Guilherme da Silva Ferreira

**TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO ALTERA SELETIVAMENTE A
CONCENTRAÇÃO E O METABOLISMO ARTERIAL DE ÓXIDOS
DE COLESTEROL E REDUZ COLESTEROL NA AORTA DE
CAMUNDONGOS DISLIPIDÊMICOS**

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

2017

Guilherme da Silva Ferreira

**TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO ALTERA SELETIVAMENTE A
CONCENTRAÇÃO E O METABOLISMO ARTERIAL DE ÓXIDOS
DE COLESTEROL E REDUZ COLESTEROL NA AORTA DE
CAMUNDONGOS DISLIPIDÊMICOS**

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

2017

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Lípidos (LIM-10) da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Departamento de Clínica Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com a colaboração da Unidade de Reabilitação Cardiovascular do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da USP. Projeto aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (nº 074/14). Apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – 2014/07617-6.

DEDICATÓRIA

Aos meus avós Pedro Marques e Maria Gama.

AGRADECIMENTOS

Essa pesquisa foi desenvolvida por muitas mãos. Mãos que me auxiliaram, trabalharam, incentivaram, consolaram e guiaram. Espero que esse pequeno espaço sirva apenas para formalizar a grande gratidão que sinto por todos que de alguma forma contribuíram para construção do conhecimento aqui descrito, e para minha evolução pessoal, uma vez que muito me alegraria se as minhas atitudes de agradecimento anteciparam minhas palavras.

Antes de tudo, devo agradecer aos meus familiares, pelo suporte sem o qual seria impossível a realização desse mestrado. Em especial agradeço aos meus avós pelo apoio incondicional, que vai para além do mundo físico e material, e só pode ser sentido com o coração. Minha avó Geusa, talvez sem saber, me ensinou pelo exemplo a beleza e a necessidade do estudo, se formou no ensino médio aos 47 anos e hoje, mesmo aposentada, continua estudando, isso é lindo! Espero chegar a sua idade com a mesma disposição para o novo. Meu avô, Pedro Marques, a primeira pessoa a viver um sonho comigo, apesar de sempre desejar um neto jogador de futebol, estaria muito orgulhoso, não apenas desse manuscrito, mas de todo caminho percorrido nesse mestrado. Te amo família!

Estendo esses primeiros agradecimentos à Tatiane Andrade, que apesar de não ser da família (ainda?), já os tomou para si. A cada fim do dia, meu amor, compartilha comigo minhas vitórias e fracassos, e com calma e carinho transforma toda frustração em alegria. Quero ficar contigo até o fim da minha vida. Te amo preta!

No Laboratório de Fisiologia e Saúde da Universidade Santa Cecília conheci dois amantes da educação física, Dra. Débora Rocco e Dr. Alexandre Galvão, meus primeiros orientadores, conselheiros até hoje, e impulsionadores do meu Eu pesquisador. Muito obrigado por terem me apresentado ao laboratório de Lípides e também pelo reconhecimento e trabalhos que realizamos juntos ao longo desses 8 anos que nos conhecemos.

Ao vir para São Paulo fui acolhido de braços abertos pela família LIM-10. Receber bem é uma marca da cultura do Laboratório de Lípidos. Aqui, todos, sem exceção, participaram do meu crescimento intelectual e pessoal contribuindo com aquilo que estavam ao seu alcance. Uma vez que muitas pessoas contribuíram para o desenvolvimento dessa pesquisa seria muito difícil nomear cada uma delas aqui, sob pena de cometer injustiças com quem tanto me quis bem. Assim, transcrevo lembranças ao invés de nomes e espero que cada um possa se apropriar daquela da qual fez parte. Com muito carinho lembro-me daqueles que me indicaram leituras, tiraram dúvidas (e coloca dúvidas nisso), ensinaram protocolos, incentivaram, ajudaram com toda a burocracia, limpavam os locais de estudo e experimento, cuidaram dos camundongos, passaram horas comigo em algum ensaio, discutiram os resultados, revisaram minha monografia e relatórios, orientaram sobre análises estatísticas e como pensar como pesquisador e tudo mais relacionado à rotina de um pós-graduando. Agradeço ainda, aos momentos ociosos, as conversas jogadas fora, as discussões sobre política, história e pós pós-graduação, as viagens, aos almoços sempre tão alegres, aos lanches ao final da tarde, muito obrigado a todas as pessoas que fazem ou fizeram parte do LIM-10. Espero ter passado aos mais novos no laboratório todo ensinamento e costumes que apreendi com muito carinho.

Aos meus coautores sinto que preciso particularizar meus agradecimentos, não por serem mais importantes, mas por que essa pesquisa também é deles.

À Dra. Marisa Passarelli, minha orientadora, sou muito grato. Obrigado por acreditar na minha capacidade e força de vontade. Agradeço as histórias compartilhadas, as horas divididas, por sua paciência e atenção, e principalmente por dar luz a um universo, por mim, até então desconhecido.

Quando o assunto são animais de experimentação a primeira pessoa que vem a mente de qualquer um do laboratório é o Dr. Sergio Catanozi. Como se não bastasse seu vasto conhecimento nessa área, sua destreza na realização das mais delicadas cirurgias animais é algo espetacular. Se dependesse de mim para retirar o arco aórtico é provável que essa dissertação

fosse feita com elefantes. Muito Obrigado! Muito obrigado pelo amigo que se tornou!

À Valéria Nunes agradeço principalmente a sua paciência e tempo. Ao me ensinar a dosar os óxidos de colesterol ganhou um chato que ficava discutindo cada etapa do processo e cada resultado. Passamos muito tempo juntos na sala do cromatógrafo, espero que a tenha ajudado de alguma forma também.

Aos educadores físicos Dr. Rodrigo Tallada Iborra e a M.^a Paula Ramos os quais (somado aos seus anteriores) abriram as portas e pavimentaram o caminho para o estudo do exercício físico no Laboratório de Lípidos devo agradecer desde antes de iniciar meu projeto, uma vez que suas pesquisas de alguma forma conduziram a minha. Além disso, sinto que por força da nossa formação em educação física, os dois foram as pessoas que eu mais me apoiei até ter confiança (e depois também) de dar meus primeiros passos sozinho dentro do laboratório. Suas contribuições vão para além dessa tese e chegam ao meu crescimento profissional e pessoal.

Agradeço à Vanessa Del Bianco a sua incrível disponibilidade. Mesmo com seu trabalho externo, estava sempre disposta a me auxiliar, em especial nas diversas manipulações com os animais. Gosto muito de trabalhar com você!

Quase no fim do mestrado quando eu já estava fadigado da rotina experimental a Monique Melo chegou com duas mãos ávidas para trabalhar. Agradeço ao comprometimento e ao providencial auxílio. Espero tê-la retribuído com o meu tempo, ensinando-a aquilo que aprendi.

Por fim, apesar de não ser coautor especificamente desse trabalho, mas ser coautor de toda história do laboratório LIM-10, máximo respeito ao Dr. Eder Quintão por todo aprendizado e estímulo, e por essa grande família que se formou.

“Você pediu pelo meu esforço, eu te dei meu coração”.

Kobe Bryant

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. Martin Luther King

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Aterosclerose e óxidos de colesterol	1
1.2 Metabolismo dos óxidos de colesterol	4
1.2.1 Óxidos de colesterol e homeostase celular do colesterol	7
1.2.2 Óxidos de colesterol e transporte reverso de colesterol	11
1.3 Exercício físico e aterosclerose	15
1.4 Exercício físico e proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK)	18
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Modelo animal	24
3.2 Desenho experimental	25
3.3 Consumo de ração	27
3.4 Protocolo de treinamento físico	27
3.5 Teste de esforço máximo	28
3.6 Dosagens bioquímicas	28
3.7 Coleta de sangue para dosagem dos óxidos de colesterol	29
3.8 Coleta de tecidos	29
3.9 Extração de lípidos do arco aórtico	29
3.10 Concentração de óxidos de colesterol em macrófagos tratados com AICAR	30

3.11 Obtenção de lipoproteínas do plasma humano	31
3.12 Análise dos óxidos de colesterol por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa	32
3.13 Análise da expressão gênica relativa por transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR).....	34
3.13.1 Preparação dos tecidos e extração de RNA.....	34
3.13.2 Quantificação do conteúdo de mRNA	36
3.14 Análise estatística.....	37
4. RESULTADOS.....	39
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÃO	55
7. REFERÊNCIAS.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

24-OH C	24-hidroxicolesterol
25-OH C	25-hidroxicolesterol
27-OH C	27-hidroxicolesterol
7-CETO	7-cetocolesterol
7α-OH C	7 α -hidroxicolesterol
7β-OH C	7 β -hidroxicolesterol
ABCA1	Transportador A1 contendo cassete de ligação ao ATP
ABCG1	Transportador G1 contendo cassete de ligação ao ATP
ABCG5	Transportador G5 contendo cassete de ligação ao ATP
ABCG8	Transportador G8 contendo cassete de ligação ao ATP
ACAT	Acil-CoA:colesterol aciltransferase
ADP	Difosfato de adenosina
AICAR	5-aminoimidazol-4-carboxiamida-imidazol ribonucleotídeo
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPK	Proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina
ApoA-I	Apolipoproteína A-I
ApoE	Apolipoproteína E
ApoE^{-/-}	Camundongos C57BL/6 com inativação do gene que codifica a ApoE
ATP	Trifosfato de adenosina

BHT	Hidroxitolueno butilado
BSTFA	N,O-bis(trimetil-silil-trifluoro-acetamida)
CBS	Cistationina β -sintetase
CD36	Cluster de diferenciação 36
CD68	Cluster de diferenciação 68
cDNA	DNA complementar
CETP	Proteína de transferência de colesterol esterificado
CH25H	Colesterol 25-hidroxilase
CT	Colesterol Total
Ct	Limiar do ciclo ou <i>cycle threshold</i> (do inglês)
CTX	Cerebrotendinoxantomatose
CYP27A1	Citocromo P450, família 27, subfamília A, polipeptídeo 1
CYP46A1	Citocromo P450, família 46, subfamília A, polipeptídeo 1
CYP7A1	Citocromo P450, família 7, subfamília A, polipeptídeo 1
CYP7B1	Citocromo P450, família 7, subfamília B, polipeptídeo 1
CYP7B1	Citocromo P450, família 7, subfamília B, polipeptídeo 1
DEMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DP	Desvio padrão
DTNB	Ácido 5,5-ditiol-(2-nitrobenzoico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eNOS	Endotelial óxido nítrico sintase
ERO	Espécies reativas de oxigênio

GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa
Gp78	Glicoproteína 78
HDL	Lipoproteína de densidade alta
HDL-c	HDL Colesterol
HMGCoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA
INSIG	Gene induzido por insulina
LCAT	Lecitina colesterol aciltransferase
LDL	Lipoproteína de densidade baixa
LDL^{-/-}	Camundongos C57BL/6 com inativação do gene que codifica o receptor de LDL
LDL-ac	Lipoproteína de densidade baixa acetilada
LDL-c	LDL colesterol
LDLox	Lipoproteína densidade baixa oxidada
LDLr	Receptor de LDL
LOX-1	Receptor de LDLox semelhante à lectina 1
LXR	Receptor hepático X
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
PBS	Solução fosfato salino
QM	Quilomícron
RIN	Número da integridade do RNA
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
RT-qPCR	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real

S1p	Protease de sítio 1
S2p	Protease de sítio 2
S	Grupo Sedentário
SCAP	Proteína ativadora de clivagem de SREBP
SR B-I	Receptor <i>scavenger</i> classe B tipo I
SREBP	Proteína de ligação ao elemento responsivo a esterol
T	Grupo Treinado
TMCS	Trimetilcloro silano
TNB	Ácido 5-mercaptop-2-nitrobenzoico
TRC8	Translocação em carcinoma renal, cromossomo 8
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aterogênese.....	3
Figura 2 - Formação dos principais óxidos de colesterol.....	5
Figura 3 - Desenho experimental.	26
Figura 4 - Protocolo de avaliação da concentração de óxidos de colesterol em macrófagos tratados com AICAR.	31
Figura 5 - Cromatogramas demonstrativos dos óxidos de colesterol e seus padrões deuterados.	35
Figura 6 - Tempo para exaustão e variação do tempo para exaustão no teste de esforço máximo dos grupos sedentário e treinado, antes (basal) e após (final) o treinamento físico.	40
Figura 7 - Concentração de colesterol total (μg / mg de proteína) no arco aórtico de camundongos treinados e sedentários.	42
Figura 8 - Expressão de genes envolvidos no metabolismo de colesterol e óxidos de colesterol no arco aórtico em animais treinados e sedentários.....	43
Figura 9 - Expressão de genes envolvidos no metabolismo de colesterol e óxidos de colesterol em macrófagos tratados com AICAR.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de genes utilizados no estudo	36
Tabela 2 - Massa corporal e variáveis bioquímicas dos animais sedentários e treinados.....	39
Tabela 3 - Concentração de óxidos de colesterol no plasma e no arco aórtico de camundongos treinados (T) e sedentários (S).	41
Tabela 4 - Concentração dos óxidos de colesterol (ng/mg de proteína) em macrófagos tratados com AICAR 0,25mM e HDL2	44

RESUMO

Ferreira GS. **Treinamento físico aeróbio altera seletivamente a concentração e o metabolismo arterial de óxidos de colesterol e reduz colesterol na aorta de camundongos dislipidêmicos** [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Os óxidos de colesterol modulam o desenvolvimento da aterosclerose por mediar a síntese, captação e exportação de colesterol, além de inflamação e citotoxicidade na parede arterial. O exercício físico regular previne e regride a lesão aterosclerótica, por melhorar o perfil lipídico, transporte reverso de colesterol e defesas antioxidantes. A proteína cinase ativada por AMP (AMPK) é um importante mediador dos efeitos metabólicos do exercício físico. Em macrófagos, sua ativação vincula-se ao aumento no efluxo de colesterol e diminuição na captação de LDL. Entretanto, não está claro se o treinamento físico modula as concentrações de óxidos de colesterol, refletindo seu benefício sobre a prevenção da aterosclerose, e se esses efeitos podem ser mediados pela AMPK. O objetivo do presente estudo foi avaliar, em camundongos dislipidêmicos, o papel de 6 semanas de treinamento físico aeróbio sobre: o infiltrado de colesterol arterial e a distribuição de óxidos de colesterol no arco aórtico e no plasma; a expressão gênica de proteínas envolvidas na metabolização de óxidos de colesterol na parede arterial; e o efeito da ativação da AMPK em macrófagos, *in vitro*, sobre a concentração dos óxidos de colesterol e expressão de genes envolvidos na metabolização de óxidos de colesterol. Para tanto, camundongos machos *knockout* para apolipoproteína E, com 16 semanas de idade, alimentados com dieta padrão, foram incluídos no estudo. O treinamento físico foi realizado em esteira, 15 m/min, por 60 min, 5 dias/semana, durante 6 semanas. Lípides plasmáticos e glicose foram determinados por ensaio enzimático e glicosímetro, respectivamente, antes e após o treinamento físico. Colesterol arterial e óxidos de colesterol foram avaliados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. A expressão de genes envolvidos no metabolismo de lípidos foi avaliada RT-qPCR. Os resultados foram comparados por ANOVA de um fator com pós-teste

de Newman-Keuls ou teste t de *Student*. Peso corporal, colesterol total, TG, HDL-c, glicose e óxidos de colesterol no plasma foram semelhantes entre os grupos. O treinamento físico aumentou a concentração de 7 β -OH C (70%) e reduziu a de colesterol (32%) na aorta. Além disso, o exercício físico aumentou a expressão gênica da *Cyp27a1* (54%), *Cd36* (75%), *Cat* (70%), *Prkaa1* (*AMPK α 1*) (40%) e *Prkaa2* (*AMPK α 2*) (51%) e reduziu *Abcg1* (31%), *Olr1* (*LOX-1*) (65%), *Cyp7b1* (35%) e *Ch25h* (48%). Nenhuma alteração foi observada na expressão de *Abca1*, *Nr1h3* (*LXR α*) e *Nr1h2* (*LXR β*). Nos macrófagos, a ativação da AMPK por AICAR, reduziu o conteúdo de 7 α -OH C após estímulo com HDL₂. O tratamento com AICAR aumentou a expressão gênica de *Abca1* (52%) e *Cd36* (220%) e diminuiu *Prkaa1* (19%) e *Cyp27a1* (47%), e não alterou *Abcg1*, *Nr1h3* e *Nr1h2*. Em conclusão, em camundongos dislipidêmicos, o treinamento físico aeróbio, por 6 semanas, aumentou a concentração de 7 β -OH C, o que se vincula à maior expressão de *Cd36* no arco aórtico. A rápida difusão de óxidos de colesterol, como via complementar ao transporte reverso de colesterol, pode também ser favorecida pelo aumento e redução, respectivamente, na expressão de *Cyp27a1* e *Cyp7b1*, favorecendo maior liberação de 27-OH C das células. Juntamente com suas ações diretas que beneficiam o transporte reverso de colesterol, previamente descritas o treinamento físico diminui a concentração de colesterol na parede arterial, prevenindo a aterosclerose. Baseado nos ensaios *in vitro* a ativação da AMPK não parece contribuir para o aumento das concentrações de óxidos de colesterol após treinamento físico.

Descritores: 1. Aterosclerose; 2. AMPK; 3. Dislipidemia; 4. Efluxo de colesterol; 5. Exercício físico aeróbio; 4. Óxidos de colesterol.

ABSTRACT

Ferreira GS. **Aerobic exercise training selectively changes oxysterol levels and metabolism reducing cholesterol accumulation in the aorta of dyslipidemic mice** [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

Oxysterols modulate the development of atherosclerosis by mediating cholesterol synthesis, uptake and exportation as well as inflammation and cytotoxicity in the arterial wall. Regular physical exercise prevents and regresses atherosclerosis by improving lipid metabolism, reverse cholesterol transport and antioxidant defenses. AMP-activated protein kinase (AMPK) plays an important role in the beneficial metabolic adaptations of physical exercise. In macrophages, its activation is related to the enhancement in cholesterol efflux and reduction in LDL uptake. However, it is not clear whether exercise training benefits in atherosclerosis is mediated by its action in oxysterols concentrations, and whether this can be modulated by AMPK. The aim of this study was to evaluate the role of a 6-week aerobic exercise training program in dyslipidemic mice in the arterial and plasma accumulation of cholesterol and oxysterols subspecies; expression of genes related to oxysterols metabolisms in the aortic arch, and the effect of AMPK activation in macrophage on the concentration of oxysterols and expression of genes linked to oxysterols metabolism. Sixteen-week-old male apoE knockout mice fed a chow diet were included in the protocol. Animals were trained in a treadmill running, 15 m/min, 60 min, 5 days/week, during 6 weeks. Plasma lipids and glucose were determined by enzymatic techniques and glycosometer, respectively. Cholesterol in aortic arch and oxysterols were measured by gas chromatography/mass spectrometer. The expression of genes involved in lipid metabolism was determined by RT-qPCR. Results (mean $\pm$ SD) were compared by one-way ANOVA with Newman–Keuls posttest or Student’s t-test. Body weight and plasma total cholesterol, TG, HDL-c, glucose, and oxysterols were similar among groups. The exercise training enhanced 7 β -hydroxycholesterol (70%) and reduced cholesterol (32%) in the

aortic arch. In addition, exercise increased *Cyp27a1* (54%), *Cd36* (75%), *cat* (70%), *Prkaa1* (AMPK α 1) (40%) and *Prkaa2* (AMPK α 2) (51%) mRNA. No changes were observed in the expression of *Abca1*, *Nr1h3* (LXR α) and *Nr1h2* (LXR β). In macrophages, the activation of AMPK by AICAR, reduced 7 α -hydroxycholesterol level after stimulation by HDL₂. Treatment with AICAR increased *Abca1* (52%) and *Cd36* (220%), decreased *Prkaa1* (19%) e *Cyp27a1* (47%), and did not change *Abcg1*, *Nr1h3* e *Nr1h2*. In conclusion, in dyslipidemic mice aerobic exercise training increases the nonenzymatic-driven oxysterol, 7 β -hydroxycholesterol, which is related to the enhanced expression of *Cd36*. The rapid diffusion of oxysterols, as a complementary pathway for the reverse cholesterol transport, may also be favored by the increase and reduction of *Cyp27a1* and *Cyp7b1* expressions, respectively, which in turns favors 27-OH C desorption from cells. Together with its direct role in improving reverse cholesterol transport as previously reported, aerobic exercise training diminishes cholesterol accumulation in the arterial wall preventing atherosclerosis. Based on in vitro assays, the AMPK activation does not seem to contribute to the effect of exercise in increasing oxysterols.

Key words: 1. Aerobic exercise training; 2. AMPK; 3. Atherosclerosis; 4. Cholesterol efflux; 5. Dyslipidemia; 6. Oxysterol.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aterosclerose e óxidos de colesterol

As doenças cardiovasculares, representadas principalmente pela doença aterosclerótica, contribuem como a principal causa de morte no mundo, sendo responsáveis por, aproximadamente, um terço de todos os óbitos (GBD 2015 *Mortality and Causes of Death Collaborators*, 2016).

A aterosclerose é uma doença complexa e progressiva, iniciada pelo acúmulo de lípidos na íntima arterial. Sua gênese ocorre na infância e seu desenvolvimento é mais acentuado na presença de fatores de risco, como: dislipidemias, diabetes mellitus, hipertensão arterial, tabagismo, sexo masculino, idade e história familiar de doença cardiovascular. Contribuem, ainda, fatores de risco secundários, como obesidade, sedentarismo e fatores psicossociais.

Diversos estudos populacionais, sendo o mais clássico o estudo de Framingham (Gordon et al., 1977; Mahmood et al., 2014), demonstram associação positiva entre hipercolesterolemia, caracterizada pela elevação do colesterol na lipoproteína de densidade baixa (LDL-c), e desenvolvimento da placa aterosclerótica. Somam-se ainda estudos de intervenção, na prevenção primária e secundária, que ao reduzirem os valores de LDL-c, evidenciaram diminuição da mortalidade por doenças cardiovasculares. (Zhao et al., 2016; *Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration*, 2015).

Por outro lado, a elevação do colesterol na lipoproteína de densidade alta (HDL-c) associa-se forte e inversamente com o risco cardiovascular (*The Emerging Risk Factors Collaboration*, 2009) devido às propriedades antiaterogênicas da HDL, as quais incluem a mediação do transporte reverso de colesterol, atividade antioxidante, anti-inflamatória e vasodilatadora (Rosenson

et al., 2016). No entanto, embora os estudos epidemiológicos apoiem a importância do HDL-c, ensaios clínicos randomizados com o uso de drogas que objetivaram seu aumento, e estudos com base genética têm falhado em demonstrar essa associação. Dessa forma, atualmente tem sido sugerido que a avaliação da função da HDL, especificamente a capacidade de efluxo de colesterol, seria melhor preditor de eventos cardiovasculares (Siddiqi et al., 2015).

O desenvolvimento da lesão aterosclerótica inicia-se com o fluxo de partículas LDL através da barreira endotelial para o espaço subendotelial, por transcitose ou ultrafiltração (Michel et al., 2015). O aumento do estresse de cisalhamento (*shear stress*), bem como distúrbios no endotélio vascular contribuem para o aumento da retenção dessas partículas por favorecerem a permeabilidade vascular. Em resposta à infiltração de LDL, células do sistema imunológico, dentre elas, células dendríticas, *natural killer*, células T, mas especialmente os monócitos, são recrutados para o foco da lesão. Na íntima arterial, os componentes lipídicos e proteicos das LDL são mais efetivamente oxidados. Ainda, monócitos diferenciam-se em macrófagos que reconhecem por meio dos receptores *scavenger* essas partículas modificadas, captando-as por endocitose (Steinberg e Witztum, 2010; Goldstein e Brown, 2015). A excessiva captação de LDL modificadas, aliada à remoção ineficiente de colesterol pelas HDL, leva ao acúmulo intracelular de colesterol, desencadeando respostas inflamatórias e citotóxicas que sustentam o desenvolvimento e agravamento da lesão (**figura 1**) (Tabas, 2016).

Baseados, principalmente, em estudos *in vitro*, muitos autores têm proposto que as respostas citotóxicas relacionadas às LDL oxidadas (LDL_{ox}) são, em grande parte, mediadas pelos óxidos de colesterol (Brown e Jessup, 2009; Sekiya et al., 2014; Kim et al., 2015). Por outro lado, as vias que promovem a exportação do excesso de colesterol de macrófagos também são moduladas por subtipos destes esteróis (Björkhem et al., 1994).

Figura 1 - Aterogênese. A lesão aterosclerótica inicia-se com o fluxo de partículas de LDL nativas ou modificadas na circulação, através da barreira endotelial para o espaço subendotelial. Na íntima, as LDL são oxidadas mais eficientemente, exercendo quimiotaxia para monócitos, os quais se diferenciam em macrófagos. A captação excessiva de LDL modificadas pelos macrófagos leva ao acúmulo intracelular de colesterol, desencadeando respostas inflamatórias e citotóxicas que sustentam o desenvolvimento e agravamento da lesão. O efluxo de colesterol mediado pelas apoA-I e HDL favorece o tráfego de colesterol ao fígado, por meio do transporte reverso de colesterol. Esta figura foi produzida utilizando banco de imagens *Servier Medical Art* (<http://www.servier.com.br/content/banco-de-imagens>).

Os óxidos de colesterol são produtos derivados da modificação oxidativa do colesterol. Essas moléculas participam da regulação de muitos processos fisiológicos, dentre eles destacam-se, seu papel na homeostase intracelular de colesterol, síntese de ácidos biliares, ativação de receptores nucleares e eliminação de colesterol do sistema nervoso central (Lorbek et al., 2012; Demina et al., 2016; Radhakrishnan et al., 2008; Meaney et al. 2000). Embora presentes nas células e no plasma em concentrações muito inferiores as do

colesterol, participam da gênese e evolução de diversas doenças crônicas (Poli et al., 2009).

Maiores concentrações plasmáticas dos produtos de oxidação do colesterol são observadas em indivíduos com aterosclerose e seus valores são associados ao grau de estenose coronariana (Gargiulo et al., 2016; Brown e Jessup, 1999). Do mesmo modo, na placa aterosclerótica existe elevada concentração dos óxidos de colesterol e seus valores são ainda maiores com seu desenvolvimento (Garcia-Cruzet et al., 2001). Macrófagos isolados da aorta de camundongos hipercolesterolêmicos possuem 16 vezes mais conteúdo de óxidos de colesterol que macrófagos de camundongos normocolesterolêmicos (Maor et al., 2000).

Virginio et al. (2015) observaram que artérias de pacientes com doença arterial periférica grave possuíam maiores concentrações de 24-hidroxicolesterol (24-OH C) e 27-hidroxicolesterol (27-OH C), quando comparadas às artérias de indivíduos controles. Além disso, esses esteróis se correlacionaram positivamente com a expressão de proteína C reativa, um preditor independente de risco cardiovascular.

1.2 Metabolismo dos óxidos de colesterol

Os óxidos de colesterol são derivados da modificação oxidativa enzimática ou não enzimática da molécula do colesterol. A formação dos óxidos de colesterol por via enzimática é catalisada por mono-oxigenases específicas, em especial as da família citocromo P450, que conduzem a oxidação, quase sempre, da cadeia lateral do colesterol. Os mais relevantes óxidos de colesterol formados nessa via e as respectivas enzimas responsáveis pela sua produção são: 7 α -hidroxicolesterol (7 α -OH C), citocromo P450, família 7, subfamília A, polipeptídeo 1 (CYP7A1); 24-OH C, citocromo P450, família 46, subfamília A, polipeptídeo 1 (CYP46A1); 25-hidroxicolesterol (25-OH C), colesterol 25-hidroxilase (CH25H); e 27-OH C, citocromo P450,

família 27, subfamília A, polipeptídeo 1 (CYP27A1) (**figura 2**) (Brown e Jessup, 2009).

A dupla ligação do colesterol no anel B favorece sua oxidação espontânea por espécies reativas de oxigênio (ERO), contribuindo para a oxidação do colesterol na posição C7. O 7 β -hidroxicolessterol (7 β -OH C) e o 7-cetocolesterol (7-CETO) representam os principais produtos dessa via (**figura 2**) (Brown e Jessup, 2009).

Figura 2 - Formação dos principais óxidos de colesterol. Os óxidos de colesterol podem ser formados por meio de vias enzimáticas (direita) e não enzimáticas (esquerda). 7 α -OH C e 25-OH C podem ser produzidos por ambas as vias (Adaptada de Brown e Jessup, 2009).

Além de serem produzidos endogenamente, os óxidos de colesterol, em especial aqueles gerados por auto-oxidação, podem ser advindos da dieta (Staprans et al., 2000). Alimentos de origem animal, quando submetidos a altas temperaturas (Min et al., 2016), desidratação (Chan et al., 1993), irradiação

(Lee et al., 2006) e estoque na presença de oxigênio (Conchillo et al., 2005) formam grandes quantidades desses produtos.

Em relação ao preparo do alimento, a extensão da oxidação lipídica em carnes, está relacionada ao tempo, a temperatura e ao método de cocção. Segundo Pagniangvait (1995) a formação dos produtos de oxidação do colesterol está associada à maior temperatura e tempo de preparo. Apesar de o método de preparo influenciar na formação dos óxidos de colesterol, resultados conflitantes impedem uma afirmação mais precisa. Khan et al. (2015) verificaram que grelhar ou preparar no micro-ondas produtos cárneos, levou à uma maior produção dos óxidos de colesterol comparado ao assar. Por outro lado, Min et al. (2016) e Broncano et al. (2009) não observaram diferenças na concentração desses esteróis após diferentes métodos de preparo.

Cerca de 1-5% do colesterol consumido na dieta ocidental está na forma oxidada (Staprans et al., 2006). Em camundongos e coelhos, a suplementação de óxidos de colesterol aumenta a severidade da lesão aterosclerótica (Staprans et al., 2000; Staprans et al., 1998). Sato et al. (2012) demonstraram que o consumo de óxidos de colesterol se associa ao maior desenvolvimento da aterosclerose e desestabilização da placa, mesmo quando seus valores plasmáticos não estão aumentados.

Não existe consenso na literatura se os óxidos de colesterol são mais facilmente absorvidos que o colesterol, nem quanto à sua eficiência de absorção, com resultados variando entre 6% (Vine et al., 1997) e 93% (Bascoul et al., 1986). Segundo Brown e Jessup (1999) essa grande heterogeneidade nos resultados é devido a variações na dose, modelos e veículo utilizados para administração dos óxidos de colesterol.

Assim como o colesterol, os óxidos de colesterol da dieta são absorvidos no intestino delgado, entram na circulação por intermédio dos quilomícrons (QM) e são transportados ao fígado, onde podem ser incorporados nas lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) (Staprans et al., 1996; Staprans et al., 2003).

Os óxidos de colesterol da superfície das lipoproteínas e no interior das células são esterificado pelas enzimas, lecitina colesterol aciltransferase (LCAT) e acil-CoA:colesterol aciltransferase (ACAT), respectivamente. É observado que a maior parte dos óxidos de colesterol presente nas lipoproteínas (Dzeletovic et al., 1995) e em macrófagos da lesão aterosclerótica está na forma esterificada (Brown e Jessup et al., 2009). Nas células, a esterificação dos produtos de oxidação do colesterol limita seu acesso à membrana e favorece seu armazenamento.

Na circulação sistêmica, os óxidos de colesterol são permutáveis entre as lipoproteínas, pela ação da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP), e são preferencialmente transportados pelas LDL e HDL (Babiker et al., 1999). Daí são levados muito mais rapidamente aos tecidos, quando comparados ao colesterol, para serem metabolizados (Krut et al., 1997).

O rápido catabolismo dos óxidos de colesterol é favorecido por sua maior hidrofília e por entrar na via de excreção do colesterol em estágios mais avançados. Em relação à última capacidade citada, é interessante comentar, que a excreção fecal de ácidos biliares representa a principal forma de eliminação de colesterol corporal. Duas vias estão envolvidas na formação de ácidos biliares pelos hepatócitos: a via clássica, ou neutra, que representa a rota predominante, se inicia pela formação de 7α -OH C, sendo altamente regulada pela produção da CYP7A1; e a via alternativa, ou ácida, no qual a produção de 27-OH C pela enzima mitocondrial CYP27A1, representa uma etapa limitante. Apenas, cerca de 5% e 25%, em humanos e roedores, nessa ordem, de todo ácido biliar é produzido pela via alternativa (Duane e Javitt, 1999; Vlahcevic et al., 1999; Lorbek et al., 2012).

1.2.1 Óxidos de colesterol e homeostase celular do colesterol

O colesterol é um importante componente das membranas celulares, onde ocupa os espaços entre as cabeças polares dos fosfolípidos regulando a

fluidez da membrana. Ainda, possui função como precursor da síntese de hormônios esteroídicos, vitamina D e ácidos biliares.

O colesterol é uma molécula de 27 carbonos, apresenta 4 anéis característicos do núcleo esteroide e é sintetizado a partir da polimerização do acetato. Nesse processo, foi de fundamental importância a descoberta da conversão do composto 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMGCoA), em mevalonato, catalisado pela HMGCoA redutase, como uma etapa limitante da taxa de reação na biossíntese do colesterol e outros isoprenoides. De fato, a descoberta dos inibidores da HMGCoA redutase, estatinas, em 1976, tornou-se um marco na terapêutica da hipercolesterolemia (Goldstein e Brown, 2015).

É importante que a concentração de colesterol no meio intracelular se mantenha dentro de uma faixa restrita, uma vez que o seu acúmulo se vincula a alterações na composição e funções de membranas celulares, indução de estresse oxidativo e de retículo endoplasmático, inflamação e diminuição da sobrevivência celular (Arguello et al., 2015).

A homeostase de colesterol celular é regulada por meio dos mecanismos de: 1. Síntese; 2. Captação das LDL e 3. Remoção por aceptores externos, como apolipoproteína A-I (apoA-I) e HDL (Demina et al., 2016). Em situações de privação de colesterol, sua síntese e captação são estimulados, pelo aumento da HMGCoA redutase e do receptor de LDL (LDLr), e sua exportação diminuída. Em sobrecarga de colesterol, o oposto é verdadeiro.

Nesses processos de ajuste, mais do que metabólitos do colesterol, os óxidos de colesterol são lípides bioativos e sinalizadores mais potentes em regular a homeostase de colesterol que o próprio colesterol.

Variações nas concentrações intracelulares de colesterol e seus óxidos desencadeiam processos de ajustes, tanto na síntese quanto na captação de colesterol, em especial por inibir a atividade da proteína de ligação ao elemento responsivo a esterol (SREBP).

A SREBP é uma proteína de 1.150 aminoácidos, que imediatamente após sua tradução no ribossomo, se liga a proteína ativadora de clivagem de SREBP

(SCAP) na membrana do retículo endoplasmático (Brown e Goldstein 1997; Gong et al., 2016). Em células deprimidas em esteróis, a SCAP se liga a um conjunto de proteínas denominado “complexo II de proteína do envoltório” (COPII), que medeiam o transporte vesicular do complexo SCAP-SREBP ao Golgi, onde a SREBP sofre duas clivagens sucessivas pelas proteases: protease de sítio 1 (S1p) e protease de sítio 2 (S2p). Como resultado, libera-se o fragmento transcricionalmente ativo que migra ao núcleo e ativa a transcrição de genes relacionados à síntese de colesterol, como a HMGCoA redutase, e à captação, como o LDLr (Sun et al., 2007).

Por outro lado, a sobrecarga com esteróis impede o transporte do complexo SCAP-SREBP ao Golgi, por aprisionar esse complexo no retículo endoplasmático.

O aumento do colesterol na membrana do retículo endoplasmático, acima de 4-5% do total de lípidos, possibilita a ligação deste com a SCAP, gerando mudanças conformacionais, que tornam inacessível sua região de associação a COP II, e permitindo sua ligação à INSIG (gene induzido por insulina), que estabiliza a proteína, aprisionando o complexo SCAP/SREBP na organela (Radhakrishnan et al., 2008; Motamed et al., 2011; Goldstein e Brown, 2015). No entanto, os óxidos de colesterol, principalmente aqueles oxidados na cadeia lateral, ligam-se diretamente à INSIG, induzindo sua associação ao complexo SCAP/SREBP (Radhakrishnan et al., 2008). Assim, ambos os esteróis impedem a SREBP de ir ao núcleo exercer seus efeitos lipogênicos.

Além disso, os produtos de oxidação do colesterol estimulam a ligação da INSIG à HMGCoA redutase, conduzindo esta as ubiquitinas ligases gp78 (glicoproteína 78) e TRC8 (translocação em carcinoma renal, cromossomo 8) para endereçamento à degradação proteossomal (Morris et al., 2014; Jo et al., 2011).

Diferentemente dos LDLr, os receptores *scavengers* sofrem regulação positiva quando macrófagos são sobrecarregados com óxidos de colesterol (Jedidi et al., 2006; Leonarduzzi et al., 2010). Leonarduzzi et al. (2010) estimularam essas células com uma mistura de óxidos de colesterol em

proporções similares ao plasma humano, e demonstraram aumento no conteúdo dos receptores CD36 (cluster de diferenciação 36) e CD68 (cluster de diferenciação 68) decorrente da maior expressão de PPAR gama (receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama). Esses eventos foram acompanhados pela maior internalização de LDLox e formação de células espumosas.

Muitas ações dos óxidos de colesterol têm sido sugeridas como capazes de induzir o desenvolvimento da aterosclerose, dentre elas estão: 1. aumento do estresse oxidativo; 2. aumento do perfil inflamatório; 3. indução da morte celular; 4. disfunção endotelial; 5. calcificação vascular; 6. maior recrutamento de monócitos/macrófagos; 7. produção de células espumosas (Gargiulo et al., 2016; Poli et al., 2009).

Apesar de muito conhecimento ter sido desenvolvido acerca dos óxidos de colesterol nas últimas décadas, seu real papel na aterosclerose ainda é controverso. Vários autores têm constatado que quando incubados com diferentes tipos celulares, os óxidos de colesterol são altamente citotóxicos (Jedidi et al., 2006; Leonarduzzi et al., 2010; Gargiulo et al., 2016). Por outro lado, a maior parte desses estudos foram realizados com cultura celular e utilizaram quantidades supra fisiológicas desses esteróis.

Vurusaner et al. (2014), interessadamente, observaram que células monocíticas tratadas com baixa concentração de 27-OH C apresentam aumento na resposta de sobrevivência celular envolvendo o eixo ERK/Akt. Este efeito foi dependente da maior produção de ERO. Da mesma forma, outro óxido de colesterol, 7 β -OH C, induziu a proliferação celular e inibiu a apoptose em células endoteliais do cordão umbilical humano, quando adicionado em baixas concentrações. (Trevisi et al., 2010).

O 27-hidroxicolesterol é descrito como modulador seletivo do receptor de estrógeno (DuSell et al., 2008). Estudos em cultura de células, modelos animais e humanos evidenciam maior concentração deste óxido em células de tumor de mama positivas para receptor estrogênico. Sua concentração associa-se positivamente com o potencial mitogênico destas células e

promove, por meio da ativação de LXR, o desenvolvimento de metástases (Wu et al., 2013; Nelson et al., 2013). Estas e outras evidências ressaltam o importante papel biológico dos óxidos de colesterol.

1.2.2 Óxidos de colesterol e transporte reverso de colesterol

O transporte reverso de colesterol é o sistema pelo qual o excesso de colesterol é removido das células periféricas e transportado ao fígado para eliminação na bile e fezes. Uma vez que os receptores *scavengers* não são negativamente regulados pelo conteúdo de esteróis, a remoção deste para aceptores externos é essencial na prevenção da formação de células espumosas (Demina et al., 2016). Assim, não surpreende o fato de a capacidade de efluxo de colesterol da HDL ser inversamente associada à incidência de eventos coronarianos, independente de vários fatores de riscos clássicos (Saleheen et al., 2015).

O efluxo de colesterol livre é inicialmente mediado pela interação da apo A-I, principal constituinte proteico da HDL, com o transportador A1 contendo cassete de ligação ao ATP (ABCA1), produzindo uma partícula discoide denominada pré- β HDL. Após esterificação do colesterol pela LCAT, essa partícula torna-se uma HDL esférica que pode ser ainda mais lipidada. Por sua vez, HDL maduras aceitam colesterol por intermédio do transportador G1 contendo cassete de ligação ao ATP (ABCG1) (Demina et al., 2016). Tais transportadores utilizam-se da energia liberada pela hidrólise de moléculas de ATP, para mobilizar colesterol entre os folhetos da membrana plasmática disponibilizando-o aos aceptores extracelulares.

Devido à maior concentração de colesterol no meio intracelular e em domínios específicos da membrana plasmática, parte do colesterol livre difunde-se diretamente da membrana para as partículas de HDL em um processo facilitado pelo receptor *scavenger* classe B tipo I (SR-BI) (Adorni et al., 2007).

Embora cada uma dessas vias contribua para remoção do colesterol de macrófagos, *in vitro* o ABCA1 representa sua principal via de exportação (Adorni et al., 2007). *In vivo*, o papel do ABCA1 no transporte reverso de colesterol é evidenciado na doença de Tangier, no qual o gene *ABCA1* é mutado, resultando em baixa concentração de HDL, além de acúmulo de colesterol em macrófagos e aterosclerose prematura (Rust et al., 1999). Do mesmo modo, a deleção do *Abca1* em células mieloides de camundongos alimentados com dieta aterogênica, resulta no aumento de placas avançadas, e intensa elevação do conteúdo de colesterol de macrófagos peritoneais (Bi et al., 2014).

Semelhantemente, a perda de função do ABCG1 em camundongos resulta em acúmulo de lípidos em macrófagos (Kennedy et al., 2005). Apesar de nenhum distúrbio genético ter sido encontrado até o momento envolvendo defeito no ABCG1 em humanos (Demina et al., 2016), Mauldin et al. (2008) reportaram que a diminuição de sua expressão e funcionalidade podem estar associados ao maior desenvolvimento da aterosclerose em diabéticos do tipo 2.

O ABCG1 foi descrito como um transportador de óxidos de colesterol. Chen et al. (2015) demonstraram que ao contrário da apoA-I, a HDL foi um eficiente aceptor de óxidos de colesterol. Terasaka et al. (2007) demonstraram que a HDL exerce um efeito protetor sobre a apoptose induzida por 7-CETO em macrófagos que expressam ABCG1, mas não naqueles com deficiência nessa proteína, provavelmente devido a maior efluxo de 7-CETO da célula. Em contraste, o transportador ABCA1 não estimulou o efluxo de 7-CETO. Corroborando esses achados, Engel et al. (2014) observaram acúmulo de vários óxidos de colesterol no pulmão de camundongos *knockout* para ABCG1.

Embora a maior parte dos estudos demonstrem que os derivados oxigenados do colesterol são retirados das células especificamente pelo transportador ABCG1, Tam et al. (2006) em fibroblastos e Matsuda et al. (2013) em neuroblastomas, observaram a capacidade do ABCA1 no efluxo dessas moléculas.

O acréscimo de um radical polar confere aos óxidos de colesterol maior solubilidade no meio aquoso e a capacidade de atravessar membranas lipofílicas a taxas mais elevadas que o colesterol, fazendo com que sua velocidade de efluxo na presença de HDL seja muitas vezes mais rápida, permitindo assim que células possam eliminar grandes quantidades de óxidos de colesterol através de livre difusão (Meaney et al., 2002; Morel et al., 1996).

Lange et al. (1995) demonstraram que a transferência de 25-OH C da hemácia para aceptores do plasma ocorre 2.000 vezes mais rápida que a do colesterol. Da mesma forma, a taxa de troca espontânea entre vesículas de fosfolípidos foi mais eficiente para os óxidos de colesterol oxidados no carbono 7, quando comparados ao colesterol (Kan et al., 1992).

Esse sistema é especialmente importante no cérebro, onde o 24-OH C representa a principal forma de eliminação de colesterol, em humanos e ratos, devido sua habilidade de atravessar a barreira hematoencefálica (Björkhem et al. 1998; Meaney et al. 2000).

Björkhem et al. (1994) ao observarem que macrófagos humanos podem eliminar grandes quantidades de colesterol na forma de 27-OH C, sugeriram que a formação desse esterol é uma rota adicional de retirada colesterol.

Respalhando essa hipótese, pacientes com a rara doença cerebrotendinoxantomatose (CTX), caracterizada por mutação no gene e ausência de atividade da 27 α -hidroxilase, reduzem a síntese do ácido biliar quenodeoxicólico e acumulam colestanol e colesterol em vários tecidos, incluído o cerebral (Bhattacharyya et al., 2007). Apesar de concentração circulante de colesterol total (CT) dentro de valores de referência, há o desenvolvimento prematuro de aterosclerose, o que é atribuído à eliminação deficiente de 27-OH C pelos macrófagos.

Alguns autores sugerem que o aumento na produção de 27-OH C poderia acontecer em resposta a situações de deficiência no transporte reverso de colesterol pelas HDL (Nunes et al., 2014).

Em camundongos e humanos com deficiências em proteínas e enzimas que participam do metabolismo das HDL (ABCA1, apoA-I e LCAT, CETP) e que condicionam redução no HDL-c, observa-se maior concentração plasmática de 27-OH C quando corrigida pela colesterolemia (27-OH C / CT) (Karuna et al., 2011). Igualmente, indivíduos com hipoalfalipoproteinemia (concentração reduzida de HDL no plasma), evidencia-se maior concentração circulante de 27-OH C (Nunes et al., 2014). Independentemente da origem metabólica ou genética, a variação no HDL-c parece explicar cerca de 40% na variação do 27-OH C ligado à HDL (Karuna et al., 2011).

O receptor hepático X (LXR) é reconhecido como um regulador chave na manutenção de colesterol. Sua ativação resulta no aumento da expressão de proteínas relacionadas ao efluxo de colesterol, como: ABCA1, ABCG1, ABCG5 (Transportador G5 contendo cassete de ligação ao ATP), ABCG8 (Transportador G8 contendo cassete de ligação ao ATP), CYP7A1 e apoE (apolipoproteína E), levando a maior eficiência na retirada de lípidos. O que é demonstrado em vários modelos animais, nos quais a ativação farmacológica de LXR resulta em dramática atenuação do desenvolvimento da aterosclerose (Honzumi et al., 2012).

Estudos *in vitro* classicamente demonstram que os óxidos de colesterol, em especial aqueles oxidados na cadeia lateral, são importantes ligantes de LXR (Janowski et al., 1996). Por outro lado, existe uma ampla discussão sobre a importância desses metabólitos como ativadores de LXR *in vivo*, uma vez que suas concentrações são extremamente baixas.

Shafaati et al. (2011) observaram limitada alteração na expressão de genes relacionados ao LXR, apesar de forte aumento do 24-OH C em camundongos que superexpressavam a enzima CYP46A1. Do mesmo modo, a maior produção de 27-OH C, dada a maior expressão da enzima CYP27A1 ou deficiência na CYP7B1 (Citocromo P450, família 7, subfamília B, polipeptídeo 1) (enzimas responsáveis pela sua metabolização), teve pouco efeito na homeostase do colesterol corporal e hepático, e na expressão de genes alvos de LXR (Meir et al., 2002; Li-Hawkins et al., 2000; Heverin et al., 2016). Por outro lado, Chen et al. (2007) observaram redução na expressão do mRNA de

proteínas reguladas por LXR em resposta à dieta hipercolesterolêmica, em camundongos com tripla deficiência de CYP46A1, CYP27A1 e CH25H.

Apesar de os efeitos benéficos sobre o efluxo de colesterol, partículas de HDL enriquecidas em óxidos de colesterol apresentam menor capacidade de remover colesterol celular (Gesquière et al., 1997). Gaus et al. (2001) observaram que o acúmulo de 7-CETO desestabiliza os domínios da membrana plasmática prejudicando o efluxo de colesterol para apoA-I.

Korytowski et al. (2015) evidenciaram redução no conteúdo dos transportadores ABCA1 e ABCG1 de macrófagos expostos ao 7-hidroperoxicolesterol, o que foi acompanhado pelo prejuízo no efluxo de colesterol.

O fato de os óxidos de colesterol modularem diversos mecanismos ligados à homeostase do colesterol e por estarem presentes na lesão aterosclerótica em altas quantidades, coloca esses metabólitos em evidência como moduladores do início e progressão da doença macrovascular aterosclerótica.

1.3 Exercício físico e aterosclerose

A prática regular de exercícios físicos é uma ferramenta não farmacológica que contribui para a prevenção e o tratamento das doenças crônicas degenerativas. Em especial, no processo aterosclerótico, estudos em modelos animais e em humanos evidenciam que o treinamento físico previne e regrida a lesão aterosclerótica independentemente de alterações na colesterolemia (Napoli et al., 2006; Shimada et al., 2007; Ramachandran et al., 2005; Kurose et al., 2015). Além disso, o exercício físico regular melhora a estabilidade da placa, aumentando a espessura da capa fibrosa e sua composição de colágeno e elastina (Kadoglou et al., 2013; Kadoglou et al., 2011).

As ações antiaterogênicas do exercício físico são, em grande parte, devido aos seus efeitos sobre fatores de risco para a doença macrovascular, como: redução da pressão arterial, auxílio na redução da massa corporal, aumento da sensibilidade periférica à insulina e melhora no metabolismo lipídico.

Especificamente no metabolismo lipídico, o exercício físico aeróbico tem um modesto impacto sobre o colesterol total e LDL-c plasmáticos, sendo que somente 15% e 21% dos estudos, respectivamente, demonstram uma redução significativa dessas variáveis após treinamento físico (Kelley e Kelley, 2006). É possível que a atenuação do colesterol total e LDL-c observadas em alguns estudos seja secundária a perda de peso (Parto et al., 2015).

O efeito mais aparente do exercício físico é a redução da trigliceridemia, o que ocorre devido à melhora da metabolização da VLDL e redução da secreção dessa lipoproteína pelo fígado (Al-Shayji et al., 2012; Tsekouras et al., 2008).

Classicamente, a hidrólise mais eficiente das lipoproteínas ricas em TG (quilomícrons e VLDL) após uma sessão de exercício, é atribuída ao aumento na massa e atividade da enzima lipoproteína lipase. Mais recentemente, Ghafouri et al. (2015) demonstraram que o treinamento físico, também, melhora a afinidade das VLDL à essa enzima. Em última instância, a melhor deslipidação, leva a VLDL menores e mais densas, eventualmente formando grandes LDL (Kraus et al., 2002). Sua redução de tamanho possibilita o desprendimento de componentes de superfície, como colesterol livre, fosfolípidos e apolipoproteínas, para formação de HDL nascentes, aumentando o HDL-c (Sarzynski et al., 2015).

Um segundo mecanismo pelo qual o exercício melhora a composição das lipoproteínas é a redução da atividade da lipase hepática (Bergeron et al., 2001). Essa enzima catalisa a hidrólise de triglicérides e fosfolípidos das lipoproteínas, produzindo LDL e HDL menores, além de agir sinergicamente com o receptor SR-BI na captação de HDL pelo fígado (Tani et al., 2016; Fan et al., 1994). Sendo assim, a diminuição da sua atuação favorece tanto o aumento

do HDL-c quanto do tamanho das partículas (Sarzynski et al., 2015). Corroborando esta afirmação, Sarzynski et al. (2015) em uma metanálise de 6 estudos, contendo 1.555 indivíduos, sobre o efeito do exercício no perfil das subclasses de lipoproteínas, encontraram que o treinamento aumentou a concentração de grandes HDL e LDL, e reduziu a quantidade de grandes VLDL e LDL pequenas e densas, independentemente do IMC.

É digno de nota, que mudanças no tamanho e composição das lipoproteínas afetam sua funcionalidade e são correlacionados com doenças cardiovasculares (Mutharasan et al., 2017). LDL menores possuem maior potencial aterogênico, pois penetram facilmente na íntima arterial, são mais suscetíveis à oxidação e captadas mais rapidamente por macrófagos (Michel et al., 2015; de Graaf et al., 1991).

Como esclarecido anteriormente, importante função antiaterogênica da HDL é a realização do transporte reverso de colesterol. Rocco et al. (2011) utilizando camundongos transgênicos para CETP humana, um modelo animal que se assemelha ao transporte reverso de colesterol em humanos, evidenciou que o treinamento físico por 6 semanas, aumentou a eficiência do transporte reverso de colesterol *in vivo*, demonstrado pela maior recuperação de colesterol radioativo, advindo de macrófagos, no plasma, fígado e fezes. Por outro lado, macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos selvagens exercitados não demonstraram maior eficiência na retirada de colesterol. Além disso, não se evidenciaram alterações na expressão de genes envolvidos no fluxo de lípidos, após programa de exercício aeróbio (Pinto et al., 2015). Nesses dois modelos, o aumento no transporte reverso de colesterol pelo exercício regular foi atribuído a moduladores sistêmicos, como o aumento do HDL-c e maior expressão de receptores hepáticos para as lipoproteínas, como SR-BI e B-E. Corroborando o pensamento de que o exercício físico é um modulador positivo do transporte reverso de colesterol, outros autores ainda demonstram aumento da expressão gênica de *Abca1*, *Abcg1* e *Nr1h3* (LXR α) em diferentes tecidos (Butcher et al., 2008; Ghorbanian et al., 2013; Khabazian et al., 2009; Rocco et al., 2011; Kazeminasab et al., 2013).

Devido ao maior consumo de oxigênio, é observado aumento do estresse oxidativo, oxidação da LDL e da peroxidação lipídica logo após uma sessão de exercício físico, o qual é normalizado após algumas horas (Arquer et al., 2010). Uma vez que o colesterol é altamente sensível ao ataque das ERO para formação dos produtos de oxidação do colesterol, Cardenia et al. (2017) demonstraram, no fígado de ratos, elevação dessas moléculas em resposta a sessão de exercício até a exaustão.

Em contrapartida, o treinamento aeróbio crônico induz o incremento de defesas antioxidantes, no plasma e outros tecidos, reduzindo a formação de LDLox (Elosua et al., 2003). Na aorta, Meilhac et al. (2001) observaram em camundongos *knockout* para o receptor de LDL, alimentados com dieta aterogênica, que o treinamento aeróbio aumentou as enzimas antioxidantes óxido nítrico sintase (eNOS) e catalase, o que foi acompanhado de redução da progressão da lesão aterosclerótica em 40% (Meilhac et al., 2001).

Apesar de pouco se conhecer sobre relação dos óxidos de colesterol e exercício físico, parece que o exercício físico pode modular a formação desses produtos e influenciar no desenvolvimento da aterosclerose.

1.4 Exercício físico e proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK)

A AMPK é uma serina/treonina cinase considerada reguladora primária do metabolismo energético celular. Embora existam outros mecanismos, a fosforilação e ativação da AMPK são particularmente sensíveis às concentrações de monofosfato de adenosina (AMP), refletindo o *status* energético celular. Essa proteína é formada por um complexo heterotrimérico composto por uma subunidade catalítica α , na qual se localiza o sítio de fosforilação e ativação (treonina 174 na $\alpha 1$ e 172 na $\alpha 2$), e duas subunidades regulatórias: β , necessária para a montagem do complexo heterotrimérico e

que possui um sítio de ligação ao glicogênio, nesse caso diminuindo a atividade da AMPK (McBride et al., 2009); e γ , composta por 4 domínios cistationina β -sintetase (CBS), também denominados domínios Bateman, que se ligam a moléculas contendo adenosina aos pares (Chen et al., 2012).

O AMP ao se ligar no domínio CBS induz a mudanças conformacionais na molécula da AMPK, tornando-a mais sensível a fosforilação por cinases ascendentes (*upstream*), em especial a LKB1 (cinase hepática *B1*), e protegendo-a contra desfosforilação (Sanders et al., 2007). Apesar de não promover ativação alostérica da AMPK, o ADP (difosfato de adenosina) influencia a atividade dessa enzima por inibir a ação de fosfatases. Por outro lado, a ligação com o ATP (trifosfato de adenosina) antagoniza os efeitos de ativação e/ou proteção do AMP e ADP (Xiao et al., 2011).

Uma vez ativa a AMPK atenua vias anabólicas, como a síntese de macromoléculas: proteína, ácidos graxos, colesterol e glicogênio, e estimula captação e oxidação dos substratos energéticos e biogênese mitocondrial, com objetivo de restaurar o balanço energético celular (Shirwany et al., 2014). Em particular ao colesterol, um dos focos dessa pesquisa, a fosforilação em serina 872 da HMGCoA redutase pela AMPK, bloqueia sua atividade catalítica e, portanto, a síntese de colesterol (Shirwany et al., 2014). É importante salientar que os efeitos celular e tecidual/local da ativação da AMPK dialogam com alterações sistêmicas, demonstrando a importância dessa proteína no metabolismo corporal, sendo um possível alvo terapêutico nas doenças metabólicas.

Setes genes codificam as subunidades da AMPK e suas isoformas: PRKAA1, PRKAA2, PRKAB1, PRKAB2, PRKAG1 e PRKAG2, que produzem as proteínas, respectivamente, AMPK α 1, α 2, β 1, β 2, γ 1, γ 2 e γ 3. Variações na expressão das subunidades são encontradas entre os tecidos. Enquanto β 1, γ 1 e γ 2 são ubiquamente expressos, a porção α 2 é localizada predominantemente no fígado, coração e músculo esquelético, este também é o principal local de produção das isoformas β 2 e γ 3 (Stapleton et al., 1996; Cheung et al., 2000).

Pelo menos, teoricamente, 12 combinações diferentes da AMPK poderiam ser formadas. Embora complexos específicos sejam preferencialmente formados em diferentes locais, como cada um é gerado e sua real função permanece desconhecida. Além disso, a composição dos complexos da AMPK não é estática e pode ser alterada por mudanças no ambiente celular (Dasgupta et al., 2016).

No músculo esquelético a AMPK é classicamente ativada em resposta ao exercício físico. A elevação da demanda energética durante exercício, embora mantenha as concentrações de ATP relativamente estáveis, causa importante aumento dos valores de AMP e ADP, potencializando a ativação da AMPK (Stephens et al., 2002; Chen et al., 2003).

Nesse tecido, ativação da AMPK pelo exercício agudo é dependente da sua intensidade e volume. (Ahtiainen et al., 2015; Sriwijitkamol et al., 2007; Wojtaszewski et al., 2002). A AMPK α 2 é a principal isoforma ativada pelo exercício físico aeróbio no músculo esquelético. Diferentes autores têm citado que atividades em torno de 60% do VO_2 pico são requeridas para aumentar sua atividade (Chen et al., 2002; Stephens et al., 2002; Chen et al. 2003). Contudo, uma vez que o volume é outra variável a ser considerada, Wojtaszewski et al. (2002) demonstraram que mesmo exercício a 45% do VO_2 pico, quando realizado até a exaustão também eleva sua fosforilação e atividade. Por outro lado, apenas atividades de alta intensidade parecem produzir aumento da atividade da AMPK α 1 (Chen et al., 2003).

Em relação ao tipo de exercício, Ogasawara et al. (2014), Ahtiainen et al. (2015) e Kido et al. (2016), observaram elevações semelhantes na atividade da AMPK em resposta ao exercício de força quando comparada ao exercício aeróbio.

Aliado ao aumento da fosforilação e ativação, o exercício modula a expressão do mRNA e proteína da AMPK, e todos esses efeitos são observados também em resposta ao treinamento crônico (Takekoshi et al., 2006). Além disso, apesar da maior parte do nosso conhecimento relacionado à AMPK e exercício advir de investigações do músculo esquelético, tem sido

demonstrado que a AMPK de outros tecidos também respondem ao treinamento. De fato, Takekoshi et al. (2006) verificaram em ratos Wistar, que o treinamento aeróbio por 12 semanas foi capaz de aumentar a atividade basal da AMPK, bem como a expressão do mRNA e proteína das subunidades catalíticas alfa1 e alfa2 no tecido adiposo visceral e fígado. Correspondendo a maior atividade da AMPK, existiu um significativo aumento da fosforilação/inibição da acetil-CoA carboxilase, enzima responsável pela síntese de malonil-CoA e diminuição da oxidação de ácidos graxos.

Recentemente, Chen X et al. (2016) estudando a aorta abdominal de camundongos selvagens e *knockout* para AMPK α 2, observaram que, no primeiro, o treinamento crônico levou à ativação da AMPK α 2, que por sua vez favoreceu o aumento da expressão e ativação da eNOS, do conteúdo mitocondrial e da capacidade antioxidante mitocondrial. Estes eventos culminaram na melhor função vascular, analisada pela melhora da vasodilatação arterial em resposta à acetilcolina. Por outro lado, todos esses efeitos foram perdidos nos camundongos *knockout* para AMPK α 2, demonstrando um papel preponderante dessa proteína na melhora da função vascular promovida pelo exercício. Cacicedo et al. (2011), Kröller-Schön et al. (2011) e Barbosa et al. (2012), encontraram resultados semelhantes em diferentes modelos experimentais e protocolos de exercício aeróbio.

Tem sido hipotetizado que o aumento da tensão de cisalhamento (*shear-stress*) na artéria, devido ao aumento do fluxo sanguíneo, e a elevação da produção de ERO, são fatores que contribuem para maior fosforilação dessa cinase na aorta, em resposta ao exercício físico (Kim et al., 2014).

A ativação da AMPK no leito vascular estimula processos antiaterogênicos. A infusão de AICAR (5-aminoimidazol-4-carboxiamida-imidazol ribonucleotídeo) reduziu o acúmulo de colesterol e 7-CETO em células endoteliais da aorta de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica o que foi acompanhado de maior conteúdo de ABCG1 (Li et al., 2010a). Ainda, em outro estudo, Li et al. (2010b) demonstraram *in vitro* que a ativação farmacológica da AMPK, aumentou o conteúdo de ABCG1 em macrófagos, favorecendo o efluxo de colesterol. Chen B et al. (2016) observaram que a

ativação da AMPK atenuou a captação de LDLox em macrófagos via redução do conteúdo de LOX-1, o que se refletiu, *in vivo*, pela atenuação da aterosclerose em camundongos.

Contudo, até o momento nenhum estudo tem relacionado a ação do exercício sobre a AMPK na artéria e seus efeitos antiaterogênicos, em particular, vinculados à modulação do conteúdo total e das subespécies de óxidos de colesterol.

2. OBJETIVOS

1) Avaliar o efeito do treinamento físico aeróbio em camundongos dislipidêmicos sobre: 1) o infiltrado arterial de colesterol e a concentração de óxidos de colesterol no arco aórtico e no plasma; 2) a expressão gênica da AMPK e de proteínas envolvidas na metabolização de óxidos de colesterol na parede arterial.

2) Avaliar o efeito, *in vitro*, da ativação da AMPK em macrófagos sobre a concentração de óxidos de colesterol, e na expressão de genes envolvidos na metabolização de óxidos de colesterol.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (CAPPesq - nº 074/14), realizados de acordo com *US National Institutes of Health Guidelines, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (Institute of Laboratory Animal Research, 1996) e com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL).

3.1 Modelo animal

Foram utilizados camundongos *knockout* para apoE (apoE^{-/-}), machos com 16 semanas de idade. As matrizes dos animais *knockout* para apoE foram adquiridas comercialmente do *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, Maine, EUA). Os animais foram mantidos em biotério convencional (até 6 animais por gaiola), com ciclo de luminosidade de 12 h claro/12 h escuro, a temperatura de 22 ± 2 °C, recebendo água filtrada e ração padrão *ad libitum*.

A utilização de animais em pesquisa é um valioso modelo para compreensão dos mecanismos fisiológicos e patofisiológicos humanos. Os principais modelos animais no estudo da aterosclerose são os camundongos C57BL/6 com inativação do gene que codifica para apoE ou para o receptor de LDL (LDLr^{-/-}).

A apoE é uma proteína de superfície presente em quase todas as lipoproteínas, e que interage com alta afinidade com receptor de LDL mediando a captação de QM, VLDL e seus remanescentes, especialmente pelo fígado (Kolovou et al., 2008). Devido à grande participação tanto da apoE quanto do LDLr na depuração plasmática das lipoproteínas ricas em triglicérides, a inativação dessas proteínas produz severa hipercolesterolemia, favorecendo assim, o desenvolvimento da aterosclerose. Ainda, devido a diversas funções

antiaterogênicas da apoE no organismo, como por exemplo: a participação no efluxo de colesterol e atividade antioxidante, sua ablação gênica propicia o avanço da placa por mecanismos além da hipercolesterolemia (Mabile et al., 2003; Langer et al., 2000).

A principal vantagem dos camundongos apoE^{-/-}, em relação aos camundongos LDLr^{-/-}, é o desenvolvimento de intensa aterosclerose espontânea independente da administração de dieta hiperlipídica, que poderia ser um fator de confusão para interpretação dos resultados do estudo. Neste modelo experimental a evolução da lesão aterosclerótica é similar àquelas encontradas em humanos. Segundo Nakashima et al. (1994) em dieta padrão, as estrias gordurosas começam a aparecer após, aproximadamente, 10 semanas. Na 15ª semana já é possível detectar lesões intermediárias com células espumosas e células musculares lisas, e placas fibrosas com núcleo necrótico aparecem após 20 semanas.

Com o avançar do ateroma, eleva-se também as concentrações dos óxidos de colesterol (Brown e Jessup et al., 1999; Vaya et al., 2001; Garcia-Cruset et al., 2001).

3.2 Desenho experimental

Os animais foram divididos em 2 grupos experimentais: treinado (T) e sedentário (S). Ao completarem 16 semanas de idade os animais foram separados aleatoriamente em grupos treinado e sedentário. Antes e depois do treinamento físico foram avaliados a massa corporal, colesterol total, HDL-c, triglicérides e glicose plasmáticos e a capacidade máxima de exercício. Após 6 semanas de treinamento físico uma alíquota (cerca de 600 µL) de sangue foi coletada pela veia caudal para obtenção de plasma e, após eutanásia, o arco aórtico foi removido para análise dos óxidos de colesterol e mRNA (**figura 3**).

Figura 3 - Desenho experimental. Ao completarem 16 semanas de idade os animais foram separados aleatoriamente em grupos treinado e sedentário. Antes e depois do treinamento físico foram avaliados a massa corporal e colesterol total (CT), colesterol presente na partícula de HDL (HDL-c), triglicérides (TG) e glicose plasmáticos e a capacidade de esforço máximo. Após 6 semanas de treinamento físico uma alíquotas de sangue (cerca de 600 μ L) foram coletadas para obtenção de plasma e, após eutanásia, o arco aórtico foi removido para análise dos óxidos de colesterol e mRNA de genes envolvidos na homeostase de colesterol e óxidos de colesterol celular.

3.3 Consumo de ração

O controle do consumo de ração foi avaliado semanalmente pela diferença de peso (g) entre a ração oferecida e a ração remanescente ao término de cada semana. O consumo de ração médio foi obtido após correção do consumo semanal pelo número de animais por caixa e pelos dias de alimentação.

3.4 Protocolo de treinamento físico

O treinamento foi precedido por 3 sessões de adaptação (10 min, a 15/min), realizadas tanto pelos camundongos treinados quanto pelos sedentários. Foram incluídos no estudo apenas os animais corredores. A exclusão pela incapacidade de correr na esteira foi de 10,2%.

Os animais treinados realizaram treinamento físico aeróbio em esteira rolante própria para camundongos, a uma velocidade de 15 m/min, durante 60 min, 5 vezes por semana, durante 6 semanas, sendo a primeira semana de aclimação e 5 semanas de treinamento.

A semana de aclimação foi realizada em velocidade de 12 m/min. A 1ª e a 2ª sessões de exercício físico tiveram 30 min de duração, e a cada dia de treinamento eram acrescentados 10 min, até atingir 60 min.

As sessões foram realizadas sempre no período da tarde, sob a supervisão do mesmo pesquisador e as coletas de sangue para análises bioquímicas e coleta de tecidos foram realizadas após 24 h da última sessão de treinamento.

Este protocolo de treinamento é uma versão modificada do utilizado por Kadoglou et al. (2013) e foi escolhido por sua eficiência na redução da área de lesão aterosclerótica avançada e por aumentar a estabilidade da placa. (Kadoglou et al., 2013).

Alguns artigos sugerem a utilização da máxima velocidade alcançada no teste incremental como base para determinar o protocolo de treinamento em animais (Ferreira et al., 2007; Teixeira et al., 2012). Nesses artigos, aproximadamente, 60% da velocidade máxima representou a máxima fase estável do lactato, uma variável frequentemente utilizada para prescrição de exercício de intensidade moderada. No presente estudo a velocidade de treinamento representou entre 75 - 58%, da máxima velocidade alcançada no teste de esforço máximo.

3.5 Teste de esforço máximo

A capacidade máxima de exercício físico foi avaliada por meio de teste progressivo em esteira rolante até a exaustão (Ferreira et al., 2007).

O animal iniciou o teste a uma velocidade de 8 m/min, sem inclinação na esteira. A cada três min a velocidade foi incrementada em três m/min até a exaustão do animal, que foi avaliada pela não capacidade em manter o padrão de corrida. O tempo para exaustão e a variação no tempo para exaustão (tempo total para exaustão na condição basal – tempo para exaustão após as 6 semanas de treinamento) foram as variáveis utilizadas para confirmar a eficácia do treinamento físico.

3.6 Dosagens bioquímicas

Aproximadamente 200 µL de sangue foram coletados da veia caudal dos animais e depositados em tubos heparinizados, antes e no final da sexta semana do protocolo de treinamento, sempre após, aproximadamente, 12 h de privação alimentar. Para isso, o corpo dos animais, excetuando-se a cauda, foi envolvido em toalha, com dimensão apropriada, objetivando-se um procedimento adequado de imobilização e coleta (Conybeare et al., 1988). A determinação do colesterol total, triglicérides e HDL-c no plasma foi realizada por meio de *kits* enzimáticos colorimétricos (Labtest do Brasil). A glicose

plasmática foi medida por meio de glicosímetro comercial (Accu-Chek Performa).

3.7 Coleta de sangue para dosagem dos óxidos de colesterol

A coleta de sangue para dosagem dos óxidos de colesterol foi realizada com os camundongos em jejum, de aproximadamente 12 h, e imediatamente antes da eutanásia. O máximo de sangue possível foi coletado através da veia caudal (cerca de 600 μ L) em tubos heparinizados. Ao plasma foram acrescentados 2,5 μ L de hidroxitolueno butilado (BHT; Sigma-Aldrich, *St. Louis*, EUA) para inibir a oxidação do colesterol, sendo, posteriormente, mantidos congelados a -80 °C.

3.8 Coleta de tecidos

Após eutanásia em câmara de CO₂, com enchimento gradual (taxa de deslocamento de 10% a 30% da câmara vol/min), os animais foram submetidos à toracolaparotomia crânio-caudal, objetivando-se a extração do coração e do arco aórtico. Com auxílio de um estereoscópio, as aortas foram dissecadas e perfundidas com solução gelada de cloreto de sódio 0,9%.

Em seguida, foi realizada a resseção total do músculo sóleo de ambos os membros posteriores. Tanto a aorta quanto o sóleo foram armazenados a -80°C.

3.9 Extração de lípides do arco aórtico

O conteúdo lipídico do arco aórtico foi extraído por 6 mL de clorofórmio/metanol (2:1, v:v) e 2 mL de água e centrifugado a 1800 rpm a 4°C por 5 min. Em seguida, a aorta foi mantida em NaOH 1 N, por um dia, para

digestão do tecido e realização da medida da concentração de proteína pelo método de Lowry et al. (1951).

3.10 Concentração de óxidos de colesterol em macrófagos tratados com AICAR

Macrófagos da linhagem J774 foram incubados com RPMI (meio Roswell Park Memorial Institute) contendo soro fetal bovino 10%, em estufa com atmosfera de CO₂ 5%, a 37°C. Após remoção das células não aderidas, os macrófagos foram incubados com DMEM (Meio Eagle modificado por Dulbecco; *Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA*) contendo 0,1% de albumina isenta em ácidos graxos e sobrecarregados com 75 µg/mL de LDL acetilada (LDL-ac), durante 48 h. A LDL utilizada no experimento foi isolada de plasma humano e acetilada *in vitro* seguindo o protocolo de Basu et al. (1976).

Após lavagem com solução isotônica (Tampão fosfato-salina, PBS) contendo 1 mg/mL de albumina isenta de ácidos graxos, as células foram mantidas por 24 h com DMEM acrescido, ou não, de 0,25mM de AICAR (Sigma-Aldrich, *St. Louis, EUA*) para ativação da AMPK. A concentração de AICAR utilizada representou a máxima dose entregue sem elevação da morte celular, avaliado pela presença da enzima lactato desidrogenase no meio de cultura.

Após lavagem, as células foram incubadas com HDL₂ (50 µg/mL), ou não, por 6 h, para estímulo do efluxo de colesterol (**figura 4**). A HDL₂ utilizada era composta por: 7α-OH C, 48,6 (ng/mg de proteína); 7β-OH C, 111,4 (ng/mg de proteína); 7-CETO, 12,6 (ng/mg de proteína); colesterol total 229,7 (µg/mg de proteína).

Os lípides celulares foram extraídos com solução de hexana:isopropanol (3:2; v:v). A massa dos óxidos de colesterol foi determinada por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa.

Após a extração lipídica as células aderidas na placa de cultura foram incubadas com 5 mL de NaOH 0,2 N, durante 3 h, a temperatura ambiente, para lise celular e medida da concentração de proteína pelo método de Lowry et al. (1951).

Figura 4 - Protocolo de avaliação da concentração de óxidos de colesterol em macrófagos tratados com AICAR. Macrófagos J774 foram tratados com 75 µg /mL de LDL-ac por 48 h. Após, as células foram mantidas 24 h em meio suplementado, ou não, com 0,25 mM de AICAR (Sigma-Aldrich) para ativação da AMPK. Em seguida o efluxo de esteróis foi estimulado, ou não, por 6 h por 50 µg/mL de HDL₂. Por fim, foram dosadas as concentrações de colesterol e óxidos de colesterol, por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, e o mRNA de proteínas relacionadas com a homeostase de colesterol.

3.11 Obtenção de lipoproteínas do plasma humano

As LDL e HDL₂ foram isoladas do plasma humano para a realização do ensaio de avaliação da concentração de óxidos de colesterol em macrófagos. Para isso, sangue de doadores voluntários normolipidêmicos foi coletado, após

jejum de 12 h, em tubos contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) (1 mg/mL) e, imediatamente, centrifugado a 3000 rpm a 4°C 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 (10 µL/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, LDL e HDL foram isoladas do plasma por ultracentrifugação sequencial utilizando-se rotor 50 Ti, ultracentrífuga Beckman modelo L-80 (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, EUA), segundo Havel et al. (1955).

As VLDL foram retiradas após ultracentrifugação de 12 h. Então, a densidade do plasma foi ajustada para as respectivas frações das lipoproteínas com KBr sólido, sendo ultracentrifugado a 40.000 g a 4°C: LDL ($d < 1,063$ g/mL) (20 h) e HDL ($d = 1,063-1,21$ g/mL) (40 h).

As lipoproteínas isoladas foram dialisadas contra tampão fosfato (NaCl 0,9%, Na₂HPO₄ 0,3%, NaH₂PO₄ 0,2%, NaOH 0,38% e EDTA 0,01%), pH 7,4, por 24 h. Seu conteúdo em colesterol total e triglicérides foi avaliado por meio de *kits* enzimáticos colorimétricos e a concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951).

3.12 Análise dos óxidos de colesterol por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

A massa dos óxidos de colesterol foi determinada em cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massa (GC-MS) (Shimadzu GCMS-QP2010) utilizando a versão 2.5 do software *GCMS solution*. Foram utilizados isótopos deuterados como padrão interno, o que torna o método mais sensível e específico, pois corrige as perdas que podem ocorrer no processo de dosagem, de acordo com o método de Dzeletovic et al. (1995). Amostras de plasma (0,5 mL) ou extratos lipídicos obtidos das artérias ou células foram misturados com

quantidades conhecidas dos padrões internos deuterados e antioxidante BHT (50 µg/mL).

Para a hidrólise dos ésteres de óxidos de colesterol, as amostras foram saponificadas, com 0,4M de KOH em etanol, por 2 h em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada purificação da amostra através de extração líquido-líquido, no qual foram adicionados 100 µL de ácido fosfórico, 20 mL de clorofórmio e 6 mL de água, seguindo-se centrifugação a 2000 rpm durante 15 min. A fase superior foi descartada e a fase orgânica evaporada e redissolvida em tolueno. Na última fase de purificação, os óxidos de colesterol foram separados do colesterol por meio de extração em fase sólida (coluna Supelclean™ LC-Si SPE Tube).

Os esteróis foram derivatizados com solução silanizante, composta por 100 µL de piridina e 100 µL de BSTFA (N, O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida) + 1% TMCS (trimetilclorosilano) (1:1, v/v) (Supelco 33155-U) e incubados por 1 h a 60°C.

Um microlitro da amostra derivatizada foi injetada no cromatógrafo pelo injetor automático em modo de injeção *splitless*.

A separação foi realizada na coluna capilar Restek (100% dimethyl polysiloxane - Rxi13323) 1ms, 30 m de comprimento, diâmetro interno 0,25 mm, por 30 min, usando hélio como fase móvel, com velocidade linear constante de 44.1 cm/s. O forno foi iniciado em 240°C com incremento de 5°C/min por 7 min até 290°C. O espectrômetro de massa operou em modo de elétron de impacto a uma voltagem de ionização de 70eV com a temperatura da fonte de íons e da interface a 300°C.

Os íons dos esteróis foram identificados e monitorados no espectrômetro de massa pelo método SIM (*Single Ion Monitoring* - monitoramento do íon selecionado). A quantificação pelo GC-MS/SIM foi feita pela comparação com as áreas dos picos e os espectros de massa da curva padrão de íons com correção pelos padrões internos deuterados (Avanti polar lipids, Alabama, EUA) (**figura 5**).

Os óxidos de colesterol e colesterol foram identificados com um limite de quantificação de 15 ng e 5 µg, respectivamente.

A precisão do procedimento de extração e quantificação dos óxidos de colesterol, foi avaliado pelo coeficiente de variação de 6 dosagens da mesma amostra de plasma, representando, aproximadamente 19% de variação.

3.13 Análise da expressão gênica relativa por transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

3.13.1 Preparação dos tecidos e extração de RNA

Macrófagos J774 ou artérias foram homogeneizados em 350 µL de tampão de lise (tampão RLT, Qiagen) acrescido de 1% de β-mercaptoetanol e armazenados em -80°C. Para extração e purificação do RNA, foi utilizado o conjunto *RNeasy Mini Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha).

Avaliações quantitativas e qualitativas do RNA foram realizadas no instrumento 2100 *Bioanalyzer* (*Agilent Technologies*, EUA) associado ao *kit* RNA 6000 nano (*Agilent Technologies*, EUA), por gel de eletroforese capilar sobre *chip*.

O número da integridade do RNA (RIN) é um algoritmo utilizado no sistema *Agilent 2100 Bioanalyzer*, para avaliação da degradação e qualidade do RNA. A escala do RIN varia de 1 a 10, no qual 1 é o mais degradado e 10 o mais íntegro, sendo esse valor determinado, entre outras variáveis, por meio da quantificação das bandas de RNA ribossomal 28S e 18S. Segundo Fleige e Pfaffl (2006), um RIN de 5 é necessário para uma eficiente reação de polimerase em cadeia.

No presente estudo um RIN maior ou igual a 7 para células, e 5 para artérias foi considerado suficiente para análise de expressão gênica.

Figura 5 - Cromatogramas demonstrativos dos óxidos de colesterol e seus padrões deuterados. 200 ng de óxidos de colesterol e seus padrões internos deuterados (Avanti polar lipids, Alabama, EUA) foram derivatizados com solução silanizante (100 μ L de piridina e 100 μ L de BSTFA) por 1 h a 60°C. Um microlitro da amostra foi injetada no cromatógrafo pelo injetor automático em modo de injeção *splitless*. Os íons dos esteróis foram identificados e monitorados no espectrômetro de massa pelo método SIM. Picos cromatográficos demonstrados pelo método TIC (cromatograma de íons totais).

3.13.2 Quantificação do conteúdo de mRNA

A quantificação do conteúdo de mRNA dos diferentes genes analisados (**tabela 1**) foi realizada por RT-qPCR, utilizando o sistema de amplificação *TaqMan Two Step RT-qPCR* (*Applied Biosystems*, Foster City, EUA).

Tabela 1 - Lista de genes utilizados no estudo

Gene	Identificação (<i>Applied Biosystem</i>)
<i>Abca1</i>	Mm00442646_m1
<i>Abcg1</i>	Mm00437390_m1
<i>Actb</i>	Mm00607939_s1
<i>Cat</i>	Mm01340247_m1
<i>Cd36</i>	Mm01135198_m1
<i>Ch25h</i>	Mm00515486_s1
<i>Cyp27a1</i>	Mm00470430_m1
<i>Cyp7a1</i>	Mm00484150_m1
<i>Cyp7b1</i>	Mm00484157_m1
<i>Nr1h2</i>	Mm00437265_g1
<i>Nr1h3</i>	Mm00443451_m1
<i>Olr</i>	Mm00454586_m1
<i>Prkaa1</i>	Mm00443451_m1
<i>Prkaa2</i>	Mm01264789_m1

A reação RT-qPCR foi precedida pela conversão de 100 ng de RNA em DNA complementar (cDNA) segundo instruções do conjunto comercial *High Capacity RNA-to-cDNA* (*Applied Biosystems*, EUA). O cDNA obtido foi armazenado, quando necessário, a -20 °C até a realização do RT-qPCR.

A segunda etapa consiste na análise de expressão gênica por amplificação do cDNA em tempo real. Para isso, *primers* (iniciadores da

replicação do DNA) específicos para cada gene, adquiridos no formato *TaqMan Gene Expression Assays* (Applied Biosystems, EUA), foram incubados com o cDNA da amostra e *Gene Expression Master Mix* (solução da Applied Biosystems contendo a Taq DNA polimerase e desoxirribonucleotídeos fosfatados). A reação de RT-qPCR foi realizada em 40 ciclos de ampliação do cDNA, no aparelho *StepOnePlus Real Time PCR System* (Applied Biosystems, EUA).

A quantificação relativa foi utilizada para avaliação da expressão gênica. Para isso, o Ct (Limiar do ciclo; do inglês: *Cycle threshold*; momento em que sinal de fluorescência emitida é significativamente maior que a fluorescência basal da reação e localizada na fase exponencial da mesma) do gene alvo é corrigido pelo Ct do gene de controle endógeno da amostra. Para o controle endógeno da reação foi utilizado a expressão da *Actb* (β -actina). *Actb* foi o gene de escolha como controle endógeno devido sua alta estabilidade nas amostras avaliadas quando comparada a outros 3 genes descritos na literatura (*Gapdh*, *Hprt1*, *Tbp*) o que foi demonstrado em estudos anteriores do nosso laboratório (Silva, 2016).

Os valores de expressão gênica foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, no qual $\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ do controle endógeno}$ e $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ do grupo com intervenção} - \Delta Ct \text{ do grupo sem intervenção}$, considerando-se a eficiência do ensaio (90 a 110%) (Livak e Schmitgen, 2001).

3.14 Análise estatística

Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP). O teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi realizado em todos os grupos para avaliação da dispersão da amostra. As comparações entre os grupos treinado e sedentário foram realizadas pelo teste-t de *Student* não pareado ou Mann Whitney considerando a dispersão da amostra.

Para análise do tempo para exaustão no teste de esforço máximo foi realizada a análise de variância pelo teste ANOVA de um fator com pós-teste de Newman–Keuls para comparação de todos os pares de colunas.

Utilizou-se o programa GraphPad Prisma Versão 5.0, e considerou-se significantes todas as situações nas quais o nível descritivo de significância foi inferior a 5%.

4. RESULTADOS

A massa corporal e as concentrações plasmáticas de CT, HDL-c, TG e glicose foram semelhantes entre os grupos sedentário e treinado, tanto no período basal, quanto após o treinamento físico (**tabela 2**).

Tabela 2 - Massa corporal e variáveis bioquímicas dos animais sedentários e treinados

		S (n = 32)	T (n = 29)
Massa corporal (g)	Basal	27,1 ± 2,9	26,7 ± 2,2
	Final	27,8 ± 3,3	27,6 ± 2,9
CT (mg/dL)	Basal	474 ± 100	453 ± 88
	Final	431 ± 126	438 ± 110
TG (mg/dL)	Basal	93 ± 26	97 ± 31
	Final	99 ± 22	103 ± 32
HDL-c (mg/dL)	Basal	20 ± 7	19 ± 5
	Final	18 ± 5	17 ± 6
Glicemia (mg/dL)	Basal	107 ± 14	110 ± 16
	Final	98 ± 12	102 ± 16

Resultados expressos como média ± DP, foram comparados por teste t de *Student* não pareado, Sedentário (S) vs treinado (T). CT = colesterol total; TG = triglicérides; HDL-c = colesterol da HDL.

O consumo diário de ração (g) foi maior nos camundongos treinados (4,5 ± 0,5; n = 11) em comparação aos sedentários (4,1 ± 0,6; n = 11; p < 0,05).

Ao final do protocolo experimental, o tempo para exaustão, determinado no teste de esforço máximo, foi maior nos animais treinados em comparação aos sedentários. Os camundongos treinados melhoraram

a tolerância ao exercício quando comparado ao período basal (**figura 6 A**).

A análise do teste de esforço máximo pela variação no tempo de exaustão (tempo total para exaustão na condição basal – tempo para exaustão após as 6 semanas de treinamento) evidenciou que o grupo treinado aumentou seu condicionamento físico quando comparado ao sedentário (**figura 6 B**).

Figura 6 - Tempo para exaustão (A) e variação do tempo para exaustão (B) no teste de esforço máximo dos grupos sedentário (S) e treinado (T), antes (basal) e após (final) o treinamento físico. O tempo para exaustão foi comparado por ANOVA de um fator, com pós-teste de Newman-Keuls. A variação do tempo para exaustão foi analisada por teste t de *Student* não pareado. Resultados expressos como média $\pm$ DP. Sedentário n = 32; Treinado n = 29. * p < 0,05; *** p < 0,001.

Os óxidos de colesterol foram determinados por CG-MS. Os óxidos de colesterol mais prevalentes no plasma foram o 7-CETO e o 7 β -OH C, representando 34%, e 29%, respectivamente, do total de óxidos circulantes. As concentrações plasmáticas de 7 α -OH C, 27-OH C e 25-OH C foram semelhantes, representando aproximadamente 18%, 12% e 7% respectivamente, do total de óxidos plasmáticos (**tabela 3**).

Tabela 3 - Concentração de óxidos de colesterol no plasma e no arco aórtico de camundongos treinados (T) e sedentários (S).

	Plasma (ng / mg colesterol)		Arco aórtico (ng / mg de proteína)	
	S (n = 8)	T (n = 8)	S (n = 5)	T (n = 4)
7α-OH C	47,7 $\pm$ 26,1	36,4 $\pm$ 14,9	43,3 $\pm$ 16,1	61,2 $\pm$ 16,6
7β-OH C	72,5 $\pm$ 36,9	57,8 $\pm$ 12,7	31,2 $\pm$ 4,4	53,0 $\pm$ 7,7*
7-KETO	79,3 $\pm$ 30,4	76,2 $\pm$ 27,0	116,0 $\pm$ 48,1	99,1 $\pm$ 15,4
25-OH C	14,6 $\pm$ 3,3	15,1 $\pm$ 2,1	ND	ND
27-OH C	30,6 $\pm$ 14,6	26,3 $\pm$ 9,1	ND	ND
TOTAL	246,2 $\pm$ 43,4	211,6 $\pm$ 18,1	190,5 $\pm$ 46,7	213,3 $\pm$ 42,7

Resultados expressos como média $\pm$ DP, foram comparados por teste t de *Student* não pareado. 7 α -OH C = 7 α -hidroxicolesterol; 7 β -OH C = 7 β -hidroxicolesterol; 7-CETO= 7-cetocolesterol; 25-OH C = 25-hidroxicolesterol; 27-OH C = 27-hidroxicolesterol; ND = Não detectado.

* p < 0,05.

No arco aórtico, a concentração de 7-CETO correspondeu a 54% do total de óxidos de colesterol, seguida pelo 7 α -OH C (26%). Neste compartimento, evidenciou-se maior concentração de 7 β -OH C nos camundongos treinados em comparação aos controles sedentários (**tabela 3**). Não houve alteração no conteúdo de 7-CETO entre os grupos.

Observou-se menor conteúdo de colesterol total no arco aórtico nos camundongos treinados em comparação ao grupo sedentário (**figura 7**).

Figura 7 - Concentração de colesterol total ($\mu\text{g} / \text{mg}$ de proteína) no arco aórtico de camundongos treinados e sedentários. Os resultados (média $\pm$ DP) foram comparados por teste t de *Student* não pareado. Sedentário (S) $n = 5$; Treinado (T) $n = 4$. * = $p < 0,05$

As expressões de *Prkaa1* (AMPK $\alpha 1$) e *Prkaa2* (AMPK $\alpha 2$), proteínas-chave no metabolismo energético celular, ativadas pelo exercício e relacionadas ao efluxo de esteróis; *Cyp27a1*, enzima responsável pela produção do 27-OH C; *Cd36*, receptor que medeia a captação de ácidos graxos e LDL modificadas; e *Catalase*, enzima antioxidante, foram maiores nos animais treinados em comparação aos sedentários (**figura 8**).

Por outro lado, os genes descritos a seguir foram negativamente regulados pelo treinamento físico: *Abcg1*, transportador de colesterol e óxidos de colesterol para partículas maduras de HDL; *Ch25h*, enzima responsável pela formação do 25-OH C; *Cyp7b1*, enzima responsável pela metabolização do 27-OH C; e *Olr1* (LOX-1), receptor envolvido na captação de LDLox (**figura 8**).

Nas condições descritas nos materiais e métodos para análise de RT-qPCR não foi possível a quantificação do gene *Cyp7a1* na aorta dos camundongos.

Figura 8 - Expressão de genes envolvidos no metabolismo de colesterol e óxidos de colesterol no arco aórtico em animais treinados e sedentários. A expressão gênica foi avaliada por RT-qPCR. O gene *Actb* (β -actina) foi escolhido como normalizador da reação. Os valores de expressão gênica foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, na qual $\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ do controle endógeno}$ e $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ do grupo sem intervenção} - \Delta Ct \text{ do grupo com intervenção}$. Os resultados (média $\pm$ DP) foram comparados pelo teste t de *Student* não pareado. Sedentário (S) n = 8; Treinado (T) n = 6.

Considerando-se o aumento da expressão da *Prkaa1* e *Prkaa2* pelo treinamento físico, avaliou-se o efeito da ativação da AMPK em macrófagos

J774 sobre a concentração de óxidos de colesterol e a expressão de genes relacionados à homeostase desses esteróis. Para tanto, macrófagos foram cultivados na presença de AICAR 0,25 mM (ativador de AMPK) por 24 h e, posteriormente, incubados na presença ou ausência de HDL, como acceptor exógeno de lípidos, por 6 h.

A incubação de macrófagos com AICAR, na ausência de HDL, não alterou a concentração de esteróis celulares em comparação às células controles mantidas apenas em meio de cultura (**tabela 4**).

Por outro lado, a ativação da AMPK em macrófagos incubados com HDL₂ reduziu a concentração intracelular de 7 α -OH C, mas não alterou a concentração de 7 β -OH C, 7-CETO e colesterol (**tabela 4**).

Tabela 4 - Concentração dos óxidos de colesterol (ng/mg de proteína) em macrófagos tratados com AICAR 0,25mM e HDL₂

	Controle (n = 7)	AICAR (n = 7)	Control + HDL2 (n = 7)	AICAR + HDL2 (n = 7)
7α-OH C	4,7 $\pm$ 2,3	4,7 $\pm$ 2,1	11,4 $\pm$ 4,9	6,1 $\pm$ 1,8 *
7β-OH C	8,4 $\pm$ 2,1	7,4 $\pm$ 4,1	14,1 $\pm$ 4,8	10,4 $\pm$ 2,6
7-CETO	53,1 $\pm$ 11,3	42,4 $\pm$ 14,4	74,8 $\pm$ 27,8	53,2 $\pm$ 17,8
Colesterol	34,6 $\pm$ 13,5	37,6 $\pm$ 13,5	46,6 $\pm$ 20,4	43,9 $\pm$ 18,8

Macrófagos J774 foram tratados com 75 μ g/mL de LDL-ac, por 48 h. Após lavagem, as células foram mantidas 24 h em meio suplementado, ou não, com 0,25 mM de AICAR (Sigma-Aldrich, *St. Louis, EUA*) para ativação da AMPK. Em seguida, foram incubadas com 50 μ g/mL de HDL2. As concentrações de óxidos de colesterol foram avaliadas, por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS). Os resultados (média $\pm$ DP) foram comparados por ANOVA por teste t de Student não pareado. * p < 0,05.

Nestas mesmas células, observou-se maior expressão do transportador de colesterol para a apoA-I, *Abca1* e de *Cd36*. Foi verificada uma redução da

expressão da *Prkaa1* (AMPK α 1) e da *Cyp27a1* e nenhuma diferença foi observada no mRNA de *Abcg1*, *Nr1h3* (LXR α) e *Nr1h2* (LXR β) (**figura 9**).

Do mesmo modo que ocorreu com as artérias, alguns genes não puderam ser quantificados nos macrófagos, foram eles: *Cyp7a1*, *Cyp7b1*, *Olr1* e *Prkaa2*.

Figura 9 - Expressão de genes envolvidos no metabolismo de colesterol e óxidos de colesterol em macrófagos tratados com AICAR. Macrófagos J774 foram tratados com 75 μ g/mL de LDL-ac por 48 h. Após, as células foram mantidas 24 h em meio suplementado, ou não, com 0,25 mM de AICAR (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) para ativação da AMPK. O gene *Actb* (β -actina) foi escolhido como normalizador da reação de PCR. Os valores de expressão gênica foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, na qual $\Delta C_t = C_t$ gene alvo - C_t do controle endógeno e $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ do grupo tratado - ΔC_t do grupo controle. Os resultados (média $\pm$ DP) foram comparados entre grupos por teste t de *Student* não pareado. Controle n = 7; AICAR n = 6.

5. DISCUSSÃO

O exercício físico regular reduz a gênese e a evolução da aterosclerose, em particular, por modular favoravelmente o perfil de lípides e lipoproteínas no compartimento plasmático e arterial (Ramachandran et al., 2005; Kurose et al., 2015; Rocco et al., 2011). Considerando-se o papel dos óxidos de colesterol sobre o controle da síntese e exportação de lípides, bem como inflamação e apoptose no leito arterial, avaliamos o efeito do treinamento físico aeróbio em camundongos *knockout* para apoE, sobre a concentração plasmática e arterial de colesterol e óxidos de colesterol e a expressão de genes que modulam sua metabolização.

Ao final, o protocolo de treinamento aeróbio realizado consistiu em, aproximadamente, 58% da velocidade máxima alcançada no teste de esforço máximo, o que sugere um treinamento de intensidade moderada (Ferreira et al., 2007; Teixeira et al., 2012). O maior incremento da capacidade física, observada tanto no tempo para exaustão quanto na variação no tempo de exaustão nos animais treinados assegura a eficiência protocolo de treinamento.

No plasma e no arco aórtico dos camundongos apoE^{-/-}, o 7-CETO foi o principal óxido de colesterol, representando, respectivamente, 34% e 54% do total dos óxidos de colesterol avaliados. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores realizados neste mesmo modelo experimental (Maor et al., 2000; Vaya et al., 2001). Vaya et al. (2000) mensuraram seis óxidos de colesterol na aorta de camundongos apoE^{-/-} e observaram que os produtos da oxidação do colesterol no carbono 7 (7-CETO > 7β-OH C > 7α-OH C) representaram cerca de 80% do conteúdo de óxidos de colesterol, sendo o 7-CETO o mais abundante. Maor et al. (2000) demonstraram que o 7-CETO é o óxido de colesterol mais abundante (51% do total de óxidos de colesterol) em macrófagos isolados da aorta de camundongos apoE^{-/-}. Na aorta deste mesmo modelo animal, Shentu et al. (2012) descreveram que o 7α-OH C e o 7β-OH C foram mais abundantes que o 7-CETO.

O fato de o 7-CETO ser formado em grande quantidade durante a oxidação da LDL e ser o principal óxido de colesterol acumulado em macrófagos incubados com essa lipoproteína sugere que a maior fonte desse óxido na lesão aterosclerótica seja proveniente da captação de LDL-ox (Brown et al., 1996; Maor et al., 2000). Ainda, o 7-CETO e outros óxidos de colesterol podem ser formados pela oxidação do colesterol na própria célula (Wen et al., 2007).

No presente estudo, o treinamento físico aumentou a concentração de 7 β -OH C no arco aórtico dos camundongos, o qual foi acompanhado da redução do conteúdo de colesterol arterial (**figura 7**), independentemente de alterações no peso, colesterolemia, HDL-c e concentração dos óxidos de colesterol no plasma. Além disso, o aumento e redução das enzimas Cyp27a1 e Cyp7b1, respectivamente, no arco aórtico, sugerem maior conteúdo de 27-OH C, embora não tenha sido possível quantificar a concentração deste esteroide em nossas análises por CG-MS. Outros autores também foram incapazes de quantificar as concentrações de 27-OH C na aorta de camundongos apoE *knockout* (Vaya et al., 2001; Maor et al., 2000). Isto pode ser atribuído ao rápido fluxo de 27-OH C para fora das células, em via alternativa ao TRC, conforme previamente descrito (Björkhem et al., 1994)

Dois autores já sugeriram que o aumento do conteúdo de óxidos de colesterol poderia favorecer a redução da lesão aterosclerótica, devido ao aumento da apoptose de macrófagos (Tarling et al., 2010; Zhong et al., 2016). De fato, a maior apoptose de macrófagos, diminui a celularidade local e tem sido associada ao menor desenvolvimento da lesão aterosclerótica inicial (Linton et al., 2016). Por outro lado, em lesões avançadas, com ineficiente eferocitose, a maior apoptose poderia contribuir para aumentar o núcleo necrótico e a vulnerabilidade da placa (Linton et al., 2016). É importante observar que nenhum dos dois artigos demonstrou um efeito causal do aumento de óxidos de colesterol e redução da aterosclerose.

Intensa citotoxicidade e aumento da apoptose são observadas quando células musculares lisas, células endoteliais, linfócitos e macrófagos são suplementados diretamente com óxidos de colesterol (Brown e Jessup, 2009;

Lizard et al., 1996). Contudo, no presente estudo, nenhum marcador de apoptose foi mensurado, dificultando maiores conjecturas.

A homeostase de colesterol e óxidos de colesterol nos macrófagos arteriais é regulada por meio da modulação da captação de LDLox, do efluxo para HDL e apoA-I e sua síntese. Desta forma, a maior concentração de óxidos de colesterol nos camundongos treinados reflete o balanço destas três vias.

São escassos os estudos que avaliaram a influência do exercício físico na formação dos produtos de oxidação do colesterol e estes apresentaram diferentes resultados. Musman et al. (2016) observaram que o treinamento físico por 4 semanas reduziu o conteúdo de colesterol e óxidos de colesterol no plasma e em mitocôndrias isoladas do coração em camundongos obesos ob/ob submetidos à isquemia/reperfusão. Segundo o autor, este resultado foi devido à diminuição do colesterol mitocondrial e ao aumento da capacidade antioxidante do tecido cardíaco.

Em outro estudo, o exercício físico até a exaustão elevou as concentrações dos óxidos de colesterol 7 α -OH C, 7 β -OH C, 7-CETO e 27-OH C no fígado de ratos, o que foi prevenido por 45 dias de dieta rica em extrato de brócolis, um vegetal capaz de aumentar as defesas antioxidantes (Cardenia et al., 2017). Diferenças no protocolo de treinamento (agudo vs crônico), tecido analisado, e intensidade de exercício, podem ter influenciado nas diferenças entre os estudos. Tanto Musman et al., (2016), quanto Cardenia et al., (2017), deram grande importância à modulação das defesas antioxidantes na formação dos óxidos de colesterol.

Ao contrário do exercício físico agudo que favorece o estresse oxidativo e, desse modo, pode contribuir para a síntese dos óxidos de colesterol não-enzimáticos, o treinamento físico crônico tem sido correlacionado com o aumento da produção de enzimas antioxidantes (Meilhac et al., 2001). Isso é evidenciado no estudo de Meilhac et al. (2001), no qual após exercício físico agudo, observou-se elevação de proteínas oxidadas no plasma de camundongos *knockout* para o receptor de LDL, ao passo que após 12 semanas de treinamento, esse marcador de estresse oxidativo não foi diferente

quando comparado ao grupo sedentário. Além disso, o treinamento crônico aumentou a atividade da enzima antioxidante catalase na aorta e reduziu a lesão aterosclerótica (Meilhac et al., 2001).

No presente estudo, a maior expressão da *cat* no arco aórtico observada nos camundongos treinados não impediu a elevação dos óxidos de colesterol, mostrando que outros mecanismos estão influenciando sua concentração. Por outro lado, é possível conjecturar que o aumento desta enzima seja capaz de contrabalançar os efeitos dos óxidos de colesterol sobre o estresse oxidativo intracelular.

Na aterosclerose é proposto que a principal fonte de óxidos de colesterol seja a captação de LDL modificadas por oxidação. Na íntima arterial, a LDLox é reconhecida e captada pelos receptores *scavenger* de macrófagos, incluindo receptor *scavenger* classe A (SR-A), SR-BI, CD36 e LOX-1. Se persistente, a excessiva internalização de LDLox, leva ao acúmulo de óxidos de colesterol, dos quais os principais são aqueles modificados no carbono 7, formação de células espumosas e o desenvolvimento da placa (Brown e Jessup, 1999).

SR-A e CD36 (receptor *scavenger* tipo B) são os principais receptores de LDLox em macrófagos, suscitando até 90% da captação dessa lipoproteína (Kunjathoor et al., 2001). Por outro lado, células endoteliais captam as LDLox preferencialmente via LOX-1 (Levitan et al., 2010).

Tem sido observado, que tanto o grau de oxidação da LDL quanto os óxidos de colesterol, em especial o 7α -OH C, regulam positivamente a quantidade dos receptores *scavengers* presentes na célula, favorecendo a captação de LDLox (Leonarduzzi et al., 2008). A modulação do CD36 ou do LOX-1 influenciam a aterosclerose. Guy et al. (2007) e Mehta et al. (2007), demonstraram que a deleção de CD36 ou LOX-1, em camundongos suscetíveis a aterosclerose, reduziu o acúmulo de lípidos na aorta.

Na presente investigação, o treinamento aumentou em 75% a expressão gênica do receptor *scavenger* *Cd36*, e reduziu 65% do *Olr1* (LOX-1) no arco aórtico. Corroborando esse resultado, em leucócitos isolados de plasma humano, o treinamento aeróbio por 8 semanas aumentou a expressão

do mRNA de *CD36* comparado aos sedentários (Butcher et al., 2008). Segundo Butcher et al. (2008) o aumento do *CD36* poderia proporcionar um mecanismo para a depuração dos lípides quando associado a um eficiente processo de transporte reverso de colesterol. De fato, em nosso estudo, apesar do aumento desse receptor, houve expressiva diminuição do conteúdo de colesterol arterial.

Recentemente, Pinto et al. (2015) verificaram maior expressão do mRNA de *Cd36* e *Olr1* (LOX-1) na aorta de camundongos selvagens treinados, imediatamente após a sessão de exercício físico. No entanto, após 48 h apenas a expressão de *Olr1* estava supra regulada. Nesse mesmo estudo, ao contrário da medida arterial, ambos receptores foram negativamente regulados em macrófagos de peritônio imediatamente após a sessão de exercício. É interessante comentar, que o metabolismo do colesterol é diferente entre camundongos selvagens e *apoE^{-/-}*, de tal forma que mesmo quando alimentados com dieta hiperlipídica, pouco, ou nenhum, acúmulo de colesterol é evidenciado na parede arterial dos selvagens.

Não é de nosso conhecimento qualquer estudo que sobreponha a influência do receptor *CD36* sobre *LOX-1* e vice-versa na aterosclerose. Contudo, a maior expressão de *Cd36* poderia suportar o aumento de óxidos de colesterol observada nos camundongos treinados.

Rocco et al. (2011), utilizando camundongos transgênicos para CETP humana, evidenciaram que o treinamento físico por 6 semanas aumentou a eficiência do transporte reverso de colesterol *in vivo*, demonstrado pela maior recuperação de colesterol, advindo de macrófagos, no plasma, fígado e fezes. Por outro lado, macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos selvagens exercitados não demonstraram maior eficiência na retirada de colesterol (Pinto et al., 2015). Além disso, não se evidenciaram alterações na expressão de genes envolvidos no fluxo de lípides, após programa de exercício aeróbio (Pinto et al., 2015). Nesses dois modelos, o aumento no transporte reverso de colesterol pelo treinamento físico foi atribuído a moduladores sistêmicos, como o aumento no HDL-c e maior expressão dos receptores hepáticos B-E e SR-BI.

Corroborando o pensamento de que o exercício físico é um modulador positivo do transporte reverso de colesterol, outros autores ainda demonstram aumento da expressão gênica de *Abca1*, *Abcg1* e *Nr1h3* (LXR α) em diferentes tecidos (Butcher et al., 2008; Ghorbanian et al., 2013; Kazeminasab et al., 2013; Rocco et al., 2011).

No presente estudo houve redução da expressão do transportador *Abcg1* na parede arterial. Entendemos que a menor expressão desse transportador seja secundária à redução da massa de colesterol. Apesar de o colesterol ser um pobre ativador de LXR, outros esteróis relacionados ao colesterol possuem papel fundamental na regulação dessa proteína e, consequentemente, na síntese dos transportadores ABCA1 e ABCG1 (Spann et al., 2012).

Spann et al. (2012) demonstraram que a sobrecarga de colesterol em doses crescentes, em macrófagos, resultou em maiores concentrações de desmosterol, precursor de colesterol, devido à extrema inibição da enzima 24-deidrocolesterol redutase, responsável em converter desmosterol em colesterol. O desmosterol é apontado, por estes autores, como o principal ativador de LXR em macrófagos. Neste sentido, mesmo que a afinidade do desmosterol ao LXR seja um quinto daquela observada nos mais potentes óxidos de colesterol (24-OH C, 25-OH C, 27-OH C e 24,25-epoxicolesterol), sua concentração, em macrófagos, é cerca de 20 vezes maior.

Além do transporte mediado por receptor, as células possuem a capacidade de eliminar grandes quantidades de óxidos de colesterol através de difusão livre, uma vez que o acréscimo de um radical polar confere a essa molécula maior eficiência para atravessar membranas lipofílicas, especialmente àqueles oxidados na cadeia lateral, mas também aos oxidados no anel esteroide (Meaney et al. 2002). Kan et al. (1992) observaram que a meia-vida para troca de 7 α -OH C e 7 β -OH C entre membranas de fosfolípidos representou mais de 100 vezes aquela do colesterol.

Maior expressão, no arco aórtico, da enzima *Cyp27a1* e redução da *Cyp7b1*, responsáveis pela síntese e metabolização do 27-OH C

respectivamente, após treinamento físico, sugere elevação nos níveis desse óxido de colesterol. A CYP27A1 é uma enzima localizada na mitocôndria, responsável pela adição de uma hidroxila no carbono 27 do colesterol. Ainda, apresenta baixa atividade de hidroxilação do carbono 25 (Li et al., 2007). A CYP27A1 é amplamente expressa nos tecidos corporais (Pikuleva, 2006; Uno et al., 2014). No fígado, inicia a produção de ácidos biliares na via ácida levando à formação principalmente do ácido quenodeoxicólico. Em macrófagos, a alta expressão dessa enzima representa um mecanismo de defesa contra o acúmulo de colesterol (Björkhem et al., 1994). Segundo Björkhem et al. (1994) macrófagos humanos podem eliminar grandes quantidades de colesterol na forma de 27-OH C por meio de difusão passiva, indicando uma rota adicional de efluxo de colesterol. Em macrófagos murinos RAW 264.7 foi demonstrado que a superexpressão da CYP27A1 estimula o efluxo de colesterol por aumentar a expressão de ABCA1 (Mukhamedova et al. 2008; Escher et al., 2003).

Dessa forma, o aumento das concentrações dos óxidos de colesterol por meio do exercício físico poderia facilitar a retirada de colesterol celular, favorecendo a redução da aterosclerose.

No arco aórtico, verificamos um aumento da expressão dos mRNA dos genes *Prkaa1* e *Prkaa2*, que codificam as proteínas AMPK α 1 e AMPK α 2, respectivamente. A maior ativação da AMPK é um importante mediador dos efeitos metabólicos do exercício físico, especialmente no músculo esquelético, mas também em outros tecidos, modulando a maior captação dos substratos energéticos, a biogênese mitocondrial e mudanças no tipo de fibras para um perfil mais oxidativo.

A ativação farmacológica da AMPK, em macrófagos, vincula-se ao aumento do efluxo de colesterol e à diminuição da captação de LDL, por aumentar e reduzir o conteúdo de ABCG1 e LOX-1, respectivamente (Li et al., 2010b; Chen B et al., 2016). Além disso, em células endoteliais foi observado maior efluxo de 7-CETO após ativação da AMPK, e a infusão de AICAR, em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, reduziu o acúmulo de

lípidos em células endoteliais isoladas da aorta (Chen B et al., 2016; Li et al., 2010a).

Considerando a maior expressão da AMPK pelo exercício físico no presente trabalho e os dados da literatura, propomos que o efeito do exercício físico sobre a concentração de colesterol e óxidos de colesterol no arco aórtico pudesse ser mediado por essa proteína. A ativação da AMPK foi avaliada *in vitro* pelo tratamento de macrófagos J774, sobrecarregados com LDL acetilada, com AICAR (0,25 mM). Nos macrófagos, a ativação da AMPK não alterou a concentração de colesterol, contudo levou à uma menor concentração de 7 α -OH C após indução do efluxo de esteróis pela HDL₂, o que foi acompanhado da maior expressão de *Abca1*. É digno de nota que o ABCA1 não é um bom transportador para HDL, contudo partículas de apoA-I podem dissociar-se da HDL estimulando o efluxo de colesterol por meio desse transportador (Liang et al., 1994). Apesar de o ABCG1 ser considerado o principal transportador de óxidos de colesterol, Tam (2006) e Matsuda (2013) observaram que óxidos de colesterol podem ser transportador com eficiência por meio do ABCA-1. Assim, o aumento da expressão de *Abca1* por AICAR pode ter contribuído para redução do acúmulo do 7 α -OH C. Sugerindo redução da concentração de 27-OH C menor expressão da enzima *Cyp27a1* foi observada nas células tratadas com AICAR. A redução da expressão do mRNA da *Prkaa1* o gene da AMPK pode ser explicada como um mecanismo compensatório ao aumento de sua atividade,

Os achados *in vitro* com ativação de AMPK, não parecem refletir a biologia dos óxidos de colesterol arteriais sob influência do treinamento físico aeróbio. Sendo, assim, de acordo com as condições experimentais do presente estudo, a AMPK não pode ser definida como uma mediadora dos efeitos do exercício sobre o metabolismo óxidos de colesterol e transporte reverso. Li et al. (2010b) descreveram em macrófagos uma expressão aumentada do gene e do conteúdo proteico de ABCG1 e maior efluxo de colesterol nas células com ativação de AMPK. No entanto, naquela investigação, a concentração de AICAR utilizada foi 1 mM, o qual foi evidenciada por nosso grupo e por outros como citotóxica (Chang et al., 2016; Russe et al., 2014; Santidrián et al., 2010).

O exato papel da AMPK na mediação dos efeitos do treinamento físico sobre a homeostase lipídica da parede arterial deve ser mais bem investigado.

Em conclusão, em camundongos dislipidêmicos, o treinamento físico aeróbio, por 6 semanas, aumentou a concentração de 7β -OH C, o que se vincula à maior expressão de *Cd36* no arco aórtico. A rápida difusão de óxidos de colesterol, como via complementar ao transporte reverso de colesterol, pode também ser favorecida pelo aumento e redução, respectivamente, na expressão de *Cyp27a1* e *Cyp7b1*, favorecendo maior liberação de 27-OH C das células. Juntamente com suas ações diretas que beneficiam o transporte reverso de colesterol, previamente descritas (Rocco et al., 2011), o treinamento físico diminui a concentração de colesterol na parede arterial, prevenindo a aterosclerose. Baseado nos ensaios *in vitro* a ativação da AMPK não parece contribuir para o aumento das concentrações de óxidos de colesterol após treinamento físico.

6. CONCLUSÃO

Em camundongos dislipidêmicos, o treinamento físico aeróbio aumenta a concentração de 7β -OH C, o que se vincula à maior expressão de *Cd36* no arco aórtico. A rápida difusão de óxidos de colesterol, como via complementar ao transporte reverso de colesterol, pode também ser favorecida pelo aumento e redução, respectivamente, na expressão de *Cyp27a1* e *Cyp7b1*, favorecendo maior liberação de 27-OH C das células. Juntamente com suas ações diretas que beneficiam o transporte reverso de colesterol, previamente descritas, o treinamento físico diminui a concentração de colesterol na parede arterial, prevenindo a aterosclerose. Baseado nos ensaios *in vitro* a ativação da AMPK não parece contribuir para o aumento das concentrações de óxidos de colesterol após treinamento físico.

7. REFERÊNCIAS

- Adorni MP, Zimetti F, Billheimer JT, Wang N, Rader DJ, Phillips MC, Rothblat GH. The roles of different pathways in the release of cholesterol from macrophages. *J Lipid Res.* 2007; 48(11):2453-62.
- Ahtiainen JP, Walker S, Silvennoinen M, Kyröläinen H, Nindl BC, Häkkinen K, et al. Exercise type and volume alter signaling pathways regulating skeletal muscle glucose uptake and protein synthesis. *Eur J Appl Physiol.* 2015; 115(9):1835-45.
- Al-Shayji IA, Caslake MJ, Gill JM. Effects of moderate exercise on VLDL1 and Intralipid kinetics in overweight/obese middle-aged men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 302: E349 –E355.
- Arguello G, Balboa E, Arrese M, Zanlungo S. Recent insights on the role of cholesterol in non-alcoholic fatty liver disease. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1852(9):1765-78.
- Arquer A, Elosua R, Marrugat J. Physical activity and lipid oxidation. *Apunts Med Esport.* 2010; 45(165):30-39
- Babiker A, Andersson O, Lindblom D, van der Linden J, Wiklund B, Lütjohann D, Diczfalussy U, Björkhem I. Elimination of cholesterol as cholestenic acid in human lung by sterol 27-hydroxylase: evidence that most of this steroid in the circulation is of pulmonary origin. *J Lipid Res.* 1999; 40(8):1417-25.
- Barbosa VA, Luciano TF, Marques SO, Vitto MF, Souza DR, Silva LA, et al. Acute exercise induce endothelial nitric oxide synthase phosphorylation via Akt and AMP-activated protein kinase in aorta of rats: Role of reactive oxygen species. *Int J Cardiol.* 2013; 167(6):2983-8.
- Bascul J, Domergue N, Mourot J, Dery G, Crastes de Paulet A. Intestinal absorption and fecal excretion of 5,6a-epoxy-5a-cholesta-3b-ol by the male wistar rat. *Lipids.* 1986; 21: 744.

- 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.
- Bergeron J, Couillard C, Després JP, Gagnon J, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Wilmore JH, Bouchard C. Race differences in the response of postheparin plasma lipoprotein lipase and hepatic lipase activities to endurance exercise training in men: results from the HERITAGE Family Study. *Atherosclerosis*. 2001; 159(2):399-406.
- Bhattacharyya AK, Lin DS, Connor WE. Cholesterol metabolism in patients with cerebrotendinous xanthomatosis: absorption, turnover, and tissue deposition. *J Lipid Res* 2007; 48(1):185-92.
- Bi X, Zhu X, Gao C, et al. Myeloid Cell-Specific ABCA1 Deletion Has Minimal Impact on Atherogenesis in Atherogenic Diet-Fed LDL Receptor Knockout Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(9):1888-1899.
- Björkhem I, Andersson O, Diczfalusy U, Sevastik B, Xiu RJ, Duan C, Lund E. Atherosclerosis and sterol 27-hydroxylase: evidence for a role of this enzyme in elimination of cholesterol from human macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91(18):8592-6.
- Björkhem I, Lütjohann D, Diczfalusy U, Stahle L, Ahlborg G, Wahren J. Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. *J Lipid Res* 1998; 39(8):1594-600.
- Broncano JM, Petrón MJ, Parra V, Timón ML. Effect of different cooking methods on lipid oxidation and formation of free cholesterol oxidation products (COPs) in Latissimus dorsi muscle of Iberian pigs. *Meat Sci*. 2009; 83(3):431-7.
- Brown AJ, Jessup W. Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1999; 142(1):1-28.

- Brown AJ, Jessup W. Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Mol Aspects Med.* 2009; 30(3):111-22.
- Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell.* 1997; 89(3):331-40.
- Brown, A., R. Dean, and W. Jessup. 1996. Free and esterified oxysterol: formation during copper-oxidation of low density lipoprotein and uptake by macrophages. *J. Lipid Res.* 37: 320–335.
- Butcher LR, Thomas A, Backx K, Roberts A, Webb R, Morris K. Low-intensity exercise exerts beneficial effects on plasma lipids via PPARgamma. *Med Sci Sports Exerc* 2008; 40(7):1263-70.
- Cacicedo JM, Gauthier MS, Lebrasseur NK, Jasuja R, Ruderman NB, Ido Y. Acute exercise activates AMPK and eNOS in the mouse aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011; 301(4):H1255-65.
- Cardenia V, Rodriguez-Estrada MT, Lorenzini A, Bandini E, Angeloni C, Hrelia S, Malaguti M. Effect of broccoli extract enriched diet on liver cholesterol oxidation in rats subjected to exhaustive exercise. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017 May;169:137-144.
- Chan S, Gray JI, Gomaa, EA, Harte BR, Kelly PM, Buckley DJ. Cholesterol oxidation in whole milk powders as influenced by processing and packaging. *Food Chemistry.* 1993; 47(4): 321–328.
- Chang T-J, Tseng H-C, Liu M-W, Chang Y-C, Hsieh M-L, Chuang L-M. Glucagon-like peptide-1 353 prevents methylglyoxal-induced apoptosis of beta cells through improving mitochondrial function 354 and suppressing prolonged AMPK activation. *Scientific Reports.* 2016; 6:23403.
- Chen B, Li J, Zhu H. AMP-activated protein kinase attenuates oxLDL uptake in macrophages through PP2A/NF-κB/LOX-1 pathway. *Vascul Pharmacol.* 2016;85:1-10.

- Chen L, Wang J, Zhang YY, Yan SF, Neumann D, Schlattner U, Wang ZX, Wu JW. AMP-activated protein kinase undergoes nucleotide-dependent conformational changes. *Nat Struct Mol Biol.* 2012 ;19(7):716-8.
- Chen W, Chen G, Head DL, Mangelsdorf DJ, Russell DW. Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice. *Cell Metab* 2007; 5(1): 73-9.
- Chen X, An X, Chen D, Ye M, Shen W, Han W, Zhang Y and GAO P . Chronic exercise training improved aortic endothelial and mitochondrial function via an AMPK α 2-dependent manner. *Front. Physiol.* 2016; 7:631.
- Chen Y, Arnal-Levron M, Lagarde M, Moulin P, Luquain-Costaz C, Delton I. THP macrophages oxidized cholesterol, generating 7-derivative oxysterols specifically released by HDL. *Steroids.* 2015; 99(Pt B):212-8.
- Chen ZP, Stephens TJ, Murthy S, Canny BJ, Hargreaves M, Witters LA, Kemp BE, McConell GK. Effect of exercise intensity on skeletal muscle AMPK signaling in humans. *Diabetes* 2003; 52:2205–2212.
- Cheung PC, Salt IP, Davies SP, Hardie DG, Carling D. Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem J.* 2000; 346(3):659-69.
- Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration. Efficacy and safety of LDL-lowering therapy among men and women: meta-analysis of individual data from 174,000 participants in 27 randomised trials. *Lancet.* 2015; 385(9976): 1397-405.
- Conchillo A, Ansoreno D, Astiasaran I. Intensity of lipid oxidation and formation of cholesterol oxidation products during frozen storage of raw and cooked chicken. *J. Sci Food Agric.* 2005; 85: 141–146.
- 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.

- Dasgupta B, Chhipa RR. Evolving Lessons on the Complex Role of AMPK in Normal Physiology and Cancer. *Trends Pharmacol Sci.* 2016 Mar;37(3):192-206.
- de Graaf J, Hak-Lemmers HL, Hectors MP, Demacker PN, Hendriks JC, Stalenhoef AF. Enhanced susceptibility to in vitro oxidation of the dense low density lipoprotein subfraction in healthy subjects. *Arterioscler Thromb* 1991; 11(2):298-306.
- Demina EP, Miroshnikova VV, Schwarzman AL. Role of the ABC transporters A1 and G1, key reverse cholesterol transport proteins, in atherosclerosis. *Mol Biol (Mosk).* 2016; 50(2):223-30.
- Duane WC, Javitt NB. 27-hydroxycholesterol: production rates in normal human subjects. *J Lipid Res.* 1999; 40(7):1194-9.
- DuSell CD, McDonnell DP. 27-Hydroxycholesterol: a potential endogenous regulator of estrogen receptor signaling. *Trends Pharmacol Sci.* 2008; 29(10):510-4.
- Dzeletovic S, Breuer O, Lund E, Diczfalusy U. Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry. *Anal Biochem.* 1995; 225(1):73-80.
- Elosua R, Molina L, Fito M, Arquer A, Sanchez-Quesada JL, Covas MI, Ordoñez-Llanos J, Marrugat J. Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women. *Atherosclerosis.* 2003; 167(2):327-34.
- Engel T, Fobker M, Buchmann J, Kannenberg F, Rust S, Nofer JR, Schürmann A, Seedorf U. 3 β ,5 α ,6 β -Cholestanetriol and 25-hydroxycholesterol accumulate in ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1)-deficiency. *Atherosclerosis* 2014; 235(1):122-9.

- Escher G, Krozowski Z, Croft KD, Sviridov D. Expression of sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) enhances cholesterol efflux. *J Biol Chem*. 2003; 278(13):11015-9.
- Fan J, Wang J, Bensadoun A, et al. Overexpression of hepatic lipase in transgenic rabbits leads to a marked reduction of plasma high density lipoproteins and intermediate density lipoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(18):8724-8728.
- Ferreira JC, Rolim NP, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E, Brum PC. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34(8):760-5.
- Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med*. 2006;27(2-3):126-39.
- Garcia-Cruset S, Carpenter KL, Guardiola F, Stein BK, Mitchinson MJ. Oxysterol profiles of normal human arteries, fatty streaks and advanced lesions. *Free Radic Res*. 2001;35(1):31-41.
- Gargiulo S, Gamba P, Testa G, Leonarduzzi G, Poli G. The role of oxysterols in vascular ageing. *J Physiol*. 2016; 594(8):2095-113.
- Gaus K, Dean RT, Kritharides L, Jessup W. Inhibition of cholesterol efflux by 7-ketocholesterol: comparison between cells, plasma membrane vesicles, and liposomes as cholesterol donors. *Biochemistry*. 2001 Oct 30;40(43):13002-14.
- GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016; 388(10053):1459-1544.
- Gesquière L, Loreau N, Blache D. Impaired cellular cholesterol efflux by oxysterol-enriched high density lipoproteins. *Free Radic Biol Med*. 1997; 23(4):541-7.

- Ghafouri K, Cooney J, Bedford DK, Wilson J, Caslake MJ, Gill JM. Moderate Exercise Increases Affinity of Large Very Low-Density Lipoproteins for Hydrolysis by Lipoprotein Lipase. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100(6):2205-13.
- Ghorbanian B, Ravassi A, Kordi MR, Hedayati M. The Effects of Rope Training on Lymphocyte ABCA1 Expression, Plasma ApoA-I and HDL-c in Boy Adolescents. *Int J Endocrinol Metab* 2013; 11(2):76-81.
- Goldstein JL, Brown MS. A Century of Cholesterol and Coronaries: From Plaques to Genes to Statins. *Cell*. 2015;161(1):161-172.
- Gong X, Qian H, Shao W, et al. Complex structure of the fission yeast SREBP-SCAP binding domains reveals an oligomeric organization. *Cell Research*. 2016; 26(11):1197-1211.
- Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med*. 1977; 62(5):707-14.
- Guy E, Kuchibhotla S, Silverstein R, Febbraio M. Continued inhibition of atherosclerotic lesion development in long term Western diet fed CD36^{-/-}/apoE^{-/-} mice. *Atherosclerosis*. 2007; 192(1):123-30.
- Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955; 34(9):1345-53.
- Heverin M, Ali Z, Olin M, Tillander V, Joibari MM, Makoveichuk E, Leitersdorf E, Warner M, Olivercrona G, Gustafsson JÅ, Björkhem I. On the regulatory importance of 27-Hydroxycholesterol in mouse liver. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016 Feb. pii: S0960-0760(16)30015-2. [in press]
- Honzumi S, Shima A, Hiroshima A, Koieyama T, Synthetic Terasaka N. LXR agonist inhibits the development of atherosclerosis in New Zealand White rabbits. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1811:1136–45.

- Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 1996; 383(6602):728-31.
- Jedidi I, Couturier M, Thérond P, Gardès-Albert M, Legrand A, Barouki R, Bonnefont-Rousselot D, Aggerbeck M. Cholesteryl ester hydroperoxides increase macrophage CD36 gene expression via PPARalpha. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 351(3):733-8.
- Jo Y, Lee PCW, Sguigna PV, DeBose-Boyd RA. Sterol-induced degradation of HMG CoA reductase depends on interplay of two Insigs and two ubiquitin ligases, gp78 and Trc8. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011; 108(51):20503-20508.
- Kadoglou NP, Kostomitsopoulos N, Kapelouzou A, Moustardas P, Katsimpoulas M, Giagini A, Dede E, Boudoulas H, Konstantinides S, Karayannacos PE, Liapis CD. Effects of exercise training on the severity and composition of atherosclerotic plaque in apoE-deficient mice. *J Vasc Res*. 2011; 48(4):347-56.
- Kadoglou NP, Moustardas P, Kapelouzou A, et al. The anti-inflammatory effects of exercise training promote atherosclerotic plaque stabilization in apolipoprotein E knockout mice with diabetic atherosclerosis. *Eur J Histochem*. 2013; 57(1):e3.
- Kan CC, Yan J, Bittman R. Rates of spontaneous exchange of synthetic radiolabeled sterols between lipid vesicles. *Biochemistry*. 1992 ; 31(6):1866-74.
- Karuna R, Holleboom AG, Motazacker MM, Kuivenhoven JA, Frikke-Schmidt R, Tybjaerg-Hansen A, et al. Plasma levels of 27-hydroxycholesterol in humans and mice with monogenic disturbances of high density lipoprotein metabolism. *Atherosclerosis*. 2011; 214(2):448-55.
- Kazeminasab F, Marandi M, Ghaedi K, Esfarjani F, Moshtaghian J. Endurance training enhances LXR α gene expression in Wistar male rats. *Eur J Appl Physiol* 2013; 113(9):2285-90.

- Kelley GA, Kelley KS. Aerobic exercise and lipids and lipoproteins in men: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Mens Health Gend.* 2006; 3(1):61-70.
- Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, Baldán A, Tarr P, Fishbein MC, Frank J, Francone OL, Edwards PA. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab.* 2005; 1(2):121-31.
- 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):351–8.
- Khan MI, Min JS, Lee SO, et al. Cooking, storage, and reheating effect on the formation of cholesterol oxidation products in processed meat products. *Lipids in Health and Disease.* 2015;14:89.
- Kido K, Ato S, Yokokawa T, Makanae Y, Sato K, Fujita S. Acute resistance exercise-induced IGF1 expression and subsequent GLUT4 translocation. *Physiol Rep.* 2016; 4(16): 1-13.
- 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.
- Kolovou G, Anagnostopoulou K, Mikhailidis DP, Cokkinos DV. Apolipoprotein E knockout models. *Curr Pharm Des.* 2008; 14(4):338-51.
- Korytowski W, Wawak K, Pabisz P, et al. Impairment of Macrophage Cholesterol Efflux by Cholesterol Hydroperoxide Trafficking: Implications for Atherogenesis Under Oxidative Stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(10):2104-2113.
- 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):1483-92.

- Kröller-Schön S, Jansen T, Hauptmann F, Schüler A, Heeren T, Hausding M, et al. $\alpha 1$ AMP activated protein kinase mediates the vascular protective effects of exercise *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32(7):1632-41
- Krut LH, Yang JW, Schonfeld G, Ostlund RE Jr. The effect of oxidizing cholesterol on gastrointestinal absorption, plasma clearance, tissue distribution, and processing by endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17(4):778-85.
- Kunjathoor VV, Febbraio M, Podrez EA, Moore KJ, Andersson L, Koehn S, Rhee JS, Silverstein R, Hoff HF, and 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: 49982–49988.
- Kurose S, Iwasaka J, Tsutsumi H, Yamanaka Y, Shinno H, Fukushima Y, Higurashi K, Imai M, Masuda I, Takeda S, Kawai C, Kimura Y. Effect of exercise-based cardiac rehabilitation on non-culprit mild coronary plaques in the culprit coronary artery of patients with acute coronary syndrome. *Heart Vessels* 2015;31(6):846-54.
- Lange Y, Ye J, Strebel F. Movement of 25-hydroxycholesterol from the plasma membrane to the rough endoplasmic reticulum in cultured hepatoma cells. *J Lipid Res* 1995; 36(5):1092-7.
- Langer C, Huang Y, Cullen P, Wiesenhütter B, Mahley RW, Assmann G, von Eckardstein A. Endogenous apolipoprotein E modulates cholesterol efflux and cholesteryl ester hydrolysis mediated by high-density lipoprotein-3 and lipid-free apolipoproteins in mouse peritoneal macrophages. *J Mol Med (Berl).* 2000;78(4):217-27.
- Lee SO, Lim DG, Seol KH, Erwanto Y, Lee M. Effects of various cooking and re-heating methods on cholesterol oxidation products of beef loin. *Asian Australas J Anim Sci.* 2006; 19:756–762.
- Leonarduzzi G, Gamba P, Gargiulo S, Sottero B, Kadl A, Biasi F, Chiarpotto E, Leitinger N, Vendemiale G, Serviddio G, Poli G. Oxidation as a crucial

reaction for cholesterol to induce tissue degeneration: CD36 overexpression in human promonocytic cells treated with a biologically relevant oxysterol mixture. *Aging Cell* 2008; 7(3):375-82.

Leonarduzzi G, Gargiulo S, Gamba P, Perrelli MG, Castellano I, Sapino A, Sottero B, Poli G. Molecular signaling operated by a diet-compatible mixture of oxysterols in up-regulating CD36 receptor in CD68 positive cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 2010, 54, S31–S41.

Levitan I, Volkov S, Subbaiah PV. Oxidized LDL: Diversity, Patterns of Recognition, and Pathophysiology. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2010;13(1):39-75.

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. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010b;285(43):33499-33509.

Li D, Zhang Y, Ma J, Ling W, Xia M. Adenosine monophosphate activated protein kinase regulates ABCG1-mediated oxysterol efflux from endothelial cells and protects against hypercholesterolemia-induced endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010a; 30(7):1354-62.

Li X, Pandak WM, Erickson SK, Ma Y, Yin L, Hylemon P, Ren S. Biosynthesis of the regulatory oxysterol, 5-cholesten-3 β ,25-diol 3-sulfate, in hepatocytes. *J. Lipid Res.* 2007; 48: 2587–2596

Liang HQ, Rye KA, Barter PJ. Dissociation of lipid-free apolipoprotein A-I from high density lipoproteins. *J Lipid Res.* 1994; 35(7):1187-99.

Li-Hawkins J, Lund EG, Turley SD, Russell DW. Disruption of the oxysterol 7 α -hydroxylase gene in mice. *J Biol Chem* 2000; 275(22):16536-42.

Livak KJ, Schmitgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 2001;25:402-408.

- Lizard G, Deckert V, Dubrez L, Moisan M, Gambert P, Lagrost L. Induction of apoptosis in endothelial cells treated with cholesterol oxides. *Am J Pathol.* 1996; 148(5):1625-38.
- Lorbek G, Lewinska M, Rozman D. Cytochrome P450s in the synthesis of cholesterol and bile acids from mouse models to human diseases. *FEBS J* 2012; 279(9):1516-33.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AI, Randal JR. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
- Mabile L, Lefebvre C, Lavigne J, Boulet L, Davignon J, Lussier-Cacan S, Bernier L. Secreted apolipoprotein E reduces macrophage-mediated LDL oxidation in an isoform-dependent way. *J Cell Biochem.* 2003; 90(4):766-76.
- Mahmood SS, Levy D, Vasan RS, Wang TJ. The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective. *Lancet.* 2014; 383(9921):999-1008.
- Maor I, Kaplan M, Hayek T, Vaya J, Hoffman A, Aviram M. Oxidized monocyte-derived macrophages in aortic atherosclerotic lesion from apolipoprotein E-deficient mice and from human carotid artery contain lipid peroxides and oxysterols. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 ;269(3):775-80.
- Matsuda A, Nagao K, Matsuo M, Kioka N, Ueda K. 24(S)-hydroxycholesterol is actively eliminated from neuronal cells by ABCA1. *J Neurochem.* 2013;126:93–101.
- Mauldin JP, Nagelin MH, Wojcik AJ, Srinivasan S, Skaflen MD, Ayers CR, McNamara CA, Hedrick CC. Reduced expression of ATP-binding cassette transporter G1 increases cholesterol accumulation in macrophages of patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation.* . 2008. 117, 2785–2792.

- McBride A, Ghilagaber S, Nikolaev A, Hardie DG. The glycogen-binding domain on the AMPK beta subunit allows the kinase to act as a glycogen sensor. *Cell Metab.* 2009; 9(1):23-34.
- Meaney S, Bodin K, Diczfalusy U, Björkhem I. On the rate of translocation in vitro and kinetics in vivo of the major oxysterols in human circulation: critical importance of the position of the oxygen function. *J Lipid Res.* 2002; 43(12):2130-5.
- Meaney S, Lütjohann D, Diczfalusy U, Björkhem I. Formation of oxysterols from different pools of cholesterol as studied by stable isotope technique: cerebral origin of most circulating 24S-hydroxycholesterol in rats, but not in mice. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1486(2-3):293-8.
- Mehta JL, Khaidakov M, Hermonat PL, Mitra S, Wang X, Novelli G, Sawamura T. LOX-1: a new target for therapy for cardiovascular diseases. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2011; 25(5):495-500.
- 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):1681-8.
- Meir K, Kitsberg D, Alkalay I et al. Human sterol 27-hydroxylase (CYP27) overexpressor transgenic mouse model. Evidence against 27-hydroxycholesterol as a critical regulator of cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* 2002; 277:34036–41.
- Michel CC, Nanjee MN, Olszewski WL, Miller NE. LDL and HDL transfer rates across peripheral microvascular endothelium agree with those predicted for passive ultrafiltration in humans. *J Lipid Res* 2015; 56(1):122-8.
- Min JS, Khan MI, Lee SO, Yim DG, Seol KH, Lee M, Jo C. Impact of Cooking, Storage, and Reheating Conditions on the Formation of Cholesterol Oxidation Products in Pork Loin. *Korean J Food Sci Anim Resour.* 2016;36(1):23-8.

- Morel DW, Edgerton ME, Warner GE, Johnson WJ, Phillips MC, Rothblat GH. Comparison of the intracellular metabolism and trafficking of 25-hydroxycholesterol and cholesterol in macrophages. *J Lipid Res.* 1996; 37(9):2041-51.
- Morris LL, Hartman IZ, Jun D-J, Seemann J, DeBose-Boyd RA. Sequential Actions of the AAA-ATPase Valosin-containing Protein (VCP)/p97 and the Proteasome 19 S Regulatory Particle in Sterol-accelerated, Endoplasmic Reticulum (ER)-associated Degradation of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A Reductase. *The Journal of Biological Chemistry.* 2014;289(27):19053-19066.
- Motamed M, Zhang Y, Wang ML, et al. Identification of Luminal Loop 1 of Scap Protein as the Sterol Sensor That Maintains Cholesterol Homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry.* 2011;286(20):18002-18012.
- Mukhamedova N, Escher G, D'Souza W, Tchoua U, Grant A, Krozowski Z, Bukrinsky M, Sviridov D. Enhancing apolipoprotein A-I-dependent cholesterol efflux elevates cholesterol export from macrophages in vivo. *J Lipid Res.* 2008;49(11):2312-22.
- Musman J, Pons S, Barau C, Caccia C, Leoni V, Berdeaux A, Ghaleh B, Morin D. Regular treadmill exercise inhibits mitochondrial accumulation of cholesterol and oxysterols during myocardial ischemia-reperfusion in wild-type and ob/ob mice. *Free Radic Biol Med.* 2016 Dec; 101:317-324.
- Mutharasan RK, Thaxton CS, Berry J, Daviglius ML, Yuan C, Sun J, Ayers C, Lloyd-Jones DM, Wilkins JT. HDL Efflux Capacity, HDL Particle Size and High-Risk Carotid Atherosclerosis in a Cohort of Asymptomatic Older Adults: The Chicago Healthy Aging Study. *J Lipid Res.* 2017 Jan. [*In press*]
- Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb.* 1994; 14(1):133-40.

- Namgaladze D, Kemmerer M, von Knethen A, Brüne B. AICAR inhibits PPAR γ during monocyte differentiation to attenuate inflammatory responses to atherogenic lipids. *Cardiovasc Res*. 2013; 98(3):479-87.
- Napoli C, Willinas-Ignarro S, Nigris F, et al. Physical training and metabolic supplementation reduce spontaneous atherosclerotic plaque rupture and prolong survival in hypercholesterolemic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103 (27): 10479-10484.
- Nelson ER, Wardell SE, Jasper JS, Park S, Suchindran S, Howe MK, Carver NJ, Pillai RV, Sullivan PM, Sondhi V, Umetani M, Geradts J, McDonnell DP. 27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology. *Science* 2013; 342(6162):1094-8.
- Nunes VS, Panzoldo NB, Leança CC, Parra ES, Zago VS, da Silva EJ, Cazita PM, Nakandakare ER, de Faria EC, Quintão EC. Increased 27-hydroxycholesterol plasma level in men with low high density lipoprotein-cholesterol may circumvent their reduced cell cholesterol efflux rate. *Clin Chim Acta*. 2014; 433:169-73.
- Ogasawara R, Sato K, Matsutani K, Nakazato K, Fujita S. The order of concurrent endurance and resistance exercise modifies mTOR signaling and protein synthesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014; 306(10):E1155-62.
- Paniangvait P, King AJ, Jones AD, German BG. Cholesterol Oxides in Foods of Animal Origin. *J Food Sci*. 1995; 60(6): 1159–1174.
- Parto P, Lavie CJ, Swift D, Sui X. The role of cardiorespiratory fitness on plasma lipid levels. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2015; 13(11):1177-83.
- Pikuleva IA. Cholesterol-metabolizing cytochromes P450. *Drug Metab Dispos*. 2006; 34(4):513-20.
- Pinto PR, Rocco DD, Okuda LS, et al. Aerobic exercise training enhances the in vivo cholesterol trafficking from macrophages to the liver independently

- of changes in the expression of genes involved in lipid flux in macrophages and aorta. *Lipids Health Dis* 2015; 14(1):109.
- Poli G, Sottero B, Gargiulo S, Leonarduzzi G. Cholesterol oxidation products in the vascular remodeling due to atherosclerosis. *Mol Aspects Med.* 2009; 30(3):180-9.
- Radhakrishnan A, Goldstein JL, McDonald JG, Brown MS. Switch-like control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER cholesterol: a delicate balance. *Cell metabolism.* 2008; 8(6):512-521.
- Ramachandran S, Penumetcha M, Merchant NK, Santanam N, Rong R, Parthasarathy S. Exercise reduces preexisting atherosclerotic lesions in LDL receptor knockout mice. *Atherosclerosis* 2005; 178(1):33-8.
- Ren R, Zhou X, He Y, et al. Crystal structure of a mycobacterial Insig homolog provides insight into how these sensors monitor sterol levels. *Science.* 2015;349(6244):187-191.
- Riahi S, Mohammadi MT, Sobhani V, Ababzadeh S. Chronic Aerobic Exercise Decreases Lectin-Like Low Density Lipoprotein (LOX-1) Receptor Expression in Heart of Diabetic Rat. *Iranian Biomedical Journal.* 2016;20(1):26-32.
- Riahi S, Mohammadi MT, Sobhani V, Soleimany M. Chronic effects of aerobic exercise on gene expression of LOX-1 receptor in the heart of rats fed with high fat diet. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences.* 2015;18(8):805-812.
- Rocco DD, Okuda LS, Pinto RS, Ferreira FD, Kubo SK, Nakandakare ER, Quintão EC, Catanozi S, Passarelli M. Aerobic exercise improves reverse cholesterol transport in cholesteryl ester transfer protein transgenic mice. *Lipids* 2011; 46(7):617-25.
- Rosenson RS, Brewer HB Jr, Ansell BJ, Barter P, Chapman MJ, Heinecke JW, Kontush A, Tall AR, Webb NR. Dysfunctional HDL and atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol.* 2016;13(1):48-60.

- Russe OQ, Möser CV, Kynast KL, King TS, Olbrich K, Grösch S, Geisslinger G, Niederberger E. LPS inhibits caspase 3-dependent apoptosis in RAW264.7 macrophages induced by the AMPK activator AICAR. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;447(3):520-5.
- Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Denèfle P, Assmann G. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat. Genet*. 1999; 22:352–355.
- Saleheen D, Scott R, Javad S, et al. Association of HDL cholesterol efflux capacity with incident coronary heart disease events: a prospective case-control study. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2015;3(7):507-513.
- Sanders MJ, Grondin PO, Hegarty BD, Snowden MA, Carling D. Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochemical Journal*. 2007;403(Pt 1):139-148.
- Santidrián AF, González-Gironès DM, Iglesias-Serret D, Coll-Mulet L, Cosiàlls AM, de Frias M, et al. AICAR induces apoptosis independently of AMPK and p53 through up-regulation of the BH3-only proteins BIM and NOXA in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 2010;116(16):3023-427 32.
- Sarzynski MA, Burton J, Rankinen T, et al. The effects of exercise on the lipoprotein subclass profile: a meta-analysis of 10 interventions. *Atherosclerosis*. 2015;243(2):364-372.
- Sato K, Nakano K, Katsuki S, Matoba T, Osada K, Sawamura T, Sunagawa K, Egashira K. Dietary cholesterol oxidation products accelerate plaque destabilization and rupture associated with monocyte infiltration/activation via the MCP-1-CCR2 pathway in mouse brachiocephalic arteries: therapeutic effects of ezetimibe. *J Atheroscler Thromb*. 2012; 19(11):986-98.
- Shafaati M, Olin M, Båvner A, Pettersson H, Rozell B, Meaney S, Parini P, Björkhem I. Enhanced production of 24S-hydroxycholesterol is not

sufficient to drive liver X receptor target genes in vivo. *J Intern Med*. 2011; 270(4):377-87.

Shentu TP, Singh DK, Oh M-J, et al. The role of oxysterols in control of endothelial stiffness. *Journal of Lipid Research*. 2012;53(7):1348-1358.

Shimada K, Kishimoto C, Okabe TA, Hattori M, Murayama T, Yokode M, Kita T. Exercise training reduces severity of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice via nitric oxide. *Circ J*. 2007; 71(7): 1147-51.

Shirwany NA, Zou MH. AMPK: a cellular metabolic and redox sensor. A minireview. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2014; 19:447-74.

Siddiqi HK, Kiss D, Rader D. HDL-cholesterol and cardiovascular disease: rethinking our approach. *Curr Opin Cardiol*. 2015; 30(5):536-42.

Silva KS. Albumina modificada por glicação avançada e resistência insulínica em ratos: foco no tecido adiposo periepídídimo e nas ações da N-acetilcisteína [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2016

Spann NJ, Garmire LX, McDonald JG, et al. Regulated accumulation of desmosterol integrates macrophage lipid metabolism and inflammatory responses. *Cell*. 2012;151(1):138-152.

Sriwijitkamol A, Coletta DK, Wajcberg E, Balbontin GB, Reyna SM, Barrientes J, Eagan PA, et al. Effect of acute exercise on AMPK signaling in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes: a time-course and dose-response study. *Diabetes* 2007; 56(3):836-48.

Stapleton D, Mitchelhill KI, Gao G, Widmer J, Michell BJ, Teh T, House CM, Fernandez CS, Cox T, Witters LA, Kemp BE: Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. *J Biol Chem* 1996; (271):611– 614.

Staprans I, Pan XM, Rapp JH, Feingold KR. Oxidized cholesterol in the diet accelerates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 1998;18: 977–983.

- Staprans I, Pan XM, Rapp JH, Grunfeld C, Feingold KR. Oxidized cholesterol in the diet accelerates the development of atherosclerosis in LDL receptor- and apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20(3):708-14.
- Staprans I, Pan XM, Rapp JH, Feingold KR. Oxidized cholesterol in the diet is a source of oxidized lipoproteins in human serum. *J Lipid Res.* 2003; 44(4):705-15.
- Staprans I, Pan XM, Rapp JH, Moser AH, Feingold KR. Ezetimibe inhibits the incorporation of dietary oxidized cholesterol into lipoproteins. *J Lipid Res.* 2006; 47(11):2575-80.
- Staprans I, Rapp JH, Pan XM, Feingold KR. Oxidized lipids in the diet are incorporated by the liver into very low density lipoprotein in rats. *J Lipid Res.* 1996;37(2):420-30.
- Steinberg D, Witztum JL. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Dez; 30(12):2311-6.
- Stephens TJ, Chen ZP, Canny BJ, Michell BJ, Kemp BE, McConell GK. Progressive increase in human skeletal muscle AMPK α 2 activity and ACC phosphorylation during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282(3):E688-94.
- Sun LP, Seemann J, Brown MS, Goldstein JL. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007; 104:6519–6526.
- Tabas I. 2016 Russell Ross Memorial Lecture in Vascular Biology: Molecular-Cellular Mechanisms in the Progression of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016; 37:1-7
- Takekoshi K, Fukuhara M, Quin Z, Nissato S, Isobe K, Kawakami Y, Ohmori H. Long-term exercise stimulates adenosine monophosphate-activated

- protein kinase activity and subunit expression in rat visceral adipose tissue and liver. *Metabolism*. 2006 ;55(8):1122-8.
- Tam SP, Mok L, Chimini G, Vasa M, Deeley RG. ABCA1 mediates high-affinity uptake of 25-hydroxycholesterol by membrane vesicles and rapid efflux of oxysterol by intact cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;291(3):C490-502.
- Tani M, Horvath KV, Lamarche B, Couture P, Burnett JR, Schaefer EJ, Asztalos BF. High-density lipoprotein subpopulation profiles in lipoprotein lipase and hepatic lipase deficiency. *Atherosclerosis*. 2016; 253:7-14.
- Tarling EJ, Bojanic DD, Tangirala RK, et al. Impaired Development of Atherosclerosis in *Abcg1*^{-/-}*-Apoe*^{-/-} Mice; Identification of Specific Oxysterols that both Accumulate in *Abcg1*^{-/-}*-Apoe*^{-/-} Tissues and Induce Apoptosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(6):1174-1180.
- Teixeira PSA, Monteiro ICCR, Lima TI, Santos ACCS, Ceccatto VM. Prescription of Aerobic Exercise Training Based on the Incremental Load Test: A Model of Anaerobic Threshold for Rats. *Journal of Exercise Physiology online* 2012; 15(3):45-52.
- Terasaka N, Wang N, Yvan-Charvet L, Tall AR. High-density lipoprotein protects macrophages from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by promoting efflux of 7-ketocholesterol via ABCG1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(38): 15093-8.
- The Emerging Risk Factors Collaboration. Major Lipids, Apolipoproteins, and Risk of Vascular Disease. *JAMA*. 2009; 302(18):1993-2000.
- Trevisi L, Bertoldo A, Agnoletto L, Poggiani C, Cusinato F, Luciani S. Antiapoptotic and proliferative effects of low concentrations of 7 β -hydroxycholesterol in human endothelial cells via ERK activation. *J Vasc Res*. 2010;47(3):241-51.

- Tsekouras YE, Magkos F, Kellas Y, et al. High-intensity interval aerobic training reduces hepatic very low-density lipoprotein-triglyceride secretion rate in men. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008; 295:E851–858.
- Uno Y, Hosaka S, Yamazaki H. Identification and Analysis of CYP7A1, CYP17A1, CYP20A1, CYP27A1 and CYP51A1 in Cynomolgus Macaques. *The Journal of Veterinary Medical Science.* 2014;76(12):1647-1650.
- Vaya J, Aviram M, Mahmood S, Hayek T, Grenadir E, Hoffman A, Milo S. Selective distribution of oxysterols in atherosclerotic lesions and human plasma lipoproteins. *Free Radic Res.* 2001;34(5):485-97.
- Vine DF, Croft KD, Beilin LJ, Mamo JC. Absorption of dietary cholesterol oxidation products and incorporation into rat lymph chylomicrons. *Lipids.* 1997;32:887.
- Virginio VW, Nunes VS, Moura FA, Menezes FH, Andreollo NA, Rogerio F, et al. Arterial tissue and plasma concentration of enzymatic-driven oxysterols are associated with severe peripheral atherosclerotic disease and systemic inflammatory activity. *Free Radic Res.* 2015; 49(2):199-203.
- Vlahcevic ZR, Pandak WM, Stravitz RT. Regulation of bile acid biosynthesis. *Gastroenterol Clin North Am.* 1999;28(1):1-25.
- Vurusaner B, Gamba P, Testa G, Gargiulo S, Biasi F, Zerbinati C, et al. Survival signaling elicited by 27-hydroxycholesterol through the combined modulation of cellular redox state and ERK/Akt phosphorylation. *Free Radic Biol Med.* 2014;77:376-85.
- Wen Y, Leake DS. Low density lipoprotein undergoes oxidation within lysosomes in cells. *Circ Res.* 2007;100(9):1337-43.
- Wojtaszewski JF, Mourtzakis M, Hillig T, Saltin B, Pilegaard H. Dissociation of AMPK activity and ACCbeta phosphorylation in human muscle during

- prolonged exercise. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 ;298(3):309-16.
- Wu Q, Ishikawa T, Sirianni R, et al. 27-Hydroxycholesterol Promotes Cell-autonomous ER-positive Breast Cancer Growth. *Cell reports.* 2013;5(3):637-645.
- Xiao B, Sanders MJ, Underwood E, Heath R, Mayer FV, Carmena D, et al. Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* 2011;472(7342):230-3.
- Zhao XQ, Phan BA, Davis J, Isquith D, Dowdy AA, Boltz S, et al. Mortality reduction in patients treated with long-term intensive lipid therapy: 25-year follow-up of the Familial Atherosclerosis Treatment Study-Observational Study. *J Clin Lipidol.* 2016;10(5):1091-7.
- Zhong W, Pan G¹, Wang L¹, Li S, Ou J, Xu M, Li J, Zhu B, Cao X, Ma H, Li C, Xu J, Olkkonen VM, Staels B, Yan D. ORP4L Facilitates Macrophage Survival via G-Protein-Coupled Signaling: ORP4L^{-/-} Mice Display a Reduction of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;119(12):1296-1312.