, congressos, viagens, relacionamentos e, pela amizade, carinho e atenção de sempre.

À Dra. Gabriela Castilho pela ajuda e paciência na padronização dos meus primeiros experimentos; pela linda amizade que dura até hoje, mesmo depois da sua saída do laboratório, e durará para sempre.

À Dra. Ligia Okuda, pela ajuda com meus ensaios iniciais; pela amizade sincera, principalmente, em um momento difícil de minha vida.

À Dra. Debora Rocco, pelo auxílio com protocolos no início do meu projeto.

À Ms. Karolline Santana, primeiramente, por ser mais que uma amiga na vida; por ser uma grande parceira de bancada; por ter palavras de carinho e conforto em momentos difíceis e pelos momentos históricos de divertimento.

Diego Gomes, agradecer aqui sua alegria de todos os dias seria pouco. Agradeço de fato, sua amizade que vai muito além das nossas conversas divertidas, e a oportunidade de estabelecer contigo um laço que nos permite ser sinceros e verdadeiros sempre.

À Ms. Maria Sílvia, primeiramente, pela paciência com as minhas brincadeiras provocativas e pela amizade que proporcionou momentos inesquecíveis de conversas descontraídas e desabafos, que foram, algumas vezes, regados a cerveja ou vinho.

À Ms. Milessa Afonso, eterna Tchura, pela amizade, papos divertidos e ricas discussões sobre nossos experimentos e resultados.

À mais que fofa Ms. Fernanda Fusco, por toda ajuda com os meus protocolos animais no começo do projeto; pela sincera amizade, carinho e confiança que depositou em mim ao longo destes anos.

À Ms. Tatiana, por me levar, muitas vezes, a refletir de maneira diferente sobre a vida, trabalho e política, graças a sua capacidade ímpar de equilibrar muito bem sua sinceridade e senso de justiça.

À Ms. Juliana Machado, por dividir sua opinião e experiência sobre os altos e baixos da pós-graduação.

Ao Guilherme Ferreira, a ajuda com os animais e com as rotinas de laboratório. E por, mesmo sem perceber, me estimular a pensar sobre a melhor maneira de se trabalhar em grupo.

À Lis Mie pelos abraços cheios de carinho, bom humor e fofura de todos os dias.

À Fabiana Ferreira, pela ajuda nas atividades do laboratório, e principalmente, nos dias tumultuados de cirurgia; pela companhia e conversas engraçadas na hora do almoço e, pela atenção e carinho em momentos difíceis.

À Kelly Gomes, pela ajuda com os experimentos nos momentos de aperto; pelos papos divertidíssimos sobre relacionamentos e família, e pela companhia providencial na busca por um pão de mel para alegrar nossas tardes.

À Jussara Rocha, pela paciência e didática para ensinar os primeiros passos no laboratório.

À querida Rosibel da Silva, por manter o laboratório em ordem e pelo melhor café matinal do mundo.

À Claudia Souza, agradeço de coração pela ajuda interminável com assuntos burocráticos; pela paciência e carinho ao longo destes anos e por ser a melhor amiga das impressoras quando elas se rebelaram contra mim.

À Bruna Lacerda, ou nutri júnior, pelo carinho, atenção e ajuda, que foram constantes durante o seu período de iniciação. Vou lembrar sempre do brilho nos seus olhos ao aprender algo novo.

Ao Eliton, que passou pelo laboratório e deixou ótimas memórias das conversas profundas e engraçadas sobre a vida.

Às minhas futuras parceiras Ana Paula Lembo, que em pouco tempo conquistou minha amizade com sua preocupação, carinho e valiosa ajuda; à Vanessa Del Bianco pela simpatia e disposição em ajudar com a colônia de animais.

À Dra. Maria Lúcia Correa-Gianella e equipe do LIM 25, por me cederem espaço, tempo e atenção em meus ensaios de PCR.

À Dra. Maria Elizabeth Rossi da Silva por gentilmente me ceder espaço, e à sua querida aluna Aritania S. Santos, pelas ricas conversas sobre experimentos e experiências.

Ao Prof. Dr. Joel C. Heimann, Dra. Luzia Furukwa, Dra. Ivone de Oliveira, Wagner Dominguez e Walter Campestre, pelo espaço cedido para a criação de meus animais e constante auxílio.

Ao Antonio, Walter e Waldeci, do Biotério da Reumatologia, pela prontidão e gentileza de sempre.

À Senária e Cida, por todo apoio e orientação durante o curso.

Aos amigos Mara Vieira e Altamiro Boscoli pelo apoio e compressão nos momentos difíceis do mestrado.

Às amigas Sheron Rodrigues, Marcielle Faria e Viviane Moraes, pelo incentivo e carinho tanto na vida pessoal como acadêmica.

Aos meus tios Ronaldo, Carmelita, Boaventura, Rose e Cecília, por acreditarem em meu potencial e me apoiarem, incondicionalmente, nas minhas escolhas.

Ao Rafael, meu namorado, que me acompanhou durante a pós-graduação, pela paciência e ajuda ao ler meus manuscritos e assistir minhas aulas antes de uma apresentação.

À minha irmã Márcia, que, à sua maneira, organizou sua rotina para que eu tivesse tranquilidade e espaço para estudar e escrever; pela paciência no dia-a-dia e por torcer pela minha vitória sempre.

À minha mãe Heloisa, por me ensinar a mais pura forma de amor; por ser minha heroína e inspiração para cada dia me tornar uma pessoa melhor; por me fazer acreditar que com trabalho e dedicação posso conquistar tudo o que quiser; por me acompanhar no laboratório aos finais de semana e por ser a única pessoa a entender todas minhas angústias e alegrias.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP) pelo apoio financeiro e possibilidade de execução do meu projeto.

“Se temos de esperar, que seja para colher a semente boa que lançamos hoje no solo da vida. Se for para semear, então que seja para produzir milhões de sorrisos, de solidariedade e amizade”

Cora Coralina

LISTA DE ABREVIATURAS

[¹⁴ C]-CE	colesterol esterificado marcado com carbono 14
[¹⁴ C]-CO	colesteril oleato marcado com carbono 14
[³ H]-COE	colesteril oleoil éter marcado com trício
ABCA-1	<i>ATP binding cassette transporter A1</i>
ABCG-1	<i>ATP binding cassette transporter G1</i>
AGE	produtos de glicação avançada
Apo	apolipoproteína
Apo E ^{-/-}	camundongos <i>knockout</i> para apolipoproteína E
B-E	receptor de Quilomicron, VLDL, IDL e LDL
BPM	batimentos por minuto
CD-36	cluster de diferenciação 36
CETP	proteína de transferência de colesterol esterificado
CETP-tg	camundongos transgênicos para CETP humana
CE	colesterol esterificado
CT	colesterol total
d	densidade
DCV	doenças cardiovasculares
eNOS	sintase endotelial de óxido nítrico
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HDL	lipoproteína de densidade alta
HDL-C	HDL colesterol
ICAM-1	moléculas de adesão intravascular 1
IL-6	interleucina 6
IL-10	interleucina 10
KBr	brometo de potássio
LDL	lipoproteína de densidade baixa
LDL-C	LDL colesterol
<i>Ldlr</i> ^{-/-}	camundongos <i>knock out</i> para o receptor de LDL
LCAT	lecitina colesterol aciltransferase
LOX-1	receptor para LDL oxidada

LRP	proteína relacionada ao receptor de LDL
MCP-1	proteína quimiotática de monócitos 1
mRNA	RNA mensageiro
PA	pressão arterial
PBS	tampão fosfato
PLTP	proteína de transferência de fosfolípidos
PPAR α	receptores ativados por proliferadores de peroxissomos α
PPAR γ	receptores ativados por proliferadores de peroxissomos γ
RAGE	receptor de AGE
RXR	receptor de retinoide X
SR-A	receptor <i>scavenger</i> A
SR-BI	receptor <i>scavenger</i> classe B tipo I
TG	triglicérides
TLC	cromatografia de camada fina
TNF	fator de necrose tumoral
TRC	transporte reverso de colesterol
TLR	receptores <i>Toll-like</i>
VCAM-1	moléculas de adesão de células vasculares
VLDL	lipoproteína de densidade muito baixa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formação de células espumosas na lesão arterial	6
Figura 2 - Transporte reverso de colesterol	13
Figura 3 - Organograma do protocolo experimental.....	22
Figura 4 - Pressão arterial de animais selvagens sedentários e treinados .	33
Figura 5 - Expressão de mRNA de <i>Cd36</i> , <i>Olr1</i> e <i>Scarb1</i> em macrófagos peritoneais de animais selvagens por RT-PCR em tempo real.....	35
Figura 6 - Expressão de mRNA de <i>Abca1</i> e <i>Abcg1</i> em macrófagos peritoneais dos animais selvagens por RT-PCR em tempo real.....	37
Figura 7 - Expressão de mRNA de <i>Pparg</i> , <i>Nr1h3</i> e <i>Nr1h2</i> em macrófagos peritoneais dos animais selvagens por RT-PCR em tempo real.....	38
Figura 8 - Expressão de mRNA de <i>Ccl2</i> , <i>Tnf</i> , <i>Il6</i> , <i>Il10</i> e <i>Cat</i> em macrófagos peritoneais dos animais selvagens por RT-PCR em tempo real.....	40
Figura 9 - Expressão de mRNA de <i>Cd36</i> , <i>Olr1</i> e <i>Scarb1</i> no arco aórtico dos animais selvagens por qRT-PCR em tempo real	43
Figura 10 - Expressão de mRNA de <i>Abca1</i> e <i>Abcg1</i> no arco aórtico dos animais selvagens por qRT-PCR em tempo real	45
Figura 11 - Expressão de mRNA de <i>Pparg</i> , <i>Nr1h3</i> e <i>Nr1h2</i> no arco aórtico dos animais selvagens por qRT-PCR em tempo real.	46
Figura 12 - Expressão de mRNA de <i>Ccl2</i> , <i>Tnf</i> , <i>Il6</i> , <i>Il10</i> , <i>Cat</i> e <i>Nos3</i> no arco aórtico dos animais selvagens por qRT-PCR em tempo real.....	48
Figura 13 - Efluxo de ¹⁴ C-colesterol, mediado por apo A-I, de macrófagos isolados do peritônio de camundongos selvagens sedentários e treinados..	52
Figura 14 - Efluxo de ¹⁴ C-colesterol, mediado por HDL2, de macrófagos de peritônio de camundongos selvagens sedentários e treinados.....	53

Figura 15 - Captação de ^3H -COE-LDL acetilada por macrófagos peritoneais de camundongos selvagens sedentários e treinados.	54
Figura 16 - Pressão arterial de animais CETP-tg sedentários e treinados..	56
Figura 17 - Expressão de mRNA de <i>Cd36</i> , <i>Olr1</i> e <i>Scarb1</i> por RT-PCR em macrófagos peritoneais dos animais CETP-tg por RT-PCR em tempo real...	57
Figura 18 - Expressão de mRNA de <i>Abca1</i> e <i>Abcg1</i> em macrófagos peritoneais dos animais CETP-tg por RT-PCR em tempo real.	59
Figura 19 - Expressão de mRNA de <i>Pparg</i> , <i>Nr1h3</i> e <i>Nr1h2</i> em macrófagos peritoneais dos animais CETP-tg por RT-PCR em tempo real	60
Figura 20 - Expressão de mRNA de <i>Ccl2</i> , <i>Tnf</i> , <i>Il6</i> , <i>Il10</i> e <i>Cat</i> em macrófagos peritoneais dos animais CETP-tg por RT-PCR em tempo real.	62
Figura 21 - Expressão de mRNA de <i>Cd36</i> , <i>Olr1</i> e <i>Scarb1</i> no arco aórtico dos animais CETP-tg por RT-PCR em tempo real.....	65
Figura 22 - Expressão de mRNA de <i>Abca1</i> e <i>Abcg1</i> no arco aórtico dos animais CETP-tg por RT-PCR em tempo real.....	67
Figura 23 - Expressão de mRNA de <i>Pparg</i> , <i>Nr1h3</i> e <i>Nr1h2</i> no arco aórtico dos animais CETP-tg por RT-PCR em tempo real.....	68
Figura 24 - Expressão de mRNA de <i>Ccl2</i> , <i>Tnf</i> , <i>Il6</i> , <i>Il10</i> , <i>Cat</i> e <i>Nos3</i> no arco aórtico dos animais CETP-tg por RT-PCR em tempo real.	70
Figura 25 - Efluxo de ^{14}C -colesterol, mediado por apo A-I, de macrófagos isolados do peritônio de camundongos CETP-tg sedentários e treinados ...	74
Figura 26 - Efluxo de ^{14}C -colesterol, mediado por HDL ₂ , de macrófagos de peritônio de camundongos CETP-tg sedentários e treinados..	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Peso, concentrações plasmáticas de lípidos e glicose dos animais selvagens, sedentários e treinados nos períodos basal e final.	32
Tabela 2 - Efeito do exercício sobre a expressão de receptores de fluxo de lípidos, resposta inflamatória, antioxidante e vasodilatadora animais selvagens	51
Tabela 3 - Peso e concentrações plasmáticas de lípidos e glicose dos animais CETP-tg, sedentários e treinados nos períodos basal e final.	55
Tabela 4 - Efeito do exercício sobre a expressão de receptores de fluxo de lípidos, resposta inflamatória, antioxidante e vasodilatadora animais CETP-tg.	73

RESUMO

Pinto PR. ***Treinamento físico aeróbio em camundongos selvagens e transgênicos para CETP não altera a remoção de colesterol celular e a expressão de genes envolvidos no fluxo de lípides em macrófagos e arco aórtico*** [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

O exercício físico regular contribui para prevenção e redução da aterosclerose, em grande parte, por melhorar o perfil lipídico e o transporte reverso de colesterol (TRC). O TRC é um sistema antiaterogênico que promove a remoção do excesso de colesterol de macrófagos pelas apo A-I e HDL e seu transporte ao fígado, com eliminação de colesterol na bile e fezes. Em camundongos selvagens e transgênicos para proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP-tg), o treinamento físico aumentou a transferência de colesterol radioativo de macrófagos para o plasma, fígado e fezes e o conteúdo dos receptores B-E e SR-BI no fígado. Em leucócitos, hepatócitos e enterócitos, o exercício físico aumentou a expressão do receptor de HDL, ABCA-1. Entretanto, não é claro se o exercício físico modula o fluxo de lípides em macrófagos, o que seria determinante para a primeira etapa do TRC. Assim sendo, avaliou-se, em camundongos selvagens e CETP-tg, o efeito do treinamento físico aeróbio sobre: 1) a expressão de genes envolvidos no fluxo de lípides, modulação da resposta inflamatória, vasodilatadora e antioxidante: *Pparg* (PPAR γ), *Nr1h3* (LXR α), *Nr1h2* (LXR β), *Abca1* (ABCA-1), *Abcg1* (ABCG-1), *Scarb1* (SR-BI), *Cd36* (CD-36), *Olr1* (LOX-1), *Ccl2* (MCP-1), *Tnf* (TNF α), *Il6* (IL-6), *Il10* (IL10), *Nos3* (eNOS) e *Cat* (Catalase) na parede arterial e em macrófagos peritoneais; 2) o efluxo de ^{14}C -colesterol de macrófagos peritoneais para HDL $_2$ e apo A-I e 3) a captação de ^3H -colesteril oleoil éter-LDL (^3H -COE-LDL) acetilada por macrófagos peritoneais. Camundongos machos com 12 semanas de idade, recebendo dieta padrão e água *ad libitum*, foram aleatoriamente divididos em grupo sedentário e treinado. O treinamento físico foi realizado em esteira, 15m/min, 30 min/dia, 5 vezes/semana, durante 6 semanas. Arco aórtico e macrófagos da cavidade

peritoneal foram isolados dos animais sedentários e treinados, imediatamente (0 h) e após 48 h da última sessão de exercício. A expressão de genes foi avaliada por RT-PCR e o efluxo de colesterol, por meio da sobrecarga de macrófagos peritoneais com LDL acetilada e ^{14}C -colesterol, seguindo-se incubação com apo A-I ou HDL₂. A captação de LDL foi determinada pela incubação de macrófagos com ^3H -COE-LDL acetilada. Não foram observadas alterações sistemáticas na expressão de genes envolvidos no fluxo de lípidos em macrófagos e na aorta comparando-se animais sedentários e treinados, selvagens ou CETP-tg. De modo semelhante, não houve diferença no efluxo de colesterol celular e na captação de LDL. Em conclusão, não foram evidenciadas alterações em macrófagos peritoneais e na parede arterial frente ao treinamento físico aeróbio que possam contribuir para o TRC em modelo experimental de camundongos não dislipidêmicos, sem intervenção farmacológica ou alimentar. Sendo assim, o efeito do treinamento físico na melhora do transporte reverso de colesterol, observado em estudos anteriores, deve ser consequente à sua ação sistêmica sobre mediadores deste transporte e expressão de receptores no fígado e intestino.

Descritores: 1.Exercício; 2.Aterosclerose; 3.Colesterol; 4.Lipoproteínas; 5.Macrófagos.

ABSTRACT

Pinto PR. ***Aerobic exercise training in wild type and CETP transgenic mice does not affect cellular cholesterol removal and expression of genes involved in lipid lipid flux in macrophages and aortic arch*** [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

Abstract

Regular physical exercise prevents and reduces atherosclerosis mainly by improving lipid profile and reverse cholesterol transport (RCT). RCT is an antiatherogenic system that promotes excess cholesterol removal from macrophages by apo A-I and HDL and its transport to the liver. Then, cholesterol can be secreted into bile and excreted in feces. In wild type and cholesteryl ester transfer protein transgenic (CETP-tg) mice exercise training increased the transfer of ^{14}C -cholesterol from macrophages to plasma, liver and feces and elevated SR-BI and B-E receptor content in the liver. In leucocytes, hepatocytes and enterocytes, physical exercise increased mRNA of HDL receptor, ABCA-1. Nonetheless, it is not clear if exercise can modulate lipid flux in macrophages that can be important for the first phase of the RCT. It was analyzed in wild type and CETP-tg mice the effect of aerobic exercise training in: 1) the expression of genes involved in lipid flux, inflammation, oxidation and vasodilation: *Pparg* (PPAR γ), *Nr1h3* (LXR α), *Nr1h2* (LXR β), *Abca1* (ABCA-1), *Abcg1* (ABCG-1), *Scarb1* (SR-BI), *Cd36* (CD-36), *Olr1* (LOX-1), *Ccl2* (MCP-1), *Tnf* (TNF α), *Il6* (IL-6), *Il10* (IL10), *Nos3* (eNOS) and *Cat* (Catalase) in arterial wall and peritoneal macrophages; 2) the apo A-I and HDL₂-mediated cholesterol efflux from macrophages and 3) the uptake of ^3H -cholesteryl oleoyl ether- acetylated LDL (^3H -COE-LDL) by macrophages. Twelve week old male mice fed a chow diet and water *ad libitum* were randomly assigned to sedentary and trained groups. Exercise training was performed in a treadmill (15m/min, 30 min/day, 5 times/week, during 6 weeks). Aortic arch and peritoneal macrophages were isolated from sedentary and trained animals immediately (time 0) and 48 h after the last exercise session.

Gene expression was analyzed by RT-PCR and cholesterol efflux mediated by apo A-I or HDL₂ after macrophage overloading with acetylated LDL and ¹⁴C-cholesterol. LDL uptake by macrophages was determined by incubation with ³H-COE-acetylated LDL. There were no systematic changes in the expression of macrophages and aortic genes comparing sedentary and trained wild type or CETP-tg mice. Similarly, there were no changes in cholesterol efflux and LDL uptake by macrophages. In conclusion, it was not found alteration in gene expression and cholesterol flux in macrophages and arterial wall that can contribute to the RCT in experimental model of non-dyslipidemic mice without pharmacological or dietary interventions. Therefore, the benefits of aerobic training in improving RCT, observed in previous studies, should be consequent to its systemic action on mediators of this transport and on the expression of hepatic and intestinal receptors.

Descriptors: 1.Exercise; 2.Atherosclerosis; 3.Cholesterol; 4.Lipoproteins; 5.Macrophages.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Lipoproteínas e Doenças Cardiovasculares	1
1.2 Lipoproteínas de densidade baixa (LDL) e aterosclerose.....	2
1.3 Efeitos antiaterogênicos das lipoproteínas de densidade alta (HDL)....	7
1.4 Exercício Físico e metabolismo de lípides	14
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Animais	20
3.2 Treinamento físico	21
3.3 Dosagens bioquímicas.....	22
3.4 Mensuração da pressão arterial sistólica caudal - PAc.....	23
3.5 Obtenção de lipoproteínas do plasma humano	23
3.6 Marcação da HDL com [¹⁴ C]-colesterol oleato	24
3.7 Determinação da atividade da proteína de colesterol esterificado (CETP).....	25
3.8 Acetilação de LDL.....	26
3.9 Obtenção de macrófagos de peritônio e arcos aórticos.....	26
3.10 Determinação do efluxo de ¹⁴ C-colesterol em macrófagos, mediado por HDL ₂ e apo A-I.....	27
3.11 Determinação da captação de LDL acetilada por macrófagos	28
3.12 Análise da expressão gênica relativa por reação de polimerase em cadeia (PCR)	29
3.12.1 Preparação dos tecidos e extração de RNA.....	29
3.12.2 Quantificação do conteúdo do mRNA.....	30
3.13 Análise estatística	31
4. RESULTADOS	32

4.1 Animais selvagens	32
4.2 Animais CETP-tg	54
5. DISCUSSÃO	76
6. CONCLUSÃO	82
7. REFERÊNCIAS	83

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lipoproteínas e Doenças Cardiovasculares

As doenças isquêmicas cardíacas e cerebrovasculares, apresentam-se entre as principais causas de morte no cenário mundial (GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators, 2015). No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, as doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte entre as doenças crônicas não transmissíveis, responsáveis por 28,8 % dos óbitos (Ministério da Saúde, 2012).

Essas doenças são representadas principalmente pela aterosclerose, para a qual contribuem fatores de risco primários, como, idade, sexo, história familiar prévia de DCV, dislipidemia, hipertensão arterial, diabetes melito, tabagismo e fatores de risco secundários, como sedentarismo, obesidade e fatores psicossociais.

A elevação das concentrações plasmáticas de colesterol, em especial nas lipoproteínas de densidade baixa (LDL) e a redução da concentração de colesterol nas lipoproteínas de densidade alta (HDL) são os componentes da dislipidemia determinantes à gênese da lesão aterosclerótica (Tanabe et al., 2012 e Wilson et al., 1988). As LDL são as principais transportadoras de colesterol para os tecidos periféricos o que se vincula ao seu elevado conteúdo percentual em colesterol em relação aos demais componentes de sua estrutura e ao seu tamanho reduzido. Tais características físico-químicas permitem que

as LDL atravessam a camada endotelial em sentido da íntima-média arterial, onde podem ser modificadas por oxidação e, posteriormente, captadas por macrófagos. Neste sentido, estratégias que visam reduzir as concentrações plasmáticas de LDL-colesterol (LDL-C) ou reduzir sua modificação química têm sido preconizadas para prevenção da aterosclerose (Stone et al., 2014); (Parish et al., 2012 e Simes et al., 2002).

1.2 Lipoproteínas de densidade baixa (LDL) e aterosclerose.

Além das altas concentrações de LDL no plasma, a redução do tamanho dessas partículas favorece a sua migração para a camada íntima arterial (Carmena et al., 2004). Nesse compartimento, as LDL sofrem oxidação de seu componente lipídico e proteico, a apolipoproteína B100 (apo B100) (Stocker e Keany, 2004). As LDL podem ainda sofrer modificações na circulação, como a glicação, que resulta da interação não-enzimática com açúcares redutores, prevalentes na hiperglicemia, e carbamilação, modificação química causada pelas altas concentrações de ureia no plasma de pacientes com doença renal crônica (Berg et al., 2013 e Méndez et al., 2010).

As LDL modificadas infiltradas no espaço subendotelial promovem o aumento da expressão das seguintes moléculas de adesão, moléculas de adesão de células vasculares (VCAM-1), moléculas de adesão intramuscular (ICAM-1), P-selectina e E-selectina (Weber e Noels, 2011; Cybulsky et al., 2001; Dong et al., 1998; Couffinhal et al., 1994). A maior expressão dessas moléculas leva ao recrutamento de leucócitos (monócitos e linfócitos T). Na túnica íntima os monócitos se diferenciam em macrófagos e juntamente com os linfócitos T

estimulam a produção de quimiocinas, como a proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1), e citocinas, como fator de necrose tumoral alpha (TNF α) e interleucina 6 (IL-6) (Palmefors et al., 2014 e Blake et al., 2001). Dentre os leucócitos infiltrados na lesão aterosclerótica, os monócitos são os mais abundantes, diferenciando-se em macrófagos (Hansson e Libby, 2006).

A expressão dos receptores *scavenger* é positivamente modulada pela captação de LDL modificadas o que favorece a remoção de partículas potencialmente imunogênicas e inflamatórias do meio adjacente. Por outro lado, propicia o acúmulo gradativo de colesterol nos macrófagos que se transformam em células espumosas. Existem dezenas de receptores *scavenger* descritos na literatura, no entanto, os de maior relevância para a formação da placa aterosclerótica são, o receptor *scavenger* A (SR-A), CD-36, *Lectin-like LDL receptor-1* (LOX-1), receptor *scavenger* classe B tipo I (SR-BI), receptor para produto avançado de glicação (RAGE) e os *TOLL-like receptors* (TLR) (Goyal et al., 2012).

Diversos estudos avaliaram a ação e função dos receptores *scavenger* no desenvolvimento da aterosclerose. O receptor SR-A, identificado primeiramente como MRS, é encontrado nas isoformas SR-AI, II e III. O silenciamento gênico de SR-A levou à menor formação de células espumosas e reduziu acentuadamente o acúmulo de lípidos advindos de LDL modificadas (Mäkinen et al., 2010 e Laukkanen et al., 2000). Em estudos *in vivo*, a deleção de SR-AI e SR-AII em animais *knockout* para apo E (*ApoE*^{-/-}) ou para o receptor de LDL (*Ldlr*^{-/-}), promoveu redução na lesão aterosclerótica (Suzuki et al., 1997 e Sakaguchi et al., 1998). Entretanto, o aumento da expressão desses receptores

falhou em exacerbar o desenvolvimento de lesão nesses modelos animais (Van Eck et al, 2000 e Herijgers et al., 2000).

O receptor CD-36, além de reconhecer lipoproteínas nativas como lipoproteínas de densidade alta (HDL), baixa (LDL) e muito baixa (VLDL), tem papel importante na remoção partículas modificadas como produtos de glicação avançada (AGE), LDL acetiladas e principalmente de LDL oxidadas. Ele contribui com 60% a 70% do colesterol éster acumulado em macrófagos expostos à LDL oxidada (Moore e Freeman, 2006). A formação de células espumosas mediada por CD-36 ocorre devido a sua alta afinidade com uma família de fosfolípidos oxidados presente em partículas de LDL modificadas por diversos sistemas de oxidação (Podrez et al., 2002).

A sua relevância em remover LDL oxidadas também foi evidenciada em estudos *in vivo*. Camundongos *ApoE*^{-/-} que não expressavam CD-36 apresentaram redução da lesão aterosclerótica em comparação aos animais *knockout* somente para a *ApoE* (Kuchibhotla et al., 2008 e Febbraio et al., 2000).

Em estudos *in vitro* a falta simultânea dos receptores CD-36 e SR-A, resultou na redução de 75% a 90% da captação de LDL modificadas por oxidação ou acetilação em macrófagos (Kunjathoor et al., 2002). *In vivo*, a deleção ou silenciamento desses receptores separadamente mostram acentuada redução da aterosclerose, mas mediante ausência simultânea não é observado benefício adicional ou o efeito antiaterogênico é perdido (Mäkinen et al., 2010, Manning-Tobin et al., 2009 e Kuchibhotla et al., 2008).

A expressão do receptor LOX-1 é aumentada em condições patológicas como hipertensão, diabetes e dislipidemias (Goyal, 2012). Mehta et al. (2007) evidenciaram que a deleção de LOX-1 em animais *Ldlr*^{-/-} diminuiu a

aterosclerose na aorta, e essa melhora associou-se com redução de mediadores pró-inflamatórios e pró-oxidantes. Em modelo animal *Apoe*^{-/-} com aumento da expressão de LOX-1, que recebeu dieta rica em colesterol, foi observado maior conteúdo de LDL oxidada na aorta, o que favoreceu a disfunção endotelial, inflamação vascular e formação de placa em comparação ao animal *Apoe*^{-/-} controle (Akhmedov et al., 2014). Neste estudo, o aumento da expressão de LOX-1 levou a maiores modificações no endotélio, enquanto nos macrófagos não foi verificada nenhuma alteração.

O SR-BI reconhece tanto a LDL acetilada como a oxidada, mas se liga à LDL acetilada com maior afinidade que o receptor CD-36 (Acton et al., 1994). Embora tenha afinidade com essas partículas modificadas e nativas, como LDL e VLDL, a função mais importante desse receptor está relacionada com a sua capacidade de se ligar as HDL e promover tanto a remoção de colesterol de tecidos periféricos, como facilitar a entrega do colesterol da HDL para tecidos esteroideogênicos e para o fígado (Plüddemann et al. 2007).

Existe uma associação entre a expressão dos receptores *scavenger* e a liberação de citocinas. A ligação do receptor CD-36 com LDL oxidada, por exemplo, desencadeia a liberação de citocinas pró-inflamatórias nos macrófagos. Por sua vez, a expressão dos receptores *scavenger* também pode ser induzida por mediadores inflamatórios. Sendo assim, o processo inflamatório acentua e perpetua a injúria na área de lesão aterosclerótica. (Tedgui e Mallat, 2006).

Além dos receptores *scavenger*, o receptor de AGE (RAGE) e os *TOLL-like receptors* (TLR) também estão envolvidos no desenvolvimento da aterosclerose. Os AGE produzem espécies reativas de oxigênio quando

interagem com o RAGE, subsequentemente ativam o fator transcrricional fator nuclear Kappa B (NFkB) em células musculares lisas e endotelial, levando ao aumento da expressão de genes relacionados a aterosclerose, como VCAM-1, ICAM-1 e MCP-1 (Fukami et al., 2014). Os TLR2 e TLR4 contribuem para o acúmulo de células espumosas na parede arterial de animais suscetíveis à aterosclerose. A expressão dos TLR3, TLR4 e TLR9 podem induzir o aumento da expressão dos receptores *scavenger* favorecendo, assim, o acúmulo celular de lípidos (Seneviratne et al., 2012).

Figura 1 - Formação de células espumosas na lesão arterial. LDL modificadas no espaço subendotelial induzem a secreção de moléculas de adesão, VCAM e ICAM, e de quimiocinas, MCP-1, que favorecem o recrutamento de monócitos por diapedese. Na íntima arterial, os monócitos se diferenciam em macrófagos. Os receptores *scavenger* CD-36 e LOX-1, expressos em macrófagos, reconhecem as partículas de LDL modificadas e promovem sua captação. O acúmulo de colesterol nos macrófagos origina as células espumosas.

1.3 Efeitos antiaterogênicos das lipoproteínas de densidade alta (HDL).

As HDL estão inversamente associadas à doença aterosclerótica. Estudos evidenciam que o aumento de 10 mg/dL de HDL-colesterol (HDL-C) no plasma correlaciona-se com redução do risco de complicações cardiovasculares (13% em homens e 8,6% em mulheres) (Wilson et al., 1988). O efeito protetor da HDL é independente dos valores de colesterol total e LDL-C (Barter et al., 2007 e Rubins et al., 1999).

A concentração plasmática de HDL-C prediz proteção cardiovascular de acordo com vários estudos epidemiológicos (Assmann et al., 1996). Entretanto, terapias que elevam o HDL-C nem sempre refletem benefício cardiovascular e levantam o questionamento acerca do melhor marcador de risco, seja pela determinação da partícula de HDL, por técnica de ressonância magnética nuclear acoplada à espectrometria de massa, ou pela determinação da concentração plasmática de apo A-I. Além disso, a análise do proteoma e do lipidoma da HDL revela espécies macromoleculares distintas nas subfrações de HDL que conferem diferente funcionalidade a estas partículas. Além de apolipoproteínas e enzimas diretamente envolvidas no metabolismo lipídico, as HDL carregam proteínas que regulam a ativação do sistema complemento, proteólise e estabilidade da placa aterosclerótica (Shah et al., 2013 e Davidsson et al., 2010). Subespécies lipídicas, principalmente, fosfolípidos, também determinam a funcionalidade da HDL o que, independentemente do HDL-C pode prever maior ou menor benefício cardiovascular frente a estratégias medicamentosas ou de intervenção em estilo de vida (Kontush et al., 2013 e Vaisar et al., 2007).

As HDL são lipoproteínas heterogêneas, caracterizadas por uma variedade de partículas com tamanho, densidade e funções distintas (Rosenson et al., 2011). Elas se originam a partir de partículas precursoras, denominadas pré-beta HDL. Estas são estruturas lamelares ricas em fosfolípidos e apolipoproteína A-I (apo A-I), com conteúdo reduzido de colesterol livre. As pré-beta HDL são formadas, principalmente, no período pós-alimentar, durante a metabolização de triglicérides dos quilomícrons e VLDL, pela enzima lipoproteína lipase (Neary et al., 1991; Clay e Barter, 1996). Além disso, fígado e intestino exportam colesterol à circulação, por intermédio do receptor *ATP binding cassette transporter A-1* (ABCA-1), o que promove a formação de HDL nascentes (Ji et al., 2012 e Brunham et al, 2006). À medida que removem colesterol livre das células, as pré-beta HDL aumentam gradativamente de tamanho, tornando-se esféricas em decorrência do acúmulo de colesterol esterificado e triglicérides em seu núcleo.

A metabolização das partículas de HDL e sua maturação de pequenas estruturas discoides à partículas esféricas reflete o transporte de colesterol dos tecidos periféricos ao fígado, pelo chamado transporte reverso de colesterol (TRC). O TRC caracteriza uma das principais atividades antiaterogênicas das HDL, embora também exerçam funções antiagregante, antiapoptótica, anti-inflamatória, antioxidante, vasodilatadora e melhoria na tolerância à glicose e sensibilidade insulínica (Kontush, 2014).

O termo transporte reverso de colesterol (TRC) implica na existência de um sistema que previna o desenvolvimento da aterosclerose, graças à remoção do excesso de colesterol de células da parede arterial pelas HDL seguido pelo seu transporte ao fígado e órgãos esteroideogênicos, com conversão

respectivamente, em ácidos biliares e hormônios esteroídicos. A remoção de colesterol pelas apo A-I e subfrações de HDL é a primeira etapa do TRC, denominada efluxo de colesterol. Esse mecanismo consiste na interação das apo A-I e pré-beta HDL com os receptores de membrana ABCA-1.

O ABCA-1 é uma proteína de 2.260 aminoácidos e 220 kDa, cujo gene é modulado positivamente pelo conteúdo intracelular de colesterol. Derivados oxigenados do colesterol, os óxidos de colesterol, são ligantes do receptor hepático X (LXR, *liver X receptor*) que, ao se dimerizar com o receptor X de retinoide (RXR, *retinoid X receptor*) induz a transcrição gênica de *ABCA1* (Costet et al., 2000 e Repa et al., 2000). Além disso, o aumento da concentração intracelular de colesterol favorece a dissociação de LXR β ligado ao ABCA-1 e promove a ativação rápida do transportador presente na membrana plasmática (Hozoji-Inada et al, 2011). Este, à custa da energia liberada pela hidrólise de duas moléculas de ATP, ligadas à sua estrutura, exporta colesterol de microdomínios da membrana plasmática aos aceptores extracelulares.

Receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPAR) α e γ também modulam a expressão de ABCA1, (Chianetti et al., 2001). Parte da ação do PPAR γ em macrófagos, por exemplo, dá-se pelo estímulo à formação de LXR (Majdalawieh et al., 2010 e Chawla et al., 2001).

Aumento da expressão de ABCA-1 também ocorre no tratamento de alguns tipos celulares com AMP cíclico (8-Bromoadenosine 3',5'-cyclic monophosphate), porém os mecanismos relacionados com sua ação ainda não estão bem definidos (Oram et al., 2000). Ademais, o GW3965 e T0901317, agonistas sintéticos de LXR, também são capazes de induzir a expressão de

ABCA-1 e ABCG-1 em macrófagos (Oram e Vaughan, 2006; Ishibashi et al., 2013).

O ABCG-1, outro integrante da família dos receptores ABC, é uma proteína de 674 aminoácidos e 64 kDa que também é positivamente modulada por PPAR γ e pelo receptor LXR (Ozasa et al., 2011). Esse receptor favorece o efluxo de colesterol e óxidos de colesterol para partículas maiores de HDL (Teresaka et al., 2007). Sua contribuição para a remoção de colesterol celular, embora importante, é menos representativa que a observada por ABCA-1 (Adorni et al., 2007). Em modelos animais geneticamente modificados fica clara a contribuição do ABCA-1 na prevenção da aterosclerose (Aiello et al., 2002) o que, entretanto, não é evidente para o ABCG-1 (Basso et al., 2006; Burgess et al., 2008).

Uma vez na partícula de HDL, o colesterol livre é esterificado pela lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), a qual transfere um ácido graxo da posição 2 da molécula de fosfatidilcolina para o colesterol. Isto aumenta sua hidrofobicidade e, conseqüentemente, sua migração ao núcleo da HDL (Calabrezi, 2010).

No fígado e órgãos esteroidogênicos, o colesterol esterificado das HDL pode ser seletivamente removido, em detrimento dos demais componentes da HDL, pelo receptor SR-BI (Azhar et al., 2002). A expressão hepática deste receptor favorece a maior secreção biliar de colesterol e reduz a aterosclerose, embora reduza a concentração plasmática de HDL-C. Em macrófagos arteriais, o SR-BI participa da captação de lipoproteínas modificadas, embora também medie o efluxo de colesterol para as HDL. Isto se dá por processo de gradiente de concentração, embora não pareça contribuir com a maior parcela da retirada

de colesterol celular, a qual é representada pelo efluxo via ABCA-1 (Ji et al., 2011).

Há ainda, a saída de colesterol decorrente de um processo lento de difusão, como por exemplo, a mediada por albumina. Este caracteriza um fluxo basal e constante de colesterol, contribuindo pouco para a remoção de lípidos em macrófagos sobrecarregados em colesterol (Sankaranarayanan et al., 2013).

O colesterol esterificado das HDL pode ainda, por intermédio da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP), ser transferido para lipoproteínas que contêm apo B (quilomícrons, VLDL, lipoproteína de densidade intermediária - IDL e LDL). Em troca, as HDL recebem triglicérides destas lipoproteínas, o que aumenta seu tamanho e favorece sua lipólise pela lipoproteína lipase hepática e interação com o SR-BI. Os quilomícrons, VLDL, IDL e LDL podem ser removidos pelos receptores hepáticos do tipo B-E e proteína relacionada ao receptor de LDL (LRP, *LDL receptor related protein*). No fígado, o colesterol pode ser liberado na forma livre na bile ou, pela ação das enzimas 7 alfa e 27 alfa hidroxilase, ser convertido em ácidos biliares e excretado nas fezes (Oliveira e Faria, 2011).

A CETP está presente em seres humanos e modelos animais suscetíveis à aterosclerose. Por outro lado, está ausente em ratos e camundongos, os quais têm a HDL como principal lipoproteína transportadora de colesterol, sendo resistentes à aterosclerose. Modelos geneticamente modificados, como camundongos transgênicos para CETP humana, desenvolvem aterosclerose e apresentam um perfil de transporte reverso mais semelhante ao de humanos, o que constitui importante ferramenta para o estudo deste sistema antiaterogênico.

Na circulação as partículas de HDL sofrem remodelamento pela ação de outras lipases e proteínas além da ação de LCAT e CETP. A lipoproteína lipase, a lipase hepática e a proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP) podem atuar conjuntamente com a CETP na conversão de subfrações de HDL (Maiga et al., 2013). A PLTP medeia a transferência de fosfolípidos da superfície de lipoproteínas ricas em triglicérides para as HDL durante a ação da lipoproteína lipase (LPL), contribuindo assim para a formação de novas partículas de HDL. Essas novas partículas ricas em fosfolípidos e colesterol, podem prover bons substratos para a LCAT (Tall et al., 1985). Enquanto a CETP forma partículas maiores de HDL, a PLTP favorece o aparecimento de partículas cada vez menores, levando a geração de pré-β-HDL pobres em lípidos (Lagrost, 1997). A geração de partículas precursoras de HDL pode ocorrer também pela ação da lipase hepática e lipase endotelial, que metaboliza triglicérides e fosfolípidos das HDL e, simultaneamente, facilita a captação de colesterol esterificado pelo hepatócito (Annema e Tietge, 2011). Estudos em células mostraram que lipase hepática pode promover a captação seletiva de HDL₃ rica em colesterol esterificado pelos hepatócitos, por um mecanismo que não requer a participação do SR-BI (Brundert et al., 2003).

Alterações em etapas do transporte reverso de colesterol e na maturação das partículas de HDL são descritas em várias doenças, associando-se ao desenvolvimento de aterosclerose (Puntoni et al., 2012; Holleboom et al., 2013).

Transporte Reverso de Colesterol

Figura 2 - Transporte reverso de colesterol. O transporte reverso de colesterol é o mecanismo pelo qual as apo A-I e as HDL interagem com os receptores de membrana ABCA-1 e ABCG-1, removendo o excesso de colesterol de macrófagos. Após a esterificação do colesterol pela lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), o colesterol esterificado (CE) pode ser removido da HDL pela interação com o receptor hepático SR-BI. Por intermédio da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP), o colesterol pode ser transferido das HDL para as LDL, VLDL e quilomícrons, os quais são captados pelo receptor B-E no fígado. Em troca, as HDL recebem triglicérides (TG) que favorece sua interação com o SR-BI. No fígado, o colesterol é secretado na bile e excretado nas fezes. A transcrição gênica de *ABCA1* e *ABCG1* é positivamente modulada pelo conteúdo intracelular de colesterol e óxidos de colesterol, graças à ativação do receptor nuclear LXR que se dimeriza com RXR.

1.4 Exercício Físico e metabolismo de lípidos

A prática regular de exercício físico é considerada uma importante ferramenta na prevenção das DCV e na redução da mortalidade por esta causa (Lee et al., 2014, Balady et al., 2012 e Park et al., 2012).

Em particular, o exercício físico melhora o metabolismo plasmático e tecidual de lípidos e lipoproteínas. A redução da trigliceridemia é obtida pelo estímulo à produção e atividade da lipoproteína lipase, o que promove a metabolização de quilomícrons e VLDL (Freese et al., 2014 e Gabriel et al., 2013). Em consequência, há diminuição na formação de LDL pequenas e densas, com predomínio de uma fração maior de LDL, menos aterogênica (Sondergaard et al., 2014; Halverstadt et al., 2007 e Williams et al., 1986). Além disso, pelo estímulo à ação da lipoproteína lipase, formam-se partículas nascentes de HDL (Pirim et al., 2014).

Características específicas do tipo de exercício, como intensidade, frequência e duração das sessões também são determinantes para o benefício conferido ao metabolismo lipídico. O aumento da concentração de HDL plasmática parece estar condicionado ao maior volume de treinamento físico aeróbico, quando comparado apenas ao aumento de intensidade da atividade aeróbia (Kraus et al., 2002). O treinamento físico aeróbico aumenta o número de fibras de contração lenta (tipo IIa e IIb), que têm elevada capacidade de metabolizar ácidos graxos advindos das lipoproteínas ricas em triglicérides, pela ação da lipoproteína lipase. Esse mecanismo está associado ao aumento da concentração de HDL-C (Geisler et al., 2011). Assim, quando a intensidade e o volume de treinamento são suficientes para depleção de triglicérides intramusculares, ocorre o aumento da síntese e liberação muscular de

lipoproteína lipase (Trejo-Gutierrez et al., 2007). O aumento da lipoproteína lipase foi relatado tanto no exercício agudo a 80% da frequência cardíaca máxima, como no exercício de esforço prolongado (Leaf, 2003). Agudamente, o exercício físico favorece a geração de novas partículas de HDL, o que se vincula à melhor ação da lipoproteína lipase e também à produção muscular de pré-beta HDL (Jafari et al., 2003, Sviridov et al., 2003, Olchawa et al., 2004). Este último mecanismo foi evidenciado pela diferença no gradiente arterio-venoso de pré-beta HDL em indivíduos que se exercitaram em cicloergômetro, embora seu detalhamento ainda não tenha sido demonstrado. O aumento da concentração de pré-beta-HDL também foi verificado em diabéticos e controles submetidos a treinamento físico (Sviridov et al., 2003 e Olchawa et al., 2004). Em atletas, a concentração de pré-beta-HDL foi 46% maior que em indivíduos controles ativos, após teste agudo (Olchawa et al., 2004). Também foram observados aumentos nas concentrações de apo A-I e A-II (Olchawa et al., 2004; Hoang et al., 2008).

A maior geração de pré-beta HDL e elevação de HDL-colesterol associam-se diretamente à maior habilidade do soro de atletas e de animais treinados em remover colesterol de fibroblastos em cultura (Brites et al., 2004; Meissner et al. 2010). No entanto, a capacidade específica das HDL em remover colesterol celular não foi alterada em indivíduos saudáveis e em portadores de diabetes melito tipo 2 após treinamento físico aeróbio intenso por 4 meses (Ribeiro et al., 2008). Embora em alguns estudos a concentração de HDL-C no plasma não seja modificada pelo treinamento físico, demonstra-se redução na concentração de pré-beta HDL, com enriquecimento das HDL em triglicérides, o que reflete sua melhor maturação (Ribeiro et al., 2008). Além disso, mesmo na

ausência de variação do HDL-C, o treinamento físico melhora a capacidade antioxidante das HDL em portadores de diabetes melito tipo 2 (Iborra et al., 2008).

Em modelo animal dislipidêmico *Ldlr*^{-/-}, o exercício físico diminuiu o desenvolvimento da aterosclerose, a área de lesão aterosclerótica pré-estabelecida e a doença valvar aórtica (Matsumoto et al., 2013; Matsumoto et al., 2010; Ramanchandran et al., 2005). Adicionalmente, observou-se em camundongos *Apoe*^{-/-} treinados, redução da gravidade das lesões ateroscleróticas e aumento da estabilidade da placa, com número menor de eventos de ruptura na aorta e coronárias, propiciando maior sobrevida aos mesmos em comparação aos sedentários (Napoli et al., 2006). Nesse mesmo modelo animal, o treinamento aeróbio realizado por 12 semanas, reduziu a concentração de marcadores inflamatórios que se apresentam elevados na área de lesão aterosclerótica, como por exemplo, as citocinas TNF α e IL-6 e o receptor TLR4 (Wu et al, 2014). Observou-se, ainda na parede arterial de camundongos *knockout* para o receptor de LDL, melhora das defesas oxidantes pelo exercício aeróbio após uma e seis semanas de treinamento, refletida pela maior expressão de catalase e óxido nítrico sintase (Meilhac et al., 2001)

O treinamento físico aeróbio melhora o TRC *in vivo*, o que foi caracterizado pela maior recuperação de colesterol radioativo, advindo de macrófagos, no plasma, fígado e fezes (Rocco et al., 2011; Rocco et al., 2010).

O exercício físico pode ainda modular a expressão de reguladores do fluxo de lípidos em diversos tipos celulares. Em modelos animais, o exercício físico aumentou a expressão hepática de ABCA-1, receptor B-E e SR-BI (Ghanbari-Niaki et al., 2007; Khabazian et al., 2009; Rocco 2010; Rocco et al., 2011). No intestino delgado, além do aumento de mRNA de *Abca1* descreveu-se maior

expressão de *Abcg8*, marcador envolvido no controle da absorção de esteróis neste tecido, e *Abcg4*, um homólogo de ABCG-1 que pode refletir função similar no transporte de colesterol *in vivo* (Khabazian et al., 2009; Matsuo 2010; Ghanbari-Niaki et al., 2012 e 2013). No músculo de camundongos selvagens foi observado maior expressão de LXR α (*Nr1h3*) e de *Ppara*, um dos membros da família dos receptores de proliferadores de peroxissomos, envolvido na oxidação lipídica no tecido muscular (Koves et al., 2013; Bedu et al., 2007). Sasaki e et al. (2014) demonstraram que o treinamento em esteira aumentou, no gastrocnêmio de camundongos selvagens, o mRNA de *Pparg1* e seu coativador *Pgc1 α* . Este estudo descreveu também que a ativação do *Pparg1* induziu a ativação do mRNA da lipoproteína lipase (*Lpl*), que hidrolisa triglicérides dos quilomícron e VLDL para produzir ácidos graxos a serem utilizados como fonte de energia pelo músculo.

O exercício de baixa intensidade levou ao aumento do mRNA de *ABCA1*, *ABCG1*, *NR1H3*, *PPAR α* , *PPAR γ* , *PPARGC1A* (*PGC-1 α*) e *CD36* em leucócitos (Butcher et al., 2008; Yakeu et al., 2010). Em contrapartida, o exercício reduziu nessas células, a expressão dos marcadores inflamatórios TNF α , IL-6 e proteína quimioatraente de monócitos, MCP-1 (Yakeu et al., 2010).

Em monócitos foram observados efeitos semelhantes mediados pelo exercício, onde houve elevação de *ABCA1*, *LXR*, *PPAR γ* e *CD36* (Thomas et al., 2012). Em linfócitos observou-se aumento do mRNA de *ABCA1* mediado por uma sessão aguda de treinamento resistido (Ghanbari-Niaki et al., 2011).

Embora células de sangue periférico sejam muito utilizadas em estudos que avaliam a modulação do metabolismo lipídico (Aggarwal et al., 2006), por sua fácil obtenção, é ainda controversa sua representatividade em termos de

transporte reverso de colesterol. Isto porque estas células não lidam com grandes quantidades de colesterol e, portanto, podem não representar o que acontece no microambiente arterial, onde a expressão dos receptores de HDL é fundamental para prevenir o acúmulo intracelular de esteróis.

Macrófagos isolados do peritônio de roedores parecem se relacionar melhor com a fisiologia dos macrófagos encontrados na lesão arterial em situações patológicas, tais como as observadas quando essas células são enriquecidas com colesterol (Li et al., 2010). Entretanto, não é conhecido o efeito do exercício aeróbio sobre a expressão de proteínas envolvidas no fluxo de lípidos ao longo do transporte reverso. Tampouco se esse modelo reflete o efeito do treinamento físico na parede arterial.

2. OBJETIVOS

Avaliar o efeito do treinamento físico aeróbio sobre: 1) a expressão de genes envolvidos no fluxo de lípidos, modulação da resposta inflamatória, vasodilatadora e antioxidante *Pparg* (PPAR γ), *Nr1h3* (LXR α), *Nr1h2* (LXR β), *Abca1* (ABCA-1), *Abcg1* (ABCG-1), *Scarb1* (SR-BI), *Cd36* (CD-36), *Olr1* (LOX-1), *Ccl2* (MCP-1), *Tnf* (TNF α), *Il6* (IL-6), *Il10* (IL10), *Nos3* (eNOS) e *Cat* (Catalase) na parede arterial e em macrófagos peritoneais; 2) o efluxo de colesterol de macrófagos peritoneais para HDL e apo A-I e 3) a captação de LDL modificada por macrófagos peritoneais, em camundongos selvagens e transgênicos para CETP humana.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

O protocolo para utilização de animais foi realizado de acordo com a Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), e todos os procedimentos experimentais deste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) [CAPPesq # 441/11].

Duas linhagens de animais foram utilizadas para os procedimentos experimentais deste estudo: camundongos C57BL/6J selvagens e transgênicos para CETP humana (CETP-tg). Os camundongos selvagens foram adquiridos no Centro de Bioterismo da FMUSP. As matrizes de camundongos transgênicos homozigotos para CETP humana (CETP-tg; linhagem 5203), procedentes da Divisão de Medicina Molecular da Universidade de Columbia (Nova York, EUA), foram gentilmente fornecidas pela Prof^a. Dra. Helena C. F. Oliveira, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (Campinas, São Paulo), com o consentimento do Prof. Dr. Alan Tall.

Os animais foram mantidos em biotério convencional da Disciplina de Fisiopatologia Renal da FMUSP, com ciclo de 12h claro/ 12h escuro, temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$, recebendo água e dieta padrão *ad libitum*.

Camundongos machos de ambas linhagens, com 3 meses de idade, foram aleatoriamente divididos em grupos treinado e sedentário, após

determinação do peso corporal, pressão arterial e das concentrações plasmáticas de colesterol total (CT), triglicérides (TG), HDL colesterol (HDL-C) e glicose.

3.2 Treinamento físico

Na semana anterior aos protocolos de treinamento os camundongos dos grupos sedentário e treinado participaram de um programa de adaptação à esteira. Os animais foram colocados em esteira própria para camundongos (WEG, São Carlos, SP, Brasil), por 10 min onde a velocidade inicial foi 8 m/min (metros por minutos) com aumento progressivo até alcançar 15 m/min. Animais de ambos os grupos que não se adaptaram a esse processo foram excluídos do protocolo de treinamento.

O treinamento em esteira teve duração de 30 min por dia, 5 vezes por semana ao longo de 6 semanas, sendo que a primeira foi destinada à adaptação ao exercício físico aeróbio. As sessões foram realizadas sempre ao final da tarde. Cada dia de treinamento consistiu em aquecimento, desenvolvimento e recuperação. Na primeira semana os animais atingiram a velocidade de 12 m/min durante o desenvolvimento. A partir da segunda semana, a velocidade de desenvolvimento foi 15 m/min.

A intensidade do treinamento foi determinada pela sua eficiência em reduzir o desenvolvimento e progressão da aterosclerose (Ramachandran et al., 2005), e melhorar o transporte reverso de colesterol (Rocco et al., 2011).

As coletas de sangue para análises bioquímicas foram realizadas no período final do protocolo de treinamento. Macrófagos e arco aórtico foram

coletados dos animais em duas situações, imediatamente após a última sessão de treinamento físico ou 48h após a última sessão de exercício.

Figura 3 - Organograma do protocolo experimental.

3.3 Dosagens bioquímicas

Foram coletados 200 μ L de sangue da veia caudal de cada animal, em tubos de 2 mL heparinizados, no início e final do período de estudo. Para isso, o corpo dos animais foi envolvido em toalha com dimensão apropriada, excetuando-se a cauda, objetivando-se um procedimento adequado de imobilização e coleta (Conybeare et al., 1988) que foi sempre realizada após 12h de privação alimentar. A determinação de CT, TG e HDL-C no plasma foi realizada por meio de *kits* enzimáticos colorimétricos (Labtest do Brasil). A glicose foi avaliada por glicosímetro Accu Check Performa (Roche do Brasil).

3.4 Mensuração da pressão arterial sistólica caudal - PAc

A mensuração da pressão sistólica caudal é baseada no princípio da detecção da distensão do vaso arterial causada pelo impulso de sangue que flui através da cauda. Um sensor piezoelétrico altamente sensível detecta a distensão causada pelos pulsos e fornece um sinal que representa a relação da alteração (dP/dt) do pulso que foi análogo à velocidade do pulso. O *cuff* de oclusão e o sensor de pulso foram colocados suavemente sobre a cauda. Foram consideradas apenas as medidas obtidas na ausência de movimentação do animal. O aparelho utilizado é da marca *Kent Scientific Corporation*, EUA, modelo RTBP 2045. A medida de PAc foi obtida por meio da média de seis aferições consecutivas, durante dois dias consecutivos.

3.5 Obtenção de lipoproteínas do plasma humano

As lipoproteínas VLDL, LDL e HDL foram separadas para utilização em ensaios de efluxo de colesterol, captação de colesterol e atividade CETP descritos a seguir. Sangue de doadores voluntários normolipidêmicos foi coletado, após jejum de 12 h, em tubos contendo EDTA (1mg/mL) e, imediatamente, centrifugado a 4°C, 3000 rpm para separação do plasma. Todos os voluntários foram informados quanto ao risco mínimo do procedimento e assinaram termo de consentimento informado. Os seguintes conservantes foram adicionados ao plasma: aprotinina (10µL/mL), benzamidina 2 mM (5 µL/mL), gentamicina 0,5%: cloranfenicol 0,25% (20 µL/mL) e fluoreto de fenilmetilsulfonila (0,5 µL/mL).

As lipoproteínas foram isoladas do plasma por ultracentrifugação sequencial utilizando-se rotor 50 Ti, ultracentrífuga Beckman modelo L-8 (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, EUA), de acordo com sua densidade (d), VLDL + LDL, $d < 1,063 \text{ g / mL}$; HDL, $d = 1,063 - 1,21 \text{ g / mL}$ (Havel et al., 1955). A densidade do plasma foi ajustada para as respectivas frações das lipoproteínas com brometo de potássio (KBr) sólido e ultracentrifugado a 100.000 g a 4°C : VLDL + LDL (20 h) e HDL (40 h). As lipoproteínas isoladas foram posteriormente, dialisadas contra tampão fosfato (NaCl 0,9%, Na_2HPO_4 0,3%, NaH_2PO_4 0,2%, NaOH 0,38% e EDTA 0,01%), pH 7,4, por 24 h, e posteriormente foi determinado seu conteúdo em CT e TG. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951).

3.6 Marcação da HDL com [^{14}C]-colesteril oleato

Após a separação das lipoproteínas, a fração de HDL foi marcada com colesterol esterificado [$4\text{-}^{14}\text{C}$]-colesteril oleato ([^{14}C]-CE) (PerkinElmer, Boston, MA, EUA) segundo o método de Gavish e et al. (1987). Após verificar a pureza do isótopo por cromatografia de camada fina (TLC – *Thin-Layer Chromatography*), o isótopo [^{14}C]-CE dissolvido em tolueno foi seco sob fluxo de nitrogênio, rediluído em $100 \mu\text{L}$ de etanol, e adicionado gota a gota ao infranadante do plasma de $d \geq 1,063 \text{ g / mL}$, sob agitação lenta. A mistura foi incubada em banho-maria com agitação a 37°C por 24 h. Após o período de incubação, a densidade da mistura foi ajustada com KBr sólido ($1,21 \text{ g / mL}$) e ultracentrifugada a 100.000 g e a 4°C . As HDL marcadas foram dialisadas exaustivamente contra tampão fosfato contendo EDTA (0,01%, pH 7,4), filtradas

com filtros Millipore estéreis de 0,22 μm , e determinada sua composição em CT, TG e proteína. Subsequentemente, foram utilizadas em ensaio de atividade da CETP.

3.7 Determinação da atividade da proteína de colesterol esterificado (CETP)

A atividade da enzima CETP foi mensurada ao início e final do protocolo experimental nos animais CETP-tg. A atividade foi verificada com propósito de assegurar que a prole utilizada como amostra nos experimentos expressava o fenótipo CETP. Para tanto, foi utilizado método isotópico, baseado na transferência de ^{14}C -colesterol esterificado ($[^{14}\text{C}]\text{-CE}$) de lipoproteínas doadoras ($\text{HDL}_2 + \text{HDL}_3$) para lipoproteínas aceptoras de colesterol ($\text{LDL} + \text{VLDL}$), ambas de fonte exógena (plasma humano), na presença do plasma dos animais como fonte de CETP.

Lipoproteínas foram diluídas em tampão Tris (pH 7,4) a fim de atingirem concentrações finais de CT de 200 mg / dL em $\text{VLDL} + \text{LDL}$ e de 40 mg / dL em $^{14}\text{C}\text{-HDL}$. Em seguida, incubadas utilizando 200 μL de $\text{VLDL} + \text{LDL}$, 50 μL de $^{14}\text{C}\text{-HDL}$ e 40 μL de tampão Tris na presença de 10 μL do plasma dos animais como fonte de CETP. As incubações foram realizadas a 37°C por 2 h. Após esse período, as lipoproteínas que contêm apo B (VLDL e LDL) foram precipitadas com 30 μL de solução de sulfato de dextrana- MgCl_2 (1:1), centrifugadas a 1.000 g por 30 min e sobrenadante (200 μL) coletado para a contagem da radioatividade. A porcentagem de transferência de $[^{14}\text{C}]\text{-CE}$ das frações de HDL para as LP que contêm apoB foi calculada a partir da fórmula:

$$\% \text{ transferência de } [^{14}\text{C}]\text{-CE} = [1 - (\text{contagem da radioatividade a } 37^\circ\text{C} / \text{contagem da radioatividade do branco})] \times 100.$$

3.8 Acetilação de LDL

As LDL foram acetiladas segundo protocolo descrito por BASU et al. (1976). Foram utilizados 16 mg de proteínas de LDL, aos quais foram adicionados 1 mL de solução saturada de acetato de sódio e 1 mL de NaCl 0,15 M, sob agitação constante e banho de gelo. Foram então adicionados 24 µL de anidrido acético em pequenas quantidades durante 1 h, seguido de 30 min de agitação em banho de gelo. A seguir, a LDL acetilada foi dialisada contra PBS e esterilizada em filtro 0,22 µm. A concentração final de proteína da amostra foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951).

3.9 Obtenção de macrófagos de peritônio e arcos aórticos

Após eutanásia em câmara de CO₂, macrófagos de peritônio de animais selvagens e CETP-tg foram isolados da cavidade peritoneal através de injeção de PBS. As células foram centrifugadas, avaliadas quanto a sua viabilidade celular e incubadas em placas de cultura celular. Após remoção das células do peritônio, os camundongos foram submetidos a uma toracolaparotomia crânio-caudal, objetivando-se a extração do coração e artéria aorta. Com auxílio de um estereoscópio, o coração e artéria aorta foram dissecados e transcordialmente perfundidos com solução gelada de cloreto de sódio 0,9%. As amostras foram

imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, onde permaneceram armazenadas até realização dos ensaios de RT-PCR.

3.10 Determinação do efluxo de ^{14}C -colesterol em macrófagos, mediado por HDL₂ e apo A-I

Para obtenção de macrófagos intraperitoneais, após eutanásia em câmara de CO₂, animais sedentários e treinados receberam de injeção de PBS contendo antibióticos na cavidade peritoneal. Estas células foram isoladas e levadas à centrifugação (4°C – 1000 rpm), o botão celular foi ressuspenso em meio 500 µL de RPMI (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil), 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA), 100 U/mL de penicilina (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA) e 2 mM glutamina (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA). As células foram contadas, avaliadas quanto a sua viabilidade e incubadas em placas de cultura com 96 cavidades (0,25 x 10⁶ células por cavidade) em estufa com atmosfera de CO₂ 5%, a 37°C por 24 h. Em seguida, as células foram acrescidas com 50 µg de LDL acetilada/mL e 0,3 µCi de ^{14}C -colesterol/mL, durante 30 h. Após cuidadosa lavagem com tampão fosfato (PBS - NaCl 150 mmol/L, Na₂HPO₄ 20 mmol/L, NaH₂PO₄ 14 mmol/L, NaOH 1mmol/L - pH 7,4) com FAFA, as células foram tratadas, por 18 h, com meio DMEM (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA). Após lavagem com PBS/FAFA, as células foram mantidas por 12 h apenas com DMEM/FAFA ou com DMEM/FAFA acrescido de 0,5 mM de 8-Br AMPc (8-Bromoadenosine 3', 5'-cyclic monophosphate; Sigma) ou T0901317 (Sigma) para indução da

transcrição gênica de ABCA-1. A seguir, após lavagem, as células foram incubadas por 8 h e 24 h com apo A-I (30 µg/mL; Sigma) ou HDL₂ (50 µg/mL) por mL de DMEM (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA) para determinação do efluxo de colesterol.

A quantidade de radioatividade presente no meio, ao final do período de incubação, indica o efluxo basal de colesterol mediado pela apo A-I e HDL₂. O meio de cultura foi transferido para frascos de cintilação, seguindo-se a adição de solução contadora. As cavidades das placas foram lavadas com solução fisiológica gelada. Os lípides celulares foram extraídos com solução de hexana:isopropanol (3:2) e posteriormente transferidos para frascos de cintilação. Após a evaporação do solvente foi adicionada a solução contadora para a determinação da radioatividade. Os valores obtidos em incubações na presença de apo A-I e HDL₂ foram subtraídos daqueles obtidos apenas com meio de equilíbrio, de maneira a refletir o efluxo específico, mediado por apo A-I ou HDL₂. A porcentagem de efluxo foi calculada como:

$$\frac{{}^{14}\text{C-colesterol no meio}}{{}^{14}\text{C-colesterol no meio} + {}^{14}\text{C-colesterol na célula}} \times 100$$

3.11 Determinação da captação de LDL acetilada por macrófagos

Camundongos sedentários e treinados das duas linhagens foram sacrificados em câmara de CO₂ após 48 horas do último dia de treinamento. Macrófagos foram isolados desses animais por meio de injeção intraperitoneal de PBS com antibióticos. Após contagem e avaliação da sua viabilidade celular,

os macrófagos foram incubados em placas de cultura celular de 96 poços (0,15 x 10⁶ células por cavidade) e mantidos em estufa de CO₂ 5% a 37° por 24h. Em seguida foram incubados com 50 µg de LDL acetilada/mL marcada com ³H-colesteril-oleoil-eter (³H-COE), de acordo com método estabelecido por Terpstra et al. (1989), ao longo de 6h. Ao final deste período, as células foram incubadas com NaOH 0,2 N por 3 horas em agitação. O conteúdo sobrenadante foi separado para contagem de radioatividade e dosagem de proteína. A captação de LDL (microgramas) é expressa por mg de proteína celular, levando-se em conta a atividade específica da LDL radiomarcada.

3.12 Análise da expressão gênica relativa por reação de polimerase em cadeia (PCR)

3.12.1 Preparação dos tecidos e extração de RNA

Macrófagos de peritônio de camundongo foram centrifugados a 4°C (1000 rpm). Após formação do botão celular foram ressuspensos em 1 mL de Tryzol (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, EUA). A presença das bandas correspondentes aos RNA ribossomais 18 e 28s foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio 3,0 µg/mL, seguindo-se visualização em transiluminador (203 nm). As aortas foram armazenadas em tubos de congelamento em galão de nitrogênio líquido. As amostras foram maceradas e ressuspensas em 1 mL de Trizol. A presença das bandas correspondentes aos RNA ribossomais 18 e 28s foi realizada por 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, EUA). Para a extração de RNA, foi utilizado

o *kit* RNA Isolation Qiagen RNeasy Mini Columns (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha).

3.12.2 Quantificação do conteúdo do mRNA

A quantificação do conteúdo de mRNA de *Abca1*, *Abcg1*, *Scarb1*, *Nr1h3*, *Nr1h2*, *Pparg*, *Il10*, *Il6*, *Tnf*, *Ccl2*, *Cd36*, *Olr1*, *Cat* e *Enos* foi realizada por transcrição reversa seguida de reação de polimerase em cadeia em tempo real quantitativo (qRT-PCR), utilizando o sistema de amplificação *TaqMan Two Step RT-PCR* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A primeira etapa do RT-PCR consiste na transcrição reversa, ou seja, síntese de cDNA a partir de aproximadamente 100 ng do RNA extraído dos macrófagos de peritônio e artéria aorta dos animais treinados e sedentários mantido em Trizol. Para este procedimento foi utilizado o *kit High Capacity RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems). A reação foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research Inc, Watertown, Massachusetts, EUA), de acordo com o protocolo do fornecedor (60 min a 37°C, 5 min a 95°C, seguido de incubação 4°C). O cDNA obtido foi armazenado a -20 °C até a realização do PCR. A segunda etapa consiste na análise de expressão gênica por amplificação do cDNA em tempo real. Foram utilizadas sondas marcadas com FAM (*6-carboxy-fluorescein*) adquiridas no formato *TaqMan Gene Expression Assays* (Applied Biosystems). A escolha do normalizador para a reação com macrófagos foi baseada em estudos anteriores de nosso laboratório, que demonstraram que a β -actina (*Atcb*) é um controle endógeno adequado para esse tipo celular. Para a escolha de um normalizador adequado para os ensaios em aorta, realizamos ensaios com quatro genes endógenos descritos na literatura, e selecionamos o mais estável, *Gapdh*. Na

seleção das sondas, a amplificação das junções exônicas foram cuidadosamente selecionadas a fim de reduzir o impacto de contaminação por DNA genômico. Utilizou-se solução denominada *Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems) para a reação de PCR em tempo real realizada no aparelho *StepOnePlus Real Time PCR System* (Applied Biosystems). Os dados foram analisados utilizando-se o programa *StepOne Software 2.0* (Applied Biosystems) que gera curvas logarítmicas dos sinais de amplificação. O programa fornece o parâmetro ciclo em que o sinal de fluorescência é significativo, denominado *ciclo threshold* (Ct) (Bustin e Mueller, 2005; Kubista et al., 2006). Para cada amostra de cDNA, o Ct de cada gene é registrado e comparado com o controle endógeno escolhido. Os valores de expressão gênica foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, no qual $\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ do controle endógeno}$, considerando-se a eficiência do ensaio (90 a 110%) (Livak e Schmitgen, 2001).

3.13 Análise estatística

As comparações entre os grupos treinado e sedentário foram realizadas pelo teste t de *Student* não pareado. Análises realizadas no programa GraphPad Prisma Versão 4.0, considerando-se como significantes todas as situações nas quais o nível descritivo de significância for inferior a 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 Animais selvagens

O peso corporal e concentrações plasmáticas de colesterol total (CT), triglicérides (TG), HDL-C e glicose foram semelhantes entre os grupos de animais selvagens sedentário e treinado, nos períodos basal e final (**Tabela1**).

Tabela 1 - Peso, concentrações plasmáticas de lípides e glicose dos animais selvagens sedentários e treinados nos períodos basal e final.

	Período	Sedentário (n = 69)			Treinado (n = 66)			P
Peso (g)	Basal	26,3	±	3,4	26,1	±	3,4	0,736
	Final	27,7	±	4,5	27,4	±	3,6	0,645
CT (mg/dL)	Basal	107	±	20	110	±	14	0,442
	Final	109	±	20	104	±	19	0,298
TG (mg/dL)	Basal	70	±	21	74	±	19	0,428
	Final	58	±	13	58	±	16	0,897
HDL (mg/dL)	Basal	83	±	4	81	±	5	0,447
	Final	83	±	11	69	±	5	0,093
Glicose (mg/dL)	Basal	95	±	19	93	±	20	0,222
	Final	106	±	23	104	±	25	0,707

O plasma foi separado de sangue coletado da veia caudal em tubos heparinizados. As dosagens bioquímicas foram realizadas por *kits* enzimáticos (Roche do Brasil e Labtest do Brasil), utilizando-se o plasma de cada animal, excetuando-se as dosagens de HDL-C que foram realizadas com o *pool* de plasma dos animais. As comparações entre os grupos foram realizadas por Teste t de *Student* não pareado (média+DP).

A pressão arterial os animais selvagens sedentários e treinados foi similar no período que antecedeu o protocolo de treinamento. Após intervenção, observou-se, apenas no grupo que realizou treinamento, a redução da pressão arterial caudal (**Figura 4**).

Figura 4 - Pressão arterial de animais selvagens sedentários e treinados. A pressão arterial foi aferida nos animais sedentários e treinados antes e depois do protocolo de treinamento. A análise estatística foi realizada por Test t de *Student* pareado (média $\pm$ DP).

Avaliou-se, em macrófagos isolados da cavidade peritoneal, a expressão de mRNA (qRT-PCR) de genes envolvidos no efluxo de colesterol celular e modulação da resposta inflamatória, vasodilatadora e antioxidante. Todos os genes foram avaliados utilizando-se a β -actina (*Actb*) como gene controle endógeno. As análises foram realizadas com macrófagos colhidos imediatamente após a última sessão de treinamento (tempo 0 h), ou após 48 h a última sessão de treinamento.

Observou-se que o mRNA de *Cd36* (**Figura 5A**) e *Olr1* (**Figura 5B**), envolvidos na captação de LDL modificadas, foi reduzido pelo treinamento físico no tempo 0 h. Entretanto, no tempo 48 h, a expressão destes genes foi semelhante entre os grupos sedentário e treinado.

O mRNA de *Scarb1*, receptor de HDL no fígado e órgãos esteroidogênicos, mas também receptor de LDL modificada em macrófagos, foi similar entre macrófagos isolados de animais sedentários e treinados no tempo 0 h. Não obstante, apresentou maior expressão nas células isoladas após 48 h nos animais submetidos a treinamento físico em comparação aos sedentários (**Figura 5C**).

O exercício físico reduziu o mRNA de genes que transcrevem os receptores de HDL, *Abca1* e *Abcg1* (**Figura 6A e B**) no tempo 0 h, e de genes envolvidos no controle da transcrição desses receptores, como *Pparg*, *Nr1h3*, *Nr1h2* (**Figura 7A, B e C**). Em todos esses casos, não se observou diferença nos macrófagos isolados após 48 h de exercício físico (**Figuras 6 e 7**).

A)

0h

48h

B)

0h

48h

C)

0h

48h

Figura 5 - Expressão de mRNA de *Cd36*, *Olr1* e *Scarb1* em macrófagos peritoneais de animais selvagens por RT-PCR em tempo real. O cDNA foi obtido a partir de 100 ng de RNA extraído de macrófagos. Para a amplificação do cDNA foram utilizadas sondas adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) identificadas pelo código Mm01135198_m1 (*Cd36*), Mm00454586_m1 (*Olr1*) e Mm00450234_m1 (*Scarb1*). O gene da β -actina (*Actb* – Mm00607939_s1) foi escolhido como normalizador da reação de PCR. Às sondas e ao cDNA, foi adicionada a solução Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) e a reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Os valores de expressão gênica foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, no qual $\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ do controle endógeno}$. Teste t de *Student* (média $\pm$ EP). A) *Cd36* - 0h $p < 0,05$, 48h $p = 0,5312$. B) *Olr1* - 0h $p < 0,05$, 48h $p = 0,4091$. C) *Scarb1* - 0h $p = 0,2780$, 48h $p < 0,05$.

Figura 6 - Expressão de mRNA de *Abca1* e *Abcg1* em macrófagos peritoneais dos animais selvagens por RT-PCR em tempo real. O cDNA foi obtido a partir de 100 ng de RNA extraído de macrófagos. Para a amplificação do cDNA foram utilizadas sondas adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) identificadas pelo código Mm00442646_m1 (*Abca1*) e Mm00437390_m1 (*Abcg1*). O gene da β -actina (*Actb* - Mm00607939_s1) foi escolhido como normalizador da reação de PCR. Às sondas e ao cDNA, foi adicionada a solução Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) e a reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Os valores de expressão gênica foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, no qual $\Delta C_t = C_t \text{ gene alvo} - C_t \text{ do controle endógeno}$. Teste t de *Student* (média $\pm$ EP). A) *Abca1* - 0h $p < 0,05$, 48h $p = 0,7980$. B) *Abcg1* - 0h $p < 0,05$, 48h $p = 0,2496$.

A)

0h

48h

B)

0h

48h

C)

0h

48h

Figura 7 - Expressão de mRNA de *Pparg*, *Nr1h3* e *Nr1h2* em macrófagos peritoneais dos animais selvagens por RT-PCR em tempo real. O cDNA foi obtido a partir de 100 ng de RNA extraído de macrófagos. Para a amplificação do cDNA foram utilizadas sondas adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) identificadas pelo código Mm01184322_m1 (*Pparg*), Mm01329744_g1 (*Nr1h3*) e Mm00437265_g1 (*Nr1h2*). O gene da β -actina (*Actb* - Mm00607939_s1) foi escolhido como normalizador da reação de PCR. Às sondas e ao cDNA, foi adicionada a solução Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) e a reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Os valores de expressão gênica foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, no qual $\Delta C_t = C_t \text{ gene alvo} - C_t \text{ do controle endógeno}$. Teste t de *Student* (média $\pm$ EP). A) *Pparg* – 0 h $p < 0,05$, 48 h $p = 0,5312$. B) *Nr1h3* – 0 h $p < 0,05$, 48 h $p = 0,4091$. C) *Nr1h2* – 0 h $p < 0,05$, 48 h $p = 0,1089$.

A expressão da quimiocina *Ccl2* foi semelhante em macrófagos isolados em ambos os grupos, nos tempos 0 h e 48 h (**Figura 8A**). Em comparação aos animais selvagens sedentários, os treinados apresentaram redução do mRNA de *Tnf* nos macrófagos colhidos imediatamente após última sessão de treinamento (tempo 0h) e esse efeito foi abolido em 48 h (**Figura 8 B**). O mRNA de *Il6*, embora tenha apresentado uma tendência a redução no grupo treinado em 0 h, não foi diferente entre os grupos tanto em 0 h como em 48 h (**Figura 8 C**). A expressão de *Il10*, interleucina reconhecida pelo seu papel anti-inflamatório, foi aumentada pelo exercício em macrófagos em ambos os tempos (0 h e 48 h) (**Figura 8D**).

O mRNA de *Cat*, enzima antioxidante, teve expressão semelhante nos grupos sedentário e treinado, em ambos os tempos (**Figura 8E**).

A)

0h

48h

B)

0h

48h

C)

0h

48h

Figura 8 - Expressão de mRNA de *Ccl2*, *Tnf*, *Il6*, *Il10* e *Cat* em macrófagos peritoneais dos animais selvagens por RT-PCR em tempo real. O cDNA foi obtido a partir de 100 ng de RNA extraído de macrófagos. Para a amplificação do cDNA foram utilizadas sondas adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) identificadas pelo código Mm00441242_m1 (*Ccl2*), Mm00450234_m1 (*Tnf*), Mm00450234_m1 (*Il6*), Mm00450234_m1 (*Il10*) e Mm00443258_m1 (*Cat*). O gene da β -actina (*Actb* - Mm00607939_s1) foi escolhido como normalizador da reação de PCR. Às sondas e ao cDNA, foi adicionada a solução Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) e a reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Os valores de expressão gênica foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, no qual $\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ do controle endógeno}$. Teste t de *Student* (média $\pm$ EP). A) *Ccl2* - 0h $p = 0,6597$, 48h $p = 0,6842$. B) *Tnf* - 0h $p < 0,05$, 48h $p = 0,3951$. C) *Il6* - 0h $p = 0,0658$, 48h $p = 0,4946$. D) *Il10* - 0h $p < 0,05$, 48h $p < 0,05$. E) *Cat* - 0h $p = 0,0793$, 48h $p = 0,5987$.

Avaliou-se na aorta de animais selvagens, a expressão de mRNA dos mesmos genes avaliados em macrófagos peritoneais, além do mRNA de *Nos3*. Neste caso, todos os genes foram avaliados utilizando-se o gene *Gapdh* como controle endógeno. O tempo de coleta deste tecido foi o mesmo realizado no isolamento de macrófagos (0 h e 48 h).

A expressão de *Cd36* e *Olr1* foi aumentada pelo treinamento físico nas aortas isoladas imediatamente após a última sessão de exercício (**Figura 9A e B**). A expressão de *Olr1* permaneceu elevada no grupo treinado nas artérias isoladas após 48 h, enquanto a do mRNA de *Cd36* nesse período foi semelhante entre sedentários e treinados. A expressão de SR-BI foi semelhante nos animais sedentários e treinados no tempo 0 h (**Figura 9C**). O mesmo foi observado no mRNA de *Abca1* e *Abcg1* no tempo 0 h. Em 48 h, somente a expressão de *Abcg1* foi maior no grupo que realizou treinamento (**Figura 10A e B**).

O mRNA de *Pparg* e *Nr1h3* na aorta de animais treinados foi maior que nos animais sedentários no tempo 0 h (**Figura 11A e B**). Em 48 h, o mRNA de *Pparg* dos grupos sedentário e treinado foi semelhante. A expressão de *Nr1h3* foi reduzida pelo treinamento em 48 h. Não foi observada diferença na expressão de *Nr1h2* entre os grupos nos tempos 0 h e 48 h (**Figura 11C**).

A)

0h

48h

B)

0h

48h

C)

0h

48h

Figura 9 - Expressão de mRNA de *Cd36*, *Olr1* e *Scarb1* no arco aórtico dos animais selvagens por qRT-PCR em tempo real. O cDNA foi obtido a partir de 100 ng de RNA extraído da aorta. Para a amplificação do cDNA foram utilizadas sondas adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) identificadas pelo código Mm01135198_m1 (*Cd36*), Mm00454586_m1 (*Olr1*) e Mm00450234_m1 (*Scarb1*). O gene da *Gapdh* (Mm99999915_g1) foi escolhido como normalizador da reação de PCR. Às sondas e ao cDNA, foi adicionada a solução Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) e a reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Os valores de expressão gênica foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, no qual $\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ do controle endógeno}$. Teste t de *Student* (média $\pm$ EP). A) *Cd36* - 0h p < 0,05, 48h p = 0,2801. B) *Olr1* - 0h p < 0,05, 48h p < 0,05. C) *Scarb1* - 0h p = 0,4196, 48h p = 0,3889.

Figura 10 - Expressão de mRNA de *Abca1* e *Abcg1* no arco aórtico dos animais selvagens por qRT-PCR em tempo real. O cDNA foi obtido a partir de 100 ng de RNA extraído da aorta. Para a amplificação do cDNA foram utilizadas sondas adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) identificadas pelo código Mm00442646_m1 (*Abca1*) e Mm00437390_m1 (*Abcg1*). O gene da *Gapdh* (Mm99999915_g1) foi escolhido como normalizador da reação de PCR. Às sondas e ao cDNA, foi adicionada a solução Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) e a reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Os valores de expressão gênica foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, no qual $\Delta C_t = C_t \text{ gene alvo} - C_t \text{ do controle endógeno}$. Teste t de Student (média $\pm$ EP). A) *Abca1* - 0h p = 0,2291, 48h p = 0,9951. B) *Abcg1* - 0h p = 0,8324, 48h p < 0,05.

A)

0h

48h

B)

0h

48h

C)

0h

48h

Figura 11 - Expressão de mRNA de *Pparg*, *Nr1h3* e *Nr1h2* no arco aórtico dos animais selvagens por qRT-PCR em tempo real. O cDNA foi obtido a partir de 100 ng de RNA extraído da aorta. Para a amplificação do cDNA foram utilizadas sondas adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) identificadas pelo código Mm01184322_m1 (*Pparg*), Mm01329744_g1 (*Nr1h3*) e Mm00437265_g1 (*Nr1h2*). O gene *Gapdh* (Mm99999915_g1) foi escolhido como normalizador da reação de PCR. Às sondas e ao cDNA, foi adicionada a solução Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) e a reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Os valores de expressão gênica foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, no qual $\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ do controle endógeno}$. Teste t de *Student* (média $\pm$ EP). A) *Pparg* - 0h $p < 0,05$, 48h $p = 0,6935$. B) *Nr1h3* - 0h $p < 0,05$, 48h $p < 0,05$. C) *Nr1h2* - 0h $p = 0,7786$, 48h $p = 0,1988$.

O mRNA de *Ccl2* foi semelhante nos dois grupos no tempo 0 h, entretanto foi maior no grupo treinado em 48 h (**Figura 12A**). A expressão dos genes de *Tnf* e *Il6* não foi modificada pelo exercício nos dois tempos (**Figura 12B e C**).

A expressão de *Il10* foi acentuadamente reduzida pelo treinamento físico, nos tempos 0 h e 48 h (**Figura 12D**).

O mRNA da *Cat*, foi maior no grupo treinado no tempo 0 h e similar nos grupos sedentário e treinado em 48 h (**Figura 12E**). A expressão da enzima vasodilatadora *Nos3* foi semelhante nos dois grupos no tempo 0 h e 48 h (**Figura 12F**).

D)

0h

48h

E)

0h

48h

F)

0h

48h

Figura 12 - Expressão de mRNA de *Ccl2*, *Tnf*, *Il6*, *Il10*, *Cat* e *Nos3* no arco aórtico dos animais selvagens por qRT-PCR em tempo real. O cDNA foi obtido a partir de 100 ng de RNA extraído da aorta. Para a amplificação do cDNA foram utilizadas sondas adquiridas no formato *TaqMan Gene Expression Assays* (Applied Biosystems) identificadas pelo código Mm01135198_m1 (*Ccl2*), Mm00443258_m1 (*Tnf*), Mm00446190_m1 (*Il6*), Mm00439614_m1 (*Il10*), Mm01340247_m1 (*Cat*) e Mm00435217_m1 (*Nos3*). O gene *Gapdh* (Mm99999915_g1) foi escolhido como normalizador da reação de PCR. Às sondas e ao cDNA, foi adicionada a solução *Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems) e a reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho *StepOnePlus Real Time PCR System* (Applied Biosystems). Os valores de expressão gênica foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, no qual $\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ do controle endógeno}$. Teste t de *Student* (média $\pm$ EP). A) *Ccl2* 0h p = 0,1238, 48h p < 0,05. B) *Tnf* - 0h p = 0,1336, 48h p = 0,2868. C) *Il6* - 0h p = 1,000, 48h p = 0,8631. D) *Il10* 0h p < 0,05, 48h p < 0,05. E) *Cat* - 0h p < 0,05, 48h p = 0,6066. F) *Nos3* 0h p < 0,5319, 48h p = 0,7124.

Tabela 2 - Efeito do exercício sobre a expressão de receptores de fluxo de lípidos, resposta inflamatória, antioxidante e vasodilatadora animais selvagens.

Animais Selvagens					
Efeito do exercício físico sobre a expressão de mRNA em macrófagos					
0h		P	48h		P
<i>Pparg</i>	↓	0,1061	<i>Pparg</i>	-	0,5312
<i>Nr1h3</i>	↓	0,0088	<i>Nr1h3</i>	-	0,4091
<i>Nr1h2</i>	↓	0,0092	<i>Nr1h2</i>	-	0,1089
<i>Abca1</i>	↓	0,0006	<i>Abca1</i>	-	0,7980
<i>Abcg1</i>	↓	0,0380	<i>Abcg1</i>	-	0,2496
<i>Scarb1</i>	-	0,2780	<i>Scarb1</i>	↑	0,0407
<i>Cd36</i>	↓	0,0072	<i>Cd36</i>	-	0,5835
<i>Olr1</i>	↓	0,0464	<i>Olr1</i>	-	0,7792
<i>Ccl2</i>	-	0,6597	<i>Ccl2</i>	-	0,6842
<i>Tnf</i>	↓	0,0218	<i>Tnf</i>	-	0,3951
<i>Il6</i>	-	0,0658	<i>Il6</i>	-	0,4946
<i>Il10</i>	↓	0,0163	<i>Il10</i>	↑	0,0052
<i>Cat</i>	-	0,0793	<i>Cat</i>	-	0,5987
Efeito do exercício físico sobre a expressão de mRNA na Aorta					
0h		P	48h		P
<i>Pparg</i>	↑	0,0016	<i>Pparg</i>	-	0,6936
<i>Nr1h3</i>	↑	0,0187	<i>Nr1h3</i>	↓	< 0,0001
<i>Nr1h2</i>	-	0,7786	<i>Nr1h2</i>	-	0,1988
<i>Abca1</i>	-	0,2291	<i>Abca1</i>	-	0,9951
<i>Abcg1</i>	-	0,8324	<i>Abcg1</i>	↑	0,0124
<i>Scarb1</i>	-	0,4196	<i>Scarb1</i>	-	0,3889
<i>Cd36</i>	↑	0,0070	<i>Cd36</i>	-	0,2801
<i>Olr1</i>	↑	0,0130	<i>Olr1</i>	↑	0,0092
<i>Ccl2</i>	-	0,1238	<i>Ccl2</i>	↑	0,0024
<i>Tnf</i>	-	0,1336	<i>Tnf</i>	-	0,2868
<i>Il6</i>	-	1,0000	<i>Il6</i>	-	0,8631
<i>Il10</i>	↓	0,0108	<i>Il10</i>	↓	< 0,0001
<i>Cat</i>	↑	0,0211	<i>Cat</i>	-	0,6066
<i>Nos3</i>	-	0,5319	<i>Nos3</i>	-	0,7124

Análise estatística por Test t de Student (média ±EP).

Macrófagos peritoneais, isolados dos animais sedentários e treinados 48 h após último treino, foram utilizados para investigar a remoção de ^{14}C -colesterol mediada por apoA-I e subfrações de HDL. Esses ensaios permitem inferir a funcionalidade dos receptores ABCA-1 e ABCG-1, respectivamente, frente ao exercício físico aeróbio regular. Não houve diferença na remoção de ^{14}C -colesterol mediada por apo A-I, em 8 h e 24 h (**Figura 13**).

De modo semelhante, também não houve diferença no efluxo de ^{14}C -colesterol mediado por HDL₂ (8 h e 24 h) quando compararam-se macrófagos isolados de animais sedentários e treinados (**Figura 14**).

Figura 13 - Efluxo de ^{14}C -colesterol, mediado por apo A-I, de macrófagos isolados do peritônio de camundongos selvagens sedentários e treinados. Macrófagos, isolados da cavidade peritoneal de camundongos selvagens sedentários e treinados, após 48 h da última sessão de exercício, foram enriquecidos com LDL acetilada e ^{14}C -colesterol por 30 h. O efluxo de ^{14}C -colesterol foi determinado, após 8 h e 24 h, de exposição a 30 μg de apo A-I. As comparações foram feitas pelo test t de *Student* não pareado (média $\pm$ DP).

Figura 14 - Efluxo de ^{14}C -colesterol, mediado por HDL₂, de macrófagos de peritônio de camundongos selvagens sedentários e treinados. Macrófagos, isolados da cavidade peritoneal de camundongos selvagens sedentários e treinados, após 48 h da última sessão de exercício, foram enriquecidos com LDL acetilada e ^{14}C -colesterol por 30 h. O efluxo de ^{14}C -colesterol foi determinado, após 8 h e 24 h, de exposição a 50 μg de HDL₂. Análise estatística por test t de *Student* não pareado (média $\pm$ DP).

Dando continuidade aos ensaios que visaram verificar o efeito do exercício físico aeróbio sobre o fluxo de lípides em macrófagos peritoneais, avaliou-se a captação de LDL-colesterol nestas células. Para tanto, as células foram incubadas com ^3H -COE-LDL acetilada. O ^3H -COE é um análogo de colesterol esterificado que uma vez no macrófago, não pode ser removido, pois não sofre hidrólise e não é convertido em forma livre disponível à exportação. Corroborando os resultados observados nos ensaios de efluxo de colesterol, como podemos observar na **Figura 15**, não houve diferença na captação de ^3H -COE-LDL acetilada entre os animais treinados e sedentários.

Figura 15 - Captação de $^3\text{H-COE-LDL}$ acetilada por macrófagos peritoneais de camundongos selvagens sedentários e treinados. Macrófagos, isolados da cavidade peritoneal de camundongos selvagens sedentários e treinados, após 48 h da última sessão de exercício, foram incubados em placas de cultura celular de 96 poços ($0,15 \times 10^6$ células por cavidade) e mantidos em estufa de CO_2 5% a 37° por 24h. Em seguida foram incubados com $50 \mu\text{g}$ de LDL acetilada / mL marcada com ^3H -colesteril-oleoil-eter-LDL ($^3\text{H-COE-LDL}$), por 6 h. Ao final deste período, as células foram incubadas com NaOH 0,2 N por 3 h em agitação. O conteúdo sobrenadante foi separado para contagem de radioatividade e dosagem de proteína. As comparações foram feitas pelo test t de *Student* não pareado (média $\pm$ DP).

4.2 Animais CETP-tg

O protocolo de treinamento físico não interferiu no peso, concentração de lípidos e glicose plasmáticos e atividade CETP dos animais CETP-tg. Também não se observou diferença na atividade de CETP, a proteína que promove a transferência de colesterol esterificado das HDL para as lipoproteínas contendo apoB em troca de TG (**Tabela 2**).

Tabela 3 - Peso e concentrações plasmáticas de lípides e glicose dos animais CETP-tg sedentários e treinados nos períodos basal e final.

	Período	Sedentário (n = 50)			Treinado (n = 52)			P
Peso (g)	Basal	23,5	±	1,8	23,5	±	2,0	0,903
	Final	25,2	±	2,1	24,7	±	2,5	0,890
CT (mg/dL)	Basal	81	±	18	80	±	15	0,841
	Final	75	±	12	76	±	12	0,652
TG (mg/dL)	Basal	53	±	14	47	±	17	0,223
	Final	48	±	12	48	±	13	0,923
HDL (mg/dL)	Basal	51	±	5	53	±	7	0,525
	Final	50	±	5	56	±	7	0,147
Glicose (mg/dL)	Basal	88	±	12	89	±	13	0,974
	Final	107	±	12	108	±	18	0,383
% Atividade CETP	Basal	31,8	±	4,1	32,3	±	8,2	0,794
	Final	33,3	±	7,2	34,0	±	9,7	0,798

O plasma foi separado de sangue coletado da veia caudal em tubos heparinizados. As dosagens bioquímicas foram realizadas por kit enzimáticos (Roche do Brasil e Labtest do Brasil), utilizando-se o plasma de cada animal, excetuando-se as dosagens de HDL-C que foram realizadas com o pool de plasma dos animais. A atividade da CETP foi determinada por teste radioisotópico, conforme descrito em material e métodos. As comparações entre os grupos foram realizadas por Teste t de *Student* não pareado (média+DP).

Não foram observadas diferenças na pressão arterial entre os grupos sedentários e treinados tanto no período basal como no período pós-treinamento (**Figura 16**).

Figura 16 - Pressão arterial de animais CETP-tg sedentários e treinados. A pressão arterial foi aferida nos animais sedentários e treinados antes e depois do protocolo de treinamento. A análise estatística foi realizada por Test t de *Student* pareado (média $\pm$ DP).

Avaliou-se a expressão dos genes supracitados nos macrófagos de animais CETP-tg. O gene normalizador para as reações foi o *Actb* (β -actina). Neste modelo animal, o treinamento físico promoveu respostas diferentes na expressão gênica em relação ao modelo selvagem.

A expressão dos receptores *scavenger*, *Cd36*, *Olr1* e *Scarb1* foi semelhante entre os grupos sedentários e treinados nos dois tempos (**Figura 17A, B e C**).

O grupo treinado apresentou maior expressão do mRNA de *Abca1* no tempo 0 h em comparação ao grupo sedentário, mas em 48 h a expressão deste receptor foi similar nos dois grupos. Não houve diferença entre os grupos na expressão de *Abcg1* tanto no tempo 0 h como em 48 h (**Figura 18A e B**).

A expressão de *Pparg* foi maior no grupo treinado em comparação ao sedentário no tempo 0 h. Em 48 h, o treinamento levou à redução do mRNA do mesmo gene (**Figura 19A**). *Nr1h3* e *Nr1h2*, apresentaram expressão

semelhante nos grupos sedentário e treinados (tempo 0 h e 48 h) (**Figura 19B e C**).

Figura 17 - Expressão de mRNA de *Cd36*, *Olr1* e *Scarb1* por RT-PCR em macrófagos peritoneais dos animais CETP-tg por RT-PCR em tempo real. O cDNA foi obtido a partir de 100 ng de RNA extraído de macrófagos. Para a amplificação do cDNA foram utilizadas sondas adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) identificadas pelo código Mm01135198_m1 (*Cd36*), Mm00454586_m1 (*Olr1*) e Mm00450234_m1 (*Scarb1*). O gene da β -actina (*Actb* – Mm00607939_s1) foi escolhido como normalizador da reação de PCR. Às sondas e ao cDNA, foi adicionada a solução Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) e a reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Os valores de expressão gênica foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, no qual $\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ do controle endógeno}$. Teste t de *Student* (média $\pm$ EP). A) *Cd36* - 0h p = 0,5238, 48h p = 0,1055. B) *Olr1* - 0h p = 0,5787, 48h p = 0,3715. C) *Scarb1* - 0h p = 0,7692, 48h p = 0,4928.

Figura 18 - Expressão de mRNA de *Abca1* e *Abcg1* em macrófagos peritoneais dos animais CETP-tg por RT-PCR em tempo real. O cDNA foi obtido a partir de 100 ng de RNA extraído de macrófagos. Para a amplificação do cDNA foram utilizadas sondas adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) identificadas pelo código Mm00442646_m1 (*Abca1*) e Mm00437390_m1 (*Abcg1*). O gene da β -actina (*Actb* - Mm00607939_s1) foi escolhido como normalizador da reação de PCR. As sondas e ao cDNA, foi adicionada a solução Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) e a reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Os valores de expressão gênica foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, no qual $\Delta C_t = C_t$ gene alvo – C_t do controle endógeno. Teste t de *Student* (média $\pm$ EP). A) *Abca1* – 0 h $p < 0,05$, 48 h $p = 0,1515$. B) *Abcg1* – 0 h $p = 0,9287$, 48 h $p = 0,7552$.

A)

0h

48h

B)

0h

48h

C)

0h

48h

Figura 19 - Expressão de mRNA de *Pparg*, *Nr1h3* e *Nr1h2* em macrófagos peritoneais dos animais CETP-tg por RT-PCR em tempo real. O cDNA foi obtido a partir de 100 ng de RNA extraído de macrófagos. Para a amplificação do cDNA foram utilizadas sondas adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) identificadas pelo código Mm01184322_m1 (*Pparg*), Mm01329744_g1 (*Nr1h3*) e Mm00437265_g1 (*Nr1h2*). O gene da β -actina (*Actb* - Mm00607939_s1) foi escolhido como normalizador da reação de PCR. Às sondas e ao cDNA, foi adicionada a solução Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) e a reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Os valores de expressão gênica foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, no qual $\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ do controle endógeno}$. Teste t de *Student* (média $\pm$ EP). A) *Pparg* - 0h p < 0,05, 48 h p < 0,05. B) *Nr1h3* - 0h p = 1776, 48 h p = 0,7238. C) *Nr1h2* - 0 h p = 0,4377, 48 h p = 0,0886.

Houve redução no mRNA da *Ccl2* no grupo treinado nos dois tempos **(Figura 20A)**. Embora tenha sido observada tendência à redução no mRNA de *Il6* (p = 0,0524) do grupo treinado no tempo 0 h, não houve diferença entre a expressão dos genes de *Tnf* e *Il6* nos animais sedentários e treinados em ambos os tempos **(Figura 20B e C)**.

No tempo 0 h, o grupo treinando, em comparação ao sedentário, apresentou menor expressão de *Il10* e maior expressão de *Cat*. Em 48 h, a expressão destes genes foi semelhante nos dois grupos **(Figura 20D e E)**.

Figura 20 - Expressão de mRNA de *Ccl2*, *Tnf*, *Il6*, *Il10* e *Cat* em macrófagos peritoneais dos animais CETP-tg por RT-PCR em tempo real. O cDNA foi obtido a partir de 100 ng de RNA extraído de macrófagos. Para a amplificação do cDNA foram utilizadas sondas adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) identificadas pelo código Mm00441242_m1 (*Ccl2*), Mm00450234_m1 (*Tnf*), Mm00443258_m1 (*Il6*), Mm00439614_m1 (*Il10*) e Mm01340247_m1 (*Cat*). O gene da β -actina (*Actb* - Mm00607939_s1) foi escolhido como normalizador da reação de PCR. Às sondas e ao cDNA, foi adicionada a solução Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) e a reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Os valores de expressão gênica foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, no qual $\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ do controle endógeno}$. Teste t de *Student* (média $\pm$ EP). A) *Ccl2* - 0h $p < 0,05$, 48h $p < 0,05$. B) *Tnf* - 0h $p = 0,5238$, 48h $p = 0,6748$. C) *Il6* - 0h $p = 0,0524$, 48h $p = 0,1765$. D) *Il10* - 0h $p < 0,05$, 48h $p = 0,6675$. E) *Cat* - 0h $p < 0,05$, 48h $p = 0,2260$.

Na aorta dos animais CETP-tg, a expressão de *Cd36* foi semelhante entre os grupos sedentário e treinado. No entanto, o exercício físico reduziu o mRNA de *Olr1* nos tempos 0 h e 48 h (**Figura 21A e B**). O mRNA de *Scarb1* foi mais expresso no grupo que realizou treinamento no tempo 0 h (**Figura 21C**).

A expressão de *Abca1* foi maior no grupo treinado em comparação ao sedentário no tempo 0 h. O mRNA de *Abcg1* foi semelhante entre ambos os grupos (**Figura 22A e B**).

O mRNA de *Pparg*, *Nr1h3* e *Nr1h2* foi similar na aorta dos camundongos sedentários e treinados nos tempos 0 h e 48 h (**Figura 23A, B e C**).

A expressão de *Ccl2* refletiu resultado semelhante ao *Olr1*, enquanto *Tnf* foi reduzida pelo treinamento apenas no tempo 0 h (**Figura 24A e B**).

Maior expressão de mRNA de *I/6* foi induzida pelo exercício físico no tempo 0 h. Em contrapartida, a expressão de *I/10* foi reduzida neste tempo (**Figura 24C e D**). Em 48 h não houve diferença na expressão destes genes na aorta dos grupos sedentário e treinado. A expressão de *Cat* e *Nos3* não foi modulada pelo treinamento físico neste tecido (**Figura 24E e F**).

A)

0h

48h

B)

0h

48h

C)

0h

48h

Figura 21 - Expressão de mRNA de *Cd36*, *Olr1* e *Scarb1* no arco aórtico dos animais CETP-tg por RT-PCR em tempo real. O cDNA foi obtido a partir de 100 ng de RNA extraído da aorta. Para a amplificação do cDNA foram utilizadas sondas adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) identificadas pelo código Mm1135198_m1 (*Cd36*), Mm00454586_m1 (*Olr1*) e Mm00450234_m1 (*Scarb1*). O gene Gapdh (Mm99999915_g1) foi escolhido como normalizador da reação de PCR. Às sondas e ao cDNA, foi adicionada a solução Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) e a reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Os valores de expressão gênica foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, no qual $\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ do controle endógeno}$. Teste t de *Student* (média $\pm$ EP). A) *Cd36* - 0h p = 0,9156, 48h p = 0,693. B) *Olr1* - 0h p < 0,05, 48h p < 0,05. C) *Scarb1* - 0h p < 0,05, 48h p = 0,1514.

A)

B)

Figura 22 - Expressão de mRNA de *Abca1* e *Abcg1* no artco aórtico dos animais CETP-tg por RT-PCR em tempo real. O cDNA foi obtido a partir de 100 ng de RNA extraído da aorta. Para a amplificação do cDNA foram utilizadas sondas adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) identificadas pelo código Mm00442646_m1 (*Abca1*) e Mm00437390_m1 (*Abcg1*). O gene *Gapdh* (Mm99999915_g1) foi escolhido como normalizador da reação de PCR. Às sondas e ao cDNA, foi adicionada a solução Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) e a reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Os valores de expressão gênica foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, no qual $\Delta C_t = C_t \text{ gene alvo} - C_t \text{ do controle endógeno}$. Teste t de *Student* (média $\pm$ EP). A) *Abca1* - 0h $p < 0,05$, 48h $p = 0,686$. B) *Abcg1* - 0h $p = 0,4092$, 48h $p = 0,3964$.

A)

0h

48h

B)

0h

48h

C)

0h

48h

Figura 23 - Expressão de mRNA de *Pparg*, *Nr1h3* e *Nr1h2* no arco aórtico dos animais CETP-tg por RT-PCR em tempo real. O cDNA foi obtido a partir de 100 ng de RNA extraído da aorta. Para a amplificação do cDNA foram utilizadas sondas adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) identificadas pelo código Mm01184322_m1 (*Pparg*), Mm01329744_g1 (*Nr1h3*) e Mm00437265_g1 (*Nr1h2*). O gene *Gapdh* (Mm99999915_g1) foi escolhido como normalizador da reação de PCR. Às sondas e ao cDNA, foi adicionada a solução Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) e a reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Os valores de expressão gênica foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, no qual $\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ do controle endógeno}$. Teste t de *Student* (média $\pm$ EP). A) *Pparg* - 0h p = 0,4253, 48h p = 0,5515. B) *Nr1h3* - 0h p = 0,3071, 48h p = 0,6527. C) *Nr1h2* - 0h p = 0,9695, 48h p = 0,4372.

A)

0h

48h

B)

0h

48h

A)

0h

48h

C)

0h

48h

D)

0h

48h

E)

0h

48h

Figura 24 - Expressão de mRNA de *Ccl2*, *Tnf*, *Il6*, *Il10*, *Cat* e *Nos3* no arco aórtico dos animais CETP-tg por RT-PCR em tempo real. O cDNA foi obtido a partir de 100 ng de RNA extraído da aorta. Para a amplificação do cDNA foram utilizadas sondas adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) identificadas pelo código Mm00441242_m1 (*Ccl2*), Mm00443258_m1 (*Tnf*), Mm00446190_m1 (*Il6*), Mm00439614_m1 (*Il10*), Mm00443258_m1 (*Cat*) e Mm00435217_m1 (*Nos3*). O gene *Gapdh* (Mm99999915_g1) foi escolhido como normalizador da reação de PCR. Às sondas e ao cDNA, foi adicionada a solução Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) e a reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Os valores de expressão gênica foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, no qual $\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ do controle endógeno}$. Teste t de *Student* (média $\pm$ EP). A) *Ccl2* - 0h p < 0,05, 48h p < 0,05. B) *Tnf* - 0h p < 0,05, 48h p = 0,4666. C) *Il6* - 0h p < 0,05, 48h p = 0,6682. D) *Il10* - 0h p < 0,05, 48h p = 0,434. E) *Cat* - 0h p = 0,0793, 48h p = 0,5987. F) *Nos3* - 0h p = 0,1917, 48h p = 0,9795.

Tabela 4 - Efeito do exercício sobre a expressão de receptores de fluxo de lípidos, resposta inflamatória, antioxidante e vasodilatadora animais CETP-tg.

Animais CETP-tg					
Efeito do exercício físico sobre a expressão de mRNA em macrófagos					
0h			48h		
		P			P
<i>Pparg</i>	↑	0,0034	<i>Pparg</i>	↓	0,0260
<i>Nr1h3</i>	-	0,1776	<i>Nr1h3</i>	-	0,7238
<i>Nr1h2</i>	-	0,4377	<i>Nr1h2</i>	-	0,0886
<i>Abca1</i>	↑	0,0125	<i>Abca1</i>	-	0,1515
<i>Abcg1</i>	-	0,9287	<i>Abcg1</i>	-	0,7552
<i>Scarb1</i>	-	0,7692	<i>Scarb1</i>	-	0,4928
<i>Cd36</i>	-	0,5238	<i>Cd36</i>	-	0,1055
<i>Olr1</i>	-	0,5787	<i>Olr1</i>	-	0,3715
<i>Ccl2</i>	↓	0,0254	<i>Ccl2</i>	↓	0,0025
<i>Tnf</i>	-	0,5238	<i>Tnf</i>	-	0,6748
<i>Il6</i>	-	0,0524	<i>Il6</i>	-	0,1765
<i>Il10</i>	↓	0,0435	<i>Il10</i>	-	0,6675
<i>Cat</i>	↑	0,0017	<i>Cat</i>	-	0,2260

Efeito do exercício físico sobre a expressão de mRNA na Aorta					
0h			48h		
		P			P
<i>Pparg</i>	-	0,4253	<i>Pparg</i>	-	0,5515
<i>Nr1h3</i>	-	0,3071	<i>Nr1h3</i>	-	0,6527
<i>Nr1h2</i>	-	0,9695	<i>Nr1h2</i>	-	0,4372
<i>Abca1</i>	↑	0,0035	<i>Abca1</i>	-	0,6860
<i>Abcg1</i>	-	0,4092	<i>Abcg1</i>	-	0,3964
<i>Scarb1</i>	↑	0,0082	<i>Scarb1</i>	-	0,1514
<i>Cd36</i>	-	0,9156	<i>Cd36</i>	-	0,6930
<i>Olr1</i>	↓	0,0133	<i>Olr1</i>	↓	0,0437
<i>Ccl2</i>	↓	0,0470	<i>Ccl2</i>	↓	0,0195
<i>Tnf</i>	↓	0,0009	<i>Tnf</i>	-	0,4666
<i>Il6</i>	↑	0,0443	<i>Il6</i>	-	0,6682
<i>Il10</i>	↓	0,0335	<i>Il10</i>	-	0,4340
<i>Cat</i>	-	0,7728	<i>Cat</i>	-	0,6223
<i>Nos3</i>	-	0,1917	<i>Nos3</i>	-	0,9795

Análise estatística por Test t de *Student* (média $\pm$ EP).

Nos ensaios de efluxo de colesterol, para verificar o efeito do exercício físico sob a funcionalidade dos receptores ABCA-1 e ABCG-1, não foi observada diferença na remoção de ^{14}C -colesterol mediada por apo A-I, em 8 h e 24 h, entre os animais CETP-tg do grupo sedentário e treinado (**Figura 25**).

Resultados semelhantes foram observados nos ensaios de efluxo de ^{14}C -colesterol mediada por HDL₂ nos períodos de 8 h e 24 h (**Figura 26**).

Figura 25 - Efluxo de ^{14}C -colesterol, mediado por apo A-I, de macrófagos isolados do peritônio de camundongos CETP-tg sedentários e treinados. Macrófagos, isolados da cavidade peritoneal de camundongos CETP-tg sedentários e treinados, após 48 h da última sessão de exercício, foram enriquecidos com LDL acetilada e ^{14}C -colesterol por 30 h. O efluxo de ^{14}C -colesterol foi determinado, após 8 h e 24 h, de exposição a 30 μg de apo A-I. As comparações foram feitas pelo test t de *Student* não pareado (média $\pm$ DP).

Figura 26 - Efluxo de ^{14}C -colesterol, mediado por HDL_2 , de macrófagos de peritônio de camundongos CETP-tg sedentários e treinados. Macrófagos, isolados da cavidade peritoneal de camundongos CETP-tg sedentários e treinados, após 48 h da última sessão de exercício, foram enriquecidos com LDL acetilada e ^{14}C -colesterol por 30 h. O efluxo de ^{14}C -colesterol foi determinado, após 8 h e 24 h, de exposição a $50 \mu\text{g}$ de HDL_2 . Análise estatística por test t de *Student* não pareado (média $\pm$ DP).

5. DISCUSSÃO

O exercício físico regular é coadjuvante na prevenção das doenças cardiovasculares, por atuar na redução da pressão arterial, melhora da sensibilidade insulínica, função endotelial, perfil hemostático e metabolismo lipídico (Kokkinos, 2013; Ortega et al., 2015; Kim et al., 2014; Womack et al., 2003, Franklin et al., 2014). Em particular, o exercício físico melhora o perfil de lipoproteínas e contribui para a prevenção e regressão da lesão aterosclerótica (Ramachandran et al., 2005 e Matsumoto et al., 2013).

No presente estudo, avaliou-se o efeito do treinamento físico aeróbio sobre a expressão de genes envolvidos no fluxo de lípidos, modulação da resposta inflamatória, vasodilatadora e antioxidante na parede arterial e em macrófagos peritoneais isolados de camundongos selvagens e CETP-tg.

Estudos prévios investigaram o efeito do treinamento físico aeróbio sobre o TRC, sistema antiaterogênico que promove a remoção do excesso de colesterol de tecidos periféricos (incluindo-se a íntima arterial) e o encaminha para a captação hepática, secreção biliar e excreção fecal. Nesses estudos, a avaliação *in vivo* do TRC foi realizada por meio da injeção intraperitoneal de macrófagos sobrecarregados com LDL e ^{14}C -colesterol em animais saudáveis, medindo-se a recuperação do colesterol radioativo no plasma, fígado e fezes ao longo do tempo. Meissner et al. (2010a), não encontraram diferença na recuperação de colesterol em nenhum dos compartimentos analisados, em camundongos selvagens que realizaram exercício voluntário em gaiola com roda

de corrida, por duas semanas. No entanto, este mesmo grupo, ao avaliar o efeito do treinamento voluntário por 12 semanas, verificou maior excreção fecal de ácidos biliares e redução da absorção intestinal de colesterol (Meissner et al., 2010b).

Rocco et al. (2011) demonstraram que animais selvagens e CETP-tg que realizaram treinamento aeróbio, em esteira por 6 semanas, apresentaram maior transferência de colesterol radioativo para o plasma e fígado em comparação aos animais sedentários, o que caracterizou a melhora do TRC *in vivo*. Nos animais CETP-tg, observou-se, ainda, maior recuperação de colesterol nas fezes (Rocco et al., 2011 e Rocco, 2010).

Nos selvagens, a melhora do TRC foi associada ao maior conteúdo dos receptores hepáticos SR-BI, que interagem com as partículas de HDL e removem o colesterol esterificado do seu interior. Por outro lado, nos camundongos CETP-tg não houve alteração no conteúdo de SR-BI, mas um aumento em 60% no conteúdo dos receptores B-E que removem LDL, VLDL e QM. Houve, ainda, aumento no conteúdo hepático de ABCA-1, o que pode ter contribuído para a elevação do HDL-C observado nestes animais após o treinamento físico.

Em nosso estudo, não se observou alteração sistemática na expressão dos genes analisados em macrófagos e arco aórtico, tanto no tempo 0 h como em 48 h, em ambos os modelos animais. Enquanto nos macrófagos dos animais selvagens o exercício reduziu os genes envolvidos no fluxo de lípidos, *Pparg*, *Nr1h3*, *Nr1h2*, *Abca1*, *Abcg1*, *Cd36* e *Olr1* no tempo 0 h e aumentou *Scarb1* em 48 h, na aorta o exercício aumentou a expressão de *Pparg*, *Nr1h3*, *Cd36* e *Olr1* no tempo 0 h, reduziu *Nr1h3* e aumentou *Abcg1*, *Olr1* em 48h. Em animais

CETP-tg, em macrófagos observou-se aumento do mRNA de *Pparg* e *Abca1* no tempo 0 h e redução de *Pparg* em 48 h; na aorta o treinamento elevou a expressão de *Abca1*, assim como no macrófago, e também de *Scarb1*. Também houve redução de *Olr1* no tempo 0 h e em 48 h.

O mRNA de *Tnf* e *Il10* foi reduzido em macrófagos dos animais selvagens no tempo 0 h. Em contrapartida, a expressão de *Il10* foi maior no grupo treinado em 48 h. Na aorta desses animais, observou-se aumento da quimiocina *Ccl2* em 48 h, redução de *Il10* nos dois tempos e aumento da enzima antioxidante *Cat* no tempo 0 h. Nos animais CETP-tg, a quimiocina *Ccl2* foi o único gene a ser reduzido no grupo que realizou treinamento nos tempos 0 h e 48 h, em macrófagos e aorta. Nos macrófagos, os animais treinados apresentaram redução do mRNA de *Il10* e aumento da *Cat* no tempo 0 h. Na artéria, a expressão de *Tnf* e *Il10* foram reduzidas e a de *Il6* aumentada no tempo 0 h. Tanto em macrófagos como nas artérias, o exercício físico não modulou a expressão de genes inflamatórios e catalase em 48 h.

Macrófagos isolados do peritônio de roedores são utilizados como modelo para o estudo da fisiopatologia da aterosclerose. São células primárias de fácil obtenção e cultivo que, rapidamente, transformam-se em células espumosas mediante incubação com LDL modificada. Isto permite o estudo da dinâmica do transporte do colesterol para aceptores exógenos, frente à modulação por diversos estímulos.

Maior expressão de mRNA de *ABCA1*, *ABCG1*, *NR1H3*, *PPARα*, *PPARγ*, *PPARGC1A* (*PGC-1α*) e *CD36* foi observado em leucócitos humanos, após treinamento aeróbio de baixa intensidade (Butcher et al., 2008 e Yakeu et al., 2010). Efeito semelhante foi observado em monócitos, nos quais observou-se o

aumento da expressão de *PPAR γ* , *CD36*, *NR1H3* e *ABCA1* após 8 semanas de treinamento moderado (Thomas et al., 2012). No entanto, não é totalmente claro se estas células, espelham de fato, o microambiente da íntima arterial. Nas condições experimentais do presente estudo, ficou evidente a modulação distinta promovida pelo treinamento físico aeróbio sobre a expressão de genes em macrófagos peritoneais e na íntima arterial (a qual é formada por outros tipos celulares, além dos macrófagos). Além disso, em ambos os camundongos selvagens e CETP-tg, não houve efeito do treinamento físico sobre os receptores envolvidos no TRC, em macrófagos isolados após 48 h da última sessão de exercício, o que vai ao encontro dos resultados obtidos nos ensaios de efluxo de ^{14}C -colesterol. Neles, não se observou diferença na exportação de colesterol para apo A-I e HDL₂. Semelhantemente, a captação de ^3H -COE-LDL-acetilada por macrófagos foi similar entre animais selvagens sedentários e treinados.

Sendo assim é possível inferir que os benefícios conferidos ao exercício físico na melhoria do transporte de lípidos sejam consequência de suas ações múltiplas e conjuntas sobre outros efetores do TRC, uma vez que não houve alteração sistemática na expressão de genes envolvidos neste sistema em macrófagos, tampouco no efluxo de colesterol.

Ação efetiva do exercício físico aeróbio é apontada na elevação do HDL colesterol. Isto se deve ao aumento na geração de partículas nascentes de HDL (pré-beta HDL) em consequência da maior atividade da lipoproteína lipase, maior expressão hepática e intestinal de ABCA-1 e produção muscular de pré-beta, neste último caso, em resposta à ação aguda do exercício físico (Vaisberg et al., 2012; Hoang et al., 2008; Brites et al., 2004; Rocco et al., 2011; Ghanbari-Niaki et al., 2007 e Khabazian et al., 2009).

De fato, em estudos nos quais se utilizou o soro de animais ou humano treinados, observou-se maior remoção de colesterol celular, o que provavelmente, é o reflexo da maior concentração circulante de HDL e apo A-I (Meissner et al., 2010a e Brites et al., 2004).

O exercício físico também parece modular a atividade da CETP, embora muita controversa ainda exista a este respeito, com descrição de aumento, não alteração ou redução em sua atividade (Gupta et al., 1993, Vaisberg et al., 2012; Hoang et al, 2008 e Brites et al., 2004).

De maneira semelhante, o efeito do exercício físico sobre a atividade da enzima LCAT não está totalmente esclarecido (Imamura et al., 2013; Frey et al., 1991; Lehmann et al., 2001 e Tsopanakis et al., 1988). Sua elevação em atletas, em portadores de diabetes melito tipo 2 após exercício moderado e após teste de esforço máximo, em atletas de *endurance* e em indivíduos sedentários, utilizados como controles do estudo, indica maior maturação das partículas de HDL o que favorece o fluxo de colesterol ao longo do TRC.

A atividade da lipase hepática é reduzida pelo exercício físico o que pode contribuir para aumentar a meia-vida das HDL na circulação e, portanto, sua habilidade em remover colesterol celular (Thompson et al., 1997).

Finalmente, o exercício físico aumenta o mRNA (Wilund et al., 2008) e o conteúdo proteico (Rocco, 2010) de SR-BI no fígado, o que garante a etapa final de captação de colesterol esterificado de HDL que precede a excreção biliar deste esterol. Embora a expressão de SR-BI vincule-se com a redução da concentração plasmática de HDL-colesterol ela é indicativa de eficiência ao longo do TRC e favorece redução da aterosclerose (Kozarsky et al., 2000). O inverso é observado em animais *knockout* para SR-BI, onde há marcada

elevação no HDL-colesterol, porém com aumento da área de lesão aterosclerótica (Van Eck et al., 2003). Em humanos, mutação em SR-BI associa-se com importante elevação do HDL-colesterol e redução da atividade deste receptor, com prejuízo no efluxo de colesterol celular, embora não haja descrição de aumento na espessura da íntima-média da carótida (Vergeer et al., 2011). Sendo assim é possível que o efeito benéfico do exercício sobre o TRC vincule-se as suas múltiplas ações sobre etapas TRC no plasma, fígado e intestino, independentemente de modificações na parede arterial e macrófagos, de modo a favorecer a mobilização de colesterol periférico, com consequente redução da aterosclerose.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo, não foram evidenciadas alterações em macrófagos peritoneais e na parede arterial frente ao treinamento físico aeróbio que possam contribuir para o TRC em modelo experimental de camundongos não dislipidêmicos, sem intervenção farmacológica ou alimentar. Sendo assim, o efeito do treinamento físico na melhora do transporte reverso de colesterol, observado em estudos anteriores nestes mesmos animais, deve ser consequente à sua ação sistêmica sobre mediadores deste transporte e expressão de receptores no fígado e intestino.

7. REFERÊNCIAS

- Acton SL, Scherer PE, Lodish HF, Krieger M. Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J Biol Chem*. 1994; 269(33): 21003-9.
- Aggarwal D, Freake HC, Soliman GA, Dutta A, Fernandez ML. Validation of using gene expression in mononuclear cells as a marker for hepatic cholesterol metabolism. *Lipids Health Dis*. 2006; 5: 22.
- Aiello RJ, Brees D, Bourassa PA, Royer L, Lindsey S, Coskran T, Haghpassand M, Francone OL. Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22(4): 630-7.
- Adorni Mp, Zimetti F, Billheimer JT, Wang N, Rader D J, Phillips MC, Rothblat GH. The roles of different pathways in the release of cholesterol from macrophages. *J. Lipid Res*. 2007. 48: 2453-62.
- Akhmedov A, Rozenberg I, Paneni F, Camici GG, Shi Y, Doerries C, Sledzinska A, Mocharla P, Breitenstein A, Lohmann C, Stein S, von Lukowicz T, Kurrer MO, Borén J, Becher B, Tanner FC, Landmesser U, Matter CM, Lüscher TF. Endothelial overexpression of LOX-1 increases plaque formation and promotes atherosclerosis in vivo. *Eur Heart J*. 2014; 35 (40): 2839-48.
- Annema W, Tietge UJ. Role of hepatic lipase and endothelial lipase in high-density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. *Curr Atheroscler Rep*. 2011; 13(3): 257-65.
- Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, Huang Y. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk.

- The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis*. 1996; 124 (Suppl): S11-20.
- Azhar S, Reaven E. Scavenger receptor class BI and selective cholesteryl ester uptake: partners in the regulation of steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 2002; 195: 1–26.
- Balady GJ, Ades PA, Bittner VA, Franklin BA, Gordon NF, Thomas RJ, Tomaselle GF, Yancy CW. Referral, enrollment, and delivery of cardiac rehabilitation/secondary prevention programs at clinical centers and beyond: a presidential advisory from the American Heart Association. *Circulation*. 2012; 124 (25): 2951-60.
- Barter P, Gotto A M, LaRosa J C, Maroni J, Szarek M, Grundy S M, Kastelein J J P, Bittner V, Fruchart J. HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2007; 357: 1301-10.
- Basso F, Amar MJ, Wagner EM, Vaisman B, Paigen B, Santamarina-Fojo S, Remaley AT. Enhanced ABCG-1 expression increases atherosclerosis in LDLr-KO mice on a western diet. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 351: 398-404.
- Basu SK, Goldstein JL, Anderson GW, Brown MS. Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1976; 73 (9): 3178-82.
- Bedu E, Desplanches D, Pequignot J, Bordier B, Desvergne B. Double gene deletion reveals the lack of cooperation between PPARalpha and PPARbeta in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 357 (4): 877-881.
- Berg AH, Drechsler C, Wenger J, Buccafusca R, Hod T, Kalim S, Ramma W, Parikh SM, Steen H, Friedman DJ, Danziger J, Wanner C, Thadhani R, Karumanchi SA. Carbamylation of serum albumin as a risk factor for mortality in patients with kidney failure. *Sci Transl Med*. 2013; 5(175): 175ra29.

- Blake GJ, Ridker PM. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Circ Res*. 2001; 89 (9): 763-71.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. Saúde Brasil 2011: uma análise da situação de saúde e a vigilância da saúde da mulher. Brasília: Ministério da Saúde: 2012.
- Brites F, Verona J, De Geitere C, Fruchart JC, Castro G, Wikinski R. Enhanced cholesterol efflux promotion in well-trained soccer players. *Metabolism*. 2004; 53 (10): 1262-1267.
- Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem*. 1983; 52: 223-61.
- Brundert M, Heeren J, Greten H, Rinninger F. Hepatic lipase mediates an increase in selective uptake of HDL-associated cholesteryl esters by cells in culture independent from SR-BI. *J Lipid Res*. 2003; 44:1020–32.
- Brunham LR, Kruit JK, Pape TD, Parks JS, Kuipers F, Hayden MR. Tissue-specific induction of intestinal ABCA1 expression with a liver X receptor agonist raises plasma HDL cholesterol levels. *Circ Res*. 2006; 99(7): 672-4.
- Butcher LR, Thomas A, Backx K, Roberts A, Webb R, Morris K. Low-intensity exercise exerts beneficial effects on plasma lipids via PPAR γ . *Med Sci Sports Exerc*. 2008; 40 (7): 1263-1270.
- Burgess B, Naus K, Chan J, Hirsch-Reinshagen V, Tansley G, Matzke L, Chan B, Wilkison A, Lutjohann D, Wellington C. Overexpression of human ABCG-1 does not affect atherosclerosis in fat-fed apoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28: 1731-37.
- Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond)*. 2005; 109(4): 365-79.

- Carmena R, Duriez P, Fruchart JC. Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis. *Circulation*. 2004; 109 (23 Suppl 1): III2-7.
- Calabresi L, Franceschini G. Lecithin:cholesterol acyltransferase, high-density lipoproteins, and atheroprotection in humans. *Trends Cardiovasc Med*. 2010; 20(2): 50-3.
- Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, Liao D, Nagy L, Edwards PA, Curtiss LK, Evans RM, Tontonoz P. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell*. 2001; 7(1): 161-71.
- Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Torra IP, Teissier E, Minnich A, Jaye M, Duverger N, Brewer HB, Fruchart JC, Clavey V, Staels B. PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med*. 2001; 7(1): 53-8.
- Clay MA, Barter PJ. Formation of new HDL particles from lipid-free apolipoprotein A-I. *J Lipid Res*. 1996; 37(8): 1722-32.
- Conybeare G, Leslie GB, Angles K, Barrett RJ, Luke JS, Gask DR. An improved simple technique for the collection of blood samples from rats and mice. *Lab Anim*. 1988; 22 (2): 177-182.
- Costet P, Luo Y, Wang N, Tall AR. Sterol-dependent transactivation of The ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem*. 2000; 275(36): 28240-5.
- Couffignal T, Dupla C, Moreau C, Lamazire JM, Bonnet J. Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1994; 74 (2): 225-34.
- Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2001; 107(10): 1255-62.

- Davidsson P, Hulthe J, Fagerberg B, Camejo G. Proteomics of apolipoproteins and associated proteins from plasma high-density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30 (2): 156-63.
- Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1998; 102(1): 145-52.
- Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, Hajjar DP, Hazen SL, Hoff HF, Sharma K, Silverstein RL. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest.* 2000; 105 (8): 1049-56.
- Franklin BA, Durstine JL, Roberts CK, Barnard RJ. Impact of diet and exercise on lipid management in the modern era. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2014; 28 (3): 405-21
- Freese EC, Gist NH, Cureton KJ. Effect of prior exercise on postprandial lipemia: an updated quantitative review. *J Appl Physiol (1985).* 2014; 116 (1): 67-75.
- Frey I, Baumstark MW, Berg A, Keul J. Influence of acute maximal exercise on lecithin:cholesterol acyltransferase activity in healthy adults of differing aerobic performance. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1991; 62 (1): 31-5.
- Fukami K, Yamagishi S, Okuda S. Role of AGEs-RAGE system in cardiovascular disease. *Curr Pharm Des.* 2014; 20 (14): 2395-402.
- GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 2015; 385: 117–71.
- Gabriel BM, Pugh J, Pruneta-Delocche V, Moulin P, Ratkevicius A, Gray SR. The effect of high intensity interval exercise on postprandial triacylglycerol and leukocyte activation--monitored for 48 h post exercise. *PLoS One.* 2013; 8 (12): e82669.

- Gavish D, Aschry Y, Eisenber G. In vivo conversion of human HDL3 to HDL2 and apoE-rich HDL1 in the rat: effects of lipid transfer protein. *J Lipid Res.* 1987; 28: 257-267.
- Ghanbari-Niaki A, Khabasian BM, Hossaini-Kakhak SA, Rahbarizadeh F, Hedayati Mehdi. Treadmill exercise enhances ABCA1 expression in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 361 (4): 841-846.
- Ghanbari-Niaki A, Rahtmati-Ahmadabad S, Zare-Kookandeh N. ABCG8 gene responses to 8 weeks treadmill running with or without pistachio atlantica (*Baneh*) extraction in female rats. *Int J Endocrinol Metab.* 2012; 10 (4): 604-610.
- Ghanbari-Niaki A, Rahmati-Ahmadabad S. Effects of a fixed-intensity of endurance training and pistacia atlantica supplementation on ATP-binding cassette G4 expression. *Chin Med.* 2013; 8: 23.
- Ghanbari-Niaki A, Saghebjo M, Hedayati M. A single session of circuit-resistance exercise effects on human peripheral blood lymphocyte ABCA1 expression and plasma HDL-C level. *Regul Pept.* 2011; 166: 42-47.
- Geisler S, Brinkmann C, Schiffer T, Kreutz T, Bloch W, Brixius K. The influence of resistance training on patients with metabolic syndrome --significance of change in muscle fiber sizer and muscle fiber distribution. *J Strength Cond Res.* 2011; 25(9): 2598-2604.
- Goyal T, Mitra S, Khaidakov M, Wang X, Singla S, Ding Z, Liu S, Mehta JL. Current Concepts of the Role of Oxidized LDL Receptors in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2012; 14: 150-9.
- Gupta AK, Ross EA, Myers JN, Kashyap ML. Increased reverse cholesterol transport in athletes. *Metabolism.* 1993; 42(6): 684-90.
- Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6: 508.

- Halverstadt A, Phares DA, Wilund KR, Goldberg AP, Hagberg JM. Endurance exercise training raises high-density lipoprotein cholesterol and lowers small low-density lipoprotein and very low-density lipoprotein independent of body fat phenotypes in older men and women. *Metabolism*. 2007; 56(4): 444-50.
- Herijgers N, de Winther MP, Van Eck M, Havekes LM, Hofker MH, Hoogerbrugge PM, Van Berkel TJ. Effect of human *scavenger* receptor class A overexpression in bone marrow-derived cells on lipoprotein metabolism and atherosclerosis in low density lipoprotein receptor knockout mice. *J Lipid Res*. 2000; 41 (9): 1402-9.
- Hoang A, Tefft C, Duffy SJ, Formosa M, Henstridge DC, Kingwell BA, Sviridov D. ABCA1 expression in humans is associated with physical activity and alcohol consumption. *Atherosclerosis*. 2008; 197(1): 197-203.
- Holleboom AG, Jakulj L, Franssen R, Decaris J, Vergeer M, Koetsveld J, Luchoomun J, Glass A, Hellerstein MK, Kastelein JJ, Hovingh GK, Kuivenhoven JA, Groen AK, Turner SM, Stroes ES. In vivo tissue cholesterol efflux is reduced in carriers of a mutation in APOA1. *J Lipid Res*. 2013; 54(7): 1964-71.
- Hozoji-Inada M, Munehira Y, Nagao K, Kioka N, Ueda K. Liver X receptor β interacts directly with ATP-binding cassette A1 to promote high density lipoprotein formation during acute cholesterol accumulation. *J Biol Chem*. 2011; 286(22): 20117-24.
- Iborra RT, Ribeiro IC, Neves MQ, Charf AM, Lottenberg SA, Negrão CE, Nakandakare ER, Passarelli M. Aerobic exercise training improves the role of high-density lipoprotein antioxidant and reduces plasma lipid peroxidation in type 2 diabetes mellitus. *Scand J Med Sci Sports*. 2008; 18 (6): 742-750.
- Imamura H, Iide K, Yoshimura Y, Kumagai K, Oshikata R, Miyahara K, Oda K, Miyamoto N, Nakazawa A. Nutrient intake, serum lipids and iron status of collegiate rugby players. *J Int Soc Sports Nutr*. 2013; 10(1): 9.

- Ishibashi M, Filomenko R, Rébé C, Chevriaux A, Varin A, Derangère V, Bessède G, Gambert P, Lagrost L, Masson D. Knock-down of the oxysterol receptor LXR α impairs cholesterol efflux in human primary macrophages: lack of compensation by LXR β activation. *Biochem Pharmacol.* 2013; 86(1): 122-9.
- Jafari M, Leaf DA, Macrae H, Kasem J, O'conner P, Pullinger C, Malloy M, Kane JP. The effects of physical exercise on plasma prebeta-1 high-density lipoprotein. *Metabolism.* 2003; 52(4): 437-442.
- Ji A, Wroblewski JM, Cai L, de Beer MC, Webb NR, van der Westhuyzen DR. Nascent HDL formation in hepatocytes and role of ABCA1, ABCG1, and SR-BI. *J Lipid Res.* 2012; 53(3): 446-55.
- Ji A, Meyer JM, Cai L, Akinmusire A, de Beer MC, Webb NR, van der Westhuyzen DR. Scavenger receptor SR-BI in macrophage lipid metabolism. *Atherosclerosis.* 2011; 217(1): 106-12.
- Khabazian BM, Ghanbari-Niaki A, Safarzadeh-Golpordesari A, Ebrahimi M, Rahbarizadeh F, Abednazari H. Endurance training enhances ABCA1 expression in rat small intestine. *Eur J Appl Physiol.* 2009; 107(3): 351-358.
- Kim B, Lee H, Kawata K, Park JY. Exercise-mediated wall shear stress increases mitochondrial biogenesis in vascular endothelium. *PLoS One.* 2014; 9 (11): e111409.
- Kokkinos P. Cardiorespiratory fitness, exercise, and blood pressure. *Hypertension.* 2014; 64 (6) :1160-4.
- Kontush A, Lhomme M, Chapman MJ. Thematic Review Series: High Density Lipoprotein Structure, Function, and Metabolism: Unraveling the complexities of the HDL lipidome. *J Lipid Res.* 2013; 54(11): 2950-63.
- Kontush A. HDL-mediated mechanisms of protection in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 2014; 103 (3): 341-9.
- Kozarsky KF, Donahee MH, Glick JM, Krieger M, Rader DJ. Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-BI reduces atherosclerosis in

the cholesterol-fed LDL receptor-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20 (3): 721-7.

Koves TR, Sparks LM, Kovalik JP, Mosedale M, Arumugan R, DeBalsi KL, EveringhamK, Thorne L, Phielix Esther, Meex RC, Kien CL, Hesselink MKC, Schrauwen P, Muoio DM. PPAR γ cactivator-1 α contributes to exercise-induced regulation of intramuscular lipid droplet programming mice and humans. *JLR.* 2013; 54: 522-534.

Kraus WE, Houmard JA, Duscha BD, Knetzger KJ, Wharton MB, McCartney JS, Bales CW, Henes S, Samsa GP, Otvos JD, Kulkarni KR, Slentz CA. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. *N Engl J Med.* 2002; 347(19): 1483-1492.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006; 27 (2-3): 95-125.

Kuchibhotla S, Vanegas D, Kennedy DJ, Guy E, Nimako G, Morton RE, Febbraio M. Absence of CD36 protects against atherosclerosis in ApoE knock-out mice with no additional protection provided by absence of *scavenger* receptor A I/II. *Cardiovasc Res.* 2008; 78 (1): 185-96.

Kunjathoor VV, Febbraio M, Podrez EA, Moore KJ, Andersson L, Koehn S, Rhee JS, Silverstein R, Hoff HF, Freeman MW. *Scavenger* receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem.* 2002; 277 (51):49982-8.

Lagrost L. The role of cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein in the remodeling of plasma high-density lipoproteins. *Trends Cardiovasc Med.* 1997; 7(6): 218-24.

Laukkanen J, Lehtolainen P, Gough PJ, Greaves DR, Gordon S, Ylä-Herttuala S. Adenovirus-mediated gene transfer of a secreted form of human macrophage

- scavenger receptor inhibits modified low-density lipoprotein degradation and foam-cell formation in macrophages. *Circulation*. 2000; 101 (10): 1091-6.
- Leaf D A. The effect of physical exercise on reverse cholesterol transport. *Metabolism*. 2003; 52 (8): 950-957.
- Lee DC, Pate RR, Lavie CJ, Sui X, Church TS, Blair SN. Leisure-time running reduces all-cause and cardiovascular mortality risk. *J Am Coll Cardiol*. 2014; 64 (5): 472-81.
- Lehmann R, Engler H, Honegger R, Riesen W, Spinass GA. Alterations of lipolytic enzymes and high-density lipoprotein subfractions induced by physical activity in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest*. 2001; 31 (1): 37-44.
- Li D, Wang D, Wang Y, Ling W, Feng X, Xia M. Adenosine monophosphate-activated protein kinase induces cholesterol efflux from macrophage-derived foam cells and alleviates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Biol Chem*. 2010; 285 (43): 33499-509.
- Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011; 473 (7347): 317-25.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*. 2001;25:402-408.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AI, Randall JR. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265-275.
- Maïga SF, Kalopissis AD, Chabert M. Apolipoprotein A-II is a key regulatory factor of HDL metabolism as appears from studies with transgenic animals and clinical outcomes. *Biochimie*. 2014; 96: 56-66.
- Majdalawieh A, Ro HS. PPARgamma1 and LXRAalpha face a new regulator of macrophage cholesterol homeostasis and inflammatory responsiveness, AEBP1. *Nucl Recept Signal*. 2010; 8: e004.

- Manning-Tobin JJ, Moore KJ, Seimon TA, Bell SA, Sharuk M, Alvarez-Leite JI, de Winther MP, Tabas I, Freeman MW. Loss of SR-A and CD36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29 (1): 19-26.
- Mäkinen PI, Lappalainen JP, Heinonen SE, Leppänen P, Lähteenpää MT, Aarnio JV, Heikkilä J, Turunen MP, Ylä-Herttuala S. Silencing of either SR-A or CD36 reduces atherosclerosis in hyperlipidaemic mice and reveals reciprocal upregulation of these receptors. *Cardiovasc Res.* 2010; 88 (3): 530-8.
- Matsumoto A, Manthey HD, Marsh SA, Fassett RG, de Haan JB, Rolfe BE, Coombes JS. Effects of exercise training and RhoA/ROCK inhibition on plaque in ApoE^{-/-} mice. *Int J Cardiol.* 2013; 167(4): 1282-1288.
- Matsumoto Y, Adams V, Jacob S, Mangner N, Schuler G, Linke A. Regular exercise training prevents aortic valve disease in low-density lipoprotein-receptor-deficient mice. *Circulation.* 2010; 121(6): 759-67.
- Matsuo M. ATP-Binding Cassette Proteins involved in glucose and lipid homeostasis. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2010; 74 (5): 899-907.
- Mehta JL, Sanada N, Hu CP, Chen J, Dandapat A, Sugawara F, Satoh H, Inoue K, Kawase Y, Jishage K, Suzuki H, Takeya M, Schnackenberg L, Beger R, Hermonat PL, Thomas M, Sawamura T. Deletion of LOX-1 reduces atherogenesis in LDLR knockout mice fed high cholesterol diet. *Circ Res.* 2007; 100 (11): 1634-42.
- Meissner M, Nijstad N, Kuipers F, Tietge U J F. Voluntary exercise increases cholesterol efflux but not macrophage reverse cholesterol transport *em vivo* mice. *Nutr Metab.* 2010a; 7: 54.
- Meissner M, Havinga R, Boverhof R, Kema I, Groen AK, Kuipers F. Exercise enhances whole-body cholesterol turnover in mice. *Med Sci Sports Exerc.* 2010b; 42 (8):1460-8.

- 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(10): 1681-1688.
- Méndez JD, Xie J, Aguilar-Hernández M, Méndez-Valenzuela V. Trends in advanced glycation end products research in diabetes mellitus and its complications. *Mol Cell Biochem.* 2010; 341(1-2): 33-41.
- Moore KJ, Freeman MW. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26 (8): 1702-11.
- Naik SU, Wang X, Da Silva JS, Jaye M, Macphee CH, Reilly MP, Billheimer JT, Rothblat GH, Rader DJ. Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation.* 2006; 113(1): 90-7.
- Napoli C, Willinas-Ignarro S, Nigris F, Lerman L O, D'Armiento F P, Crimi E, Byrns R E, Casamassini A, Lanza A, Gombos F, Sica V, Ignarro L J. Physical training and metabolic supplementation reduce spontaneous atherosclerotic plaque rupture and prolong survival in hypercholesterolemic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103 (27):
- Neary R, Bhatnagar D, Durrington P, Ishola M, Arrol S, Mackness M. An investigation of the role of lecithin:cholesterol acyltransferase and triglyceride-rich lipoproteins in the metabolism of pre-beta high density lipoproteins. *Atherosclerosis.* 1991; 89(1): 35-48.
- Olchawa B, Kingwell B A, Hoang A, Schneider L, Miyazaki O, Nestel P, Sviridov D. Physical fitness and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 1087-1091.
- Oliveira H C F, Faria E C. Cholesteryl ester transfer protein: the controversial relation to atherosclerosis and emerging new biological roles. *IUBMB Life.* 2011; 63 (4): 248-57.

- Oram JF, Lawn RM, Garvin MR, Wade DP. ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. *J Biol Chem*. 2000; 275(44): 34508-11.
- Oram JF, Vaughan AM. ATP-binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Cir Res*. 2006; 99: 1031-43.
- Ortega JF, Fernández-Elías VE, Hamouti N, Pallarés JG, Mora-Rodriguez R. Higher insulin-sensitizing response after sprint interval compared to continuous exercise. *Int J Sports Med*. 2015; 36 (3): 209-14.
- Ozasa H, Ayaori M, Iizuka M, Terao Y, Uto-Kondo H, Yakushiji E, Takiguchi S, Nakaya K, Hisada T, Uehara Y, Ogura M, Sasaki M, Komatsu T, Horii S, Mochizuki S, Yoshimura M, Ikewaki K. Pioglitazone enhances cholesterol efflux from macrophages by increasing ABCA1/ABCG1 expressions via PPAR γ /LXR α pathway: findings from in vitro and ex vivo studies. *Atherosclerosis*. 2011; 219 (1): 141-50.
- Palmefors H, DuttaRoy S, Rundqvist B, Börjesson M. The effect of physical activity or exercise on key biomarkers in atherosclerosis a systematic review. *Atherosclerosis*. 2014; 235(1): 150-61.
- Parish S, Offer A, Clarke R, Hopewell JC, Hill MR, Otvos JD, Armitage J, Collins R; Heart Protection Study Collaborative Group. Lipids and lipoproteins and risk of different vascular events in the MRC/BHF Heart Protection Study. *Circulation*. 2012; 125 (20): 2469-78.
- Park S, Lee J, Kang DY, Rhee CW, Park BJ. Indoor physical activity reduces all-cause and cardiovascular disease mortality among elderly women. *J Prev Med Public Health*. 2012; 45 (1): 21-8.
- Pirim D, Wang X, Radwan ZH, Niemsiri V, Hokanson JE, Hamman RF, Barmada MM, Demirci FY, Kamboh MI. Lipoprotein lipase gene sequencing and plasma lipid profile. *J Lipid Res*. 2014; 55 (1): 85-93.

- Podrez EA, Poliakov E, Shen Z, Zhang R, Deng Y, Sun M, Finton PJ, Shan L, Gugiu B, Fox PL, Hoff HF, Salomon RG, Hazen SL. Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36. *J Biol Chem*. 2002; 277 (41): 38503-16.
- Plüddemann A, Neyen C, Gordon S. Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands. *Methods*. 2007; 43: 207-17.
- Puntoni M, Sbrana F, Bigazzi F, Sampietro T. Tangier disease: epidemiology, pathophysiology, and management. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2012; 12(5): 303-11.
- Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM, Mangelsdorf DJ. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science*. 2000; 289 (5484): 1524-29.
- Ramanchandran S, Penumetcha M, Merchant N K, Santanam N, Rong R, Parthasarathy S. Exercise reduces preexisting atherosclerotic lesions in LDL receptor knockout mice. *Atherosclerosis*. 2005; 178: 33-38.
- Ribeiro I C D, Iborra R T, Neves M Q T S, Lottenberg S A, Charf A M, Nunes V, Negrão C, Nakandakare E R, Quintão E C R, Passarelli M. HDL atheroprotection by aerobic exercise training in type 2 diabetes mellitus. *Med Sci Sports Exerc*. 2008; 40(5): 779-86.
- Rocco DDFM. O treinamento físico aeróbico acelera o transporte reverso de colesterol de macrófagos em camundongos selvagens e transgênicos para CETP humana [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2010.
- Rocco D, Okuda L, Pinto R, Ferreira F, Kubo S, Nakandakare E, Quintão E, Catanozi S, Passarelli M. Aerobic exercise improves reverse cholesterol transport in cholesteryl ester transfer protein transgenic mice. *Lipids*. 2011; 46 (7): 617-625.

- Rosenson RS, Brewer HB Jr, Chapman MJ, Fazio S, Hussain MM, Kontush A, Krauss RM, Otvos JD, Remaley AT, Schaefer EJ. HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events. *Clin Chem*. 2011; 57 (3): 392-410.
- Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Fye CL, Anderson JW, Elam MB, Fass FH, Linares E, Schaeffer EJ, Schectman G, Wilt TJ, Wittes J. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *N Engl J Med*. 1999; 341(6) 410-18.
- Sakaguchi H, Takeya M, Suzuki H, Hakamata H, Kodama T, Horiuchi S, Gordon S, van der Laan LJ, Kraal G, Ishibashi S, Kitamura N, Takahashi K. Role of macrophage scavenger receptors in diet-induced atherosclerosis in mice. *Lab Invest*. 1998; 78 (4): 423-34.
- Sankaranarayanan S, de la Llera-Moya M, Drazul-Schrader D, Phillips MC, Kellner-Weibel G, Rothblat GH. Serum albumin acts as a shuttle to enhance cholesterol efflux from cells. *Journal of Lipid Research*. 2013; 54(3): 671-6.
- Sasaki T, Nakata R, Inoue H, Shimizui M, Inouei J, Sato Ryuichiro. The role of AMPK and PPAR γ 1 in exercise-induced lipoprotein lipase in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014; 306 (9): E1085-92.
- Schmidt C, Bergstrom G. Apolipoprotein B and apolipoprotein A-I in vascular risk prediction - a review. *Curr Pharm Des*. 2014; 20 (40): 6289-98.
- Seneviratne AN, Sivagurunathan B, Monaco C. Toll-like receptors and macrophage activation in atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 2012; 413 (1-2): 3-14.
- Shah AS, Tan L, Long J L, Davidson W S. Proteomic diversity of high density lipoproteins: our emerging understanding of its importance in lipid transport and beyond. *J. Lipid Res*. 2013; 54: 2575–85.

- Simes RJ, Marschner IC, Hunt D, Colquhoun D, Sullivan D, Stewart RA, Hague W, Keech A, Thompson P, White H, Shaw J, Tonkin A; LIPID Study Investigators. Relationship between lipid levels and clinical outcomes in the Long-term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease (LIPID) Trial: to what extent is the reduction in coronary events with pravastatin explained by on-study lipid levels? *Circulation*. 2002; 105 (10): 1162-9.
- Sondegard E, Poulsen MK, Jensen MD, Nielsen S. Acute changes in lipoprotein subclasses during exercise. *Metabolism*. 2014; 63 (1): 61-8.
- Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*. 2004; 84(4): 1381-478.
- Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, Bairey Merz CN, Blum CB, Eckel RH, Goldberg AC, Gordon D, Levy D, Lloyd-Jones DM, McBride P, Schwartz JS, Shero ST, Smith SC Jr, Watson K, Wilson PW. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2014; 63: 3024-25.
- Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T, Takashima Y, Kawabe Y, Cynshi O, Wada Y, Honda M, Kurihara H, Aburatani H, Doi T, Matsumoto A, Azuma S, Noda T, Toyoda Y, Itakura H, Yazaki Y, Kodama T. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature*. 1997; 386 (6622): 292-6.
- Sviridov D, Kingwell B, Hoang A, Dart A, Nestel A. Single session exercise stimulate formation of pre β -HDL in leg muscle. *J Lipid Res*. 2003; 44: 522-526.
- Tall AR, Krumholz S, Olivecrona T, Deckelbaum RJ. Plasma phospholipid transfer protein enhances transfer and exchange of phospholipids between very low density lipoproteins and high density lipoproteins during lipolysis. *J Lipid Res*. 1985; 26: 842– 51.

- Tanabe N, Iso H, Okada K, Nakamura Y, Harada A, Ohashi Y, Ando T, Ueshima H. Serum total non-high-density lipoprotein and the risk prediction of cardiovascular events – JALS-ECC. *Circ J*. 2010; 74(7): 1346-56.
- Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: Pathogenic and regulatory Pathways. *Physiol Rev*. 2006; 86: 515-81.
- Terasaka N, Wang N, Yvan-Charvet L, Tall A. R. High-density lipoprotein protects macrophages from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by promoting efflux of 7-ketocholesterol via ABCG1. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2007; 104: 15093–8.
- Terpstra A, Nicolosi R, Hebert P. In vitro incorporation of radiolabeled cholesteryl esters into high and low density lipoproteins. *JLR*. 1989; 30:1663-71.
- Thomas AW, Davies NA, Moir H, Watkeys L, Ruffino JS, Isa SA, Butcher LR, Hughes MG, Morris K, Webb R. Exercise-associated generation of PPAR γ ligands activates PPAR γ signaling events and upregulates genes related to lipid metabolism. *J Appl Physiol*. 2012; 112: 806-812.
- Thompson PD, Yurgalevitch SM, Flynn MM, Zmuda JM, SpannausMartin D, Saritelli A, Bausserman L, Herbert PN. Effect of prolonged exercise training without weight loss on high-density lipoprotein metabolism in overweight men. *Metabolism*. 1997; 46: 217–223.
- Trejo-Gutierrez JF, Fletcher G. Impact of exercise on blood lipids and lipoproteins. *J Clin Lipidol*. 2007; 1(3): 175-181.
- Tsopanakis C, Tesserommatis C. Cold swimming stress: effects on serum lipids, lipoproteins and LCAT activity in male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1991; 38 (4): 813-6.
- Vaisar T, Pennathur S, Green P S, Gharib S A, Hoofnagle A N, Cheung M C, Byun J, Vuletic S, Kassim S, Singh P, Chea H, Knopp R H, Brunzell J, Geary R, Chait A, Zhao X Q, Elkon K, Marcovina S, Ridker P, Oram J F, Heinecke J W. Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement

- activation in the antiinflammatory properties of HDL. *J Clin Invest.* 2007; 117(3): 746-56.
- Vaisberg M, Bachi AL, Latrilha C, Dioguardi GS, Bydlowski SP, Maranhão RC. Lipid transfer to HDL is higher in marathon runners than in sedentary subjects, but is acutely inhibited during the run. *Lipids.* 2012; 47 (7): 679-86.
- Van Eck M, De Winther MP, Herijgers N, Havekes LM, Hofker MH, Groot PH, Van Berkel TJ. Effect of human *scavenger* receptor class A overexpression in bone marrow-derived cells on cholesterol levels and atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20 (12): 2600-6.
- Vergeer M, Korporaal SJ, Franssen R, Meurs I, Out R, Hovingh GK, Hoekstra M, Sierts JA, Dallinga-Thie GM, Motazacker MM, Holleboom AG, Van Berkel TJ, Kastelein JJ, Van Eck M, Kuivenhoven JA. Genetic variant of the *scavenger* receptor BI in humans. *Engl J Med.* 2011; 364 (2): 136-45.
- Walldius G, Jungner I. Apolipoprotein B and apolipoprotein A-I: risk indicators of coronary heart disease and targets for lipid-modifying therapy. *J Intern Med.* 2004; 255 (2): 188-205.
- Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med.* 2011; 17 (11): 1410-22.
- Williams PT, Krauss RM, Wood PD, Lindgren FT, Giotas C, Vranizan KM. Lipoprotein subfractions of runners and sedentary men. *Metabolism.* 1986 Jan; 35(1): 45-52
- Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15(5): 551-61.
- Wilund KR, Feeney LA, Tomayko EJ, Chung HR, Kim K. Endurance exercise training reduces gallstone development in mice. *J Appl Physiol* (1985). 2008; 104 (3): 761-5.
- Wilson PW, Abbot RD, Castelli WP. High density lipoprotein cholesterol and mortality – The Framingham Heart Study. *Atherosclerosis.* 1988; 8: 737-41.

- Womack CJ, Nagelkirk PR, Coughlin AM. Exercise-induced changes in coagulation and fibrinolysis in healthy populations and patients with cardiovascular disease. *Sports Med.* 2003; 33 (11): 795-807.
- Wu XD, Zeng K, Liu WL, Gao YG, Gong CS, Zhang CX, Chen YQ. Effect of Aerobic Exercise on miRNA-TLR4 Signaling in Atherosclerosis. *Int J Sports Med.* 2014; 35 (4): 344-50.
- Yakeu G, Butcher L, Isa S, Webb R, Roberts AW, Thomas AW, Backx K, James PE, Morris K. Low-intensity exercise enhances expression of markers of alternative activation in circulating leukocytes: roles of PPAR γ and Th2 cytokines. *Atherosclerosis.* 2010; 212 (2): 668-673.