THEMIS MOURA CARDINOT

**Efeito do treinamento físico aeróbico na
prevenção e terapêutica da doença aterosclerótica
em modelo experimental de aterosclerose**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Emergências Clínicas
Orientador: Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza

São Paulo
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Cardinot, Themis Moura

Efeito do treinamento físico aeróbico na prevenção e terapêutica da doença aterosclerótica em modelo experimental de aterosclerose / Themis Moura Cardinot. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Emergências Clínicas.

Orientador: Heraldo Possolo de Souza.

Descritores: 1.Aterosclerose/prevenção & controle 2.Aterosclerose/terapia
3.Exercício 4.Camundongos Knockout

USP/FM/SBD-364/08

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe e ao meu pai.

Mãe, obrigada pelo apoio, pelas orações e por fazer o impossível para me ajudar.

Pai, admiro você pela sua inteligência, pela sua organização, pela sua disciplina, pela sua lealdade, pelos seus valores éticos e morais, pela sua dedicação ao trabalho, pelo seu amor à família e pelo ser humano carinhoso que você é. Obrigada por ser Pai e me educar sempre pelo exemplo. Muito obrigada por acreditar em mim e por me apoiar durante todos esses anos aqui em São Paulo.

Essa vitória é de vocês também!
Com todo o meu amor, sua filha.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza, pela oportunidade e orientação.

À Prof^a Dra. Patrícia Chakur Brum, pela colaboração no treinamento dos camundongos, aferição da frequência cardíaca e pressão arterial caudal.

À Prof^a Dra. Marta Helena Krieger, pela colaboração na morfometria das placas ateroscleróticas.

À Prof^a Dra. Patrícia Miralda Cazita, pela colaboração na dosagem dos lípides plasmáticos, pelas sugestões, pelo apoio e carinho.

Aos Professores Dr. Éder Quintão, Dra. Marisa Passarelli e Dra. Edna Nakandakare, pelas sugestões, pelo apoio e carinho.

À Prof^a Dra. Selene Elíffio Esposito, pela ajuda na redação final da tese, pela amizade e pelo carinho.

Ao Prof. Dr. Clóvis Frimm, pelo apoio e pela ajuda na redação final da tese.

Ao Prof. Dr. Edmundo Arteaga, pelo incentivo, pelo apoio e pelo carinho.

Ao Dr. Sérgio Catanozi, pelo auxílio na obtenção dos camundongos e pelo carinho.

À Dra. Márcia K. Koike, pelo auxílio nos procedimentos cirúrgicos e com o analisador de imagens.

À Dra. Ana Iochabel Soares Moretti, pelo auxílio nos procedimentos cirúrgicos e nas dosagens dos marcadores inflamatórios circulantes.

À Dra. Valéria S. Nunes, pelo auxílio na dosagem dos lípides plasmáticos, pelo apoio e carinho.

À Katt Mattos, pelo auxílio com os testes progressivos máximos, com as aferições de frequência cardíaca e de pressão arterial dos camundongos.

À Fátima Abatepaulo, pela imunohistoquímica dos marcadores inflamatórios da placa aterosclerótica.

À Amarylis C. B. A. Wanschel, pela ajuda com a morfometria das placas.

À Sueli, Denise, Kelli e Geraldo, por terem proporcionado as condições adequadas ao desenvolvimento deste projeto.

À Juliana Rangel-de-Oliveira, pela ajuda com o tratamento digital das imagens, com a organização das tabelas e planilhas; e por ser mostrar sempre disposta a ajudar.

À Regina Fernandes Costa, pelas boas sugestões textuais e pelo carinho.

Ao Walter Cascardo, pelo apoio e carinho nesta etapa final.

Aos Professores Afonso Moniz-de-Aragão e Luciano Alves Favorito, pelo incentivo ainda na graduação, que tornou possível alcançar esta etapa tão importante em minha vida profissional. Obrigada por terem sido Mestres! Obrigada pela confiança e amizade.

À minha família e amigos, por acreditarem em mim, pelo apoio e carinho.

Aos camundongos, que deram suas vidas para a realização deste projeto.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de pesquisa.

“Tudo o que fizerdes, fazei-o apaixonadamente
e tudo o mais vos será dado por acréscimo.”

Johann Wolfgang Von Goethe

Esta tese 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. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

SUMÁRIO

A. INTRODUÇÃO	1
A.1. Aterosclerose: epidemiologia e relevância	1
A.2. Fatores de Risco	2
A.3. Fisiopatologia da Aterosclerose	3
A.3.1. Placas estáveis e instáveis	5
A.4 Aterosclerose e Marcadores Inflamatórios	6
A.4.1. Fator de Necrose Tumoral	7
A.4.2. Interleucina 6	7
A.4.3. Via de Sinalização CD40/CD40L	8
A.5. Aterosclerose e Exercício Físico	9
A.6. Justificativa	10
B. OBJETIVOS	12
B.1. Objetivo Geral	12
B.2. Objetivos Específicos	12
C. MÉTODOS	13
C.1. Comissão de Ética	13
C.2. Local	13
C.3. Modelo Animal	14
C.4. Desenho Experimental	15
C.5. Dieta	16
C.6. Programa de Treinamento Físico Aeróbico	16
C.7. Coleta de Material para Análise	18
C.8. Morfometria da Placa Aterosclerótica	19
C.8.1. Tamanho e Conteúdo de Gordura da Placa	19
C.8.2. Conteúdo de Colágeno da Placa	21

C.9. Medida dos Fatores de Risco	22
C.9.1. Massa Corporal	22
C.9.2. Pressão Arterial Caudal	23
C.9.3. Colesterol Total e Frações	24
C.10. Marcadores Inflamatórios Circulantes	25
C.10.1. Citocinas Plasmáticas TNF- α e IL-6	25
C.10.2. Atividade da MMP-9 Plasmática	26
C.11. Marcadores Inflamatórios Teciduais	27
C.12. Análise Estatística	30
D. RESULTADOS	32
D.1. Programa Preventivo	32
D.1.1. Morfometria da Placa Aterosclerótica	34
D.1.2. Fatores de Risco	39
D.1.3. Marcadores Inflamatórios Circulantes	43
D.1.4. Marcadores Inflamatórios Teciduais	45
D.2. Programa Terapêutico	50
D.2.1. Morfometria da Placa Aterosclerótica	52
D.2.2. Fatores de Risco	57
D.2.3. Marcadores Inflamatórios Circulantes	61
D.2.4. Marcadores Inflamatórios Teciduais	63
E. DISCUSSÃO	68
F. CONCLUSÕES	77
Referências Bibliográficas	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHA	American Heart Association
AVC	Acidente Vascular Cerebral
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DAC	Doença Arterial Coronariana
DATASUS	Banco de Dados do Sistema Unificado de Saúde
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FC	Frequência Cardíaca
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography – Cromatografia Líquida
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
ICAM-1	Moléculas de Adesão Intracelular-1
IL-6	Interleucina-6
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LDLr-/-	Deficiência para o receptor de LDL
MCP-1	Proteína Quimiotática de Monócitos-1
MMP-9	Metalloproteinase-9
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Pressão Arterial
SHR	Ratos Espontaneamente Hipertensos
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-Alpha
UFAW	The Universities Federation for Animals Welfare
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Grupos experimentais do programa preventivo	15
Tabela 2:	Grupos experimentais do programa terapêutico	15
Tabela 3:	Característica da amostra no início do programa preventivo ...	32
Tabela 4:	Característica da amostra do programa terapêutico ao iniciar o treinamento físico	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Fotografia de camundongos LDLr-/- durante uma sessão de treinamento físico aeróbico em esteira rolante	17
Figura 2:	Fotografia representativa do coração, aorta ascendente e arco aórtico dissecados <i>in situ</i>	19
Figura 3:	Fotografia de camundongos LDLr-/- durante o registro da pressão arterial caudal	24
Figura 4:	Velocidade máxima atingida no teste máximo pré e pós programa preventivo nos grupos dieta normal exercitado (Nex) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	33
Figura 5:	Frequência cardíaca pré e pós programa preventivo nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	34
Figura 6:	Tamanho da placa aterosclerótica ao final do programa preventivo nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	35
Figura 7:	Fotomicrografias de uma secção transversal da aorta ascendente ao nível da valva da aorta. Observa-se o tamanho e o conteúdo de gordura na placa aterosclerótica representativa dos grupos (A) dieta aterogênica sedentário (Ased) e (B) dieta aterogênica exercitado (Aex) ao final do programa preventivo	35
Figura 8:	Percentual de gordura na placa aterosclerótica ao final do programa preventivo nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	36
Figura 9:	Percentual de colágeno na placa aterosclerótica ao final do programa preventivo nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	37
Figura 10:	Fotomicrografias de uma secção longitudinal do arco aórtico representativa do grupo dieta aterogênica sedentário (Ased) ao final do programa preventivo. Em A, observa-se o conteúdo de colágeno na placa aterosclerótica. Em B, sob luz polarizada, observa-se o conteúdo de colágeno na placa aterosclerótica	38

Figura 11: Fotomicrografias de uma secção longitudinal do arco aórtico representativa do grupo dieta aterogênica exercitado (Aex) ao final do programa preventivo. Em A, observa-se o conteúdo de colágeno na placa aterosclerótica. Em B, sob luz polarizada, observa-se o conteúdo de colágeno na placa aterosclerótica	38
Figura 12: Massa corporal ao final do programa preventivo nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	39
Figura 13: Pressão arterial caudal ao final do programa preventivo nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	40
Figura 14: Colesterol total plasmático ao final do programa preventivo nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	41
Figura 15: Perfil das frações de lipoproteínas ao final do programa preventivo nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	42
Figura 16: Percentual das frações de lipoproteínas ao final do programa preventivo nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	42
Figura 17: TNF-alfa plasmático ao final do programa preventivo nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	43
Figura 18: IL-6 plasmático ao final do programa preventivo nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	44
Figura 19: Atividade da MMP-9 plasmática ao final do programa preventivo nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	45

Figura 20: Zimograma representativo da atividade da MMP-9 plasmática ao final do programa preventivo nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	45
Figura 21: Expressão de MMP-9 na placa aterosclerótica ao final do programa preventivo nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	46
Figura 22: Fotomicrografias de uma secção longitudinal do arco aórtico. Observa-se a expressão de MMP-9 na placa aterosclerótica representativa dos grupos (A) dieta aterogênica sedentário (Ased) e (B) dieta aterogênica exercitado (Aex) ao final do programa preventivo	46
Figura 23: Expressão de CD40 na placa aterosclerótica ao final do programa preventivo nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	47
Figura 24: Fotomicrografias de uma secção longitudinal do arco aórtico. Observa-se a expressão de CD40 na placa aterosclerótica representativa dos grupos (A) dieta aterogênica sedentário (Ased) e (B) dieta aterogênica exercitado (Aex) ao final do programa preventivo	47
Figura 25: Expressão de CD40L na placa aterosclerótica ao final do programa preventivo nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	48
Figura 26: Fotomicrografias de uma secção longitudinal do arco aórtico. Observa-se a expressão de CD40L na placa aterosclerótica representativa dos grupos (A) dieta aterogênica sedentário (Ased) e (B) dieta aterogênica exercitado (Aex) ao final do programa preventivo	48
Figura 27: Formação de nitrotirosina na placa aterosclerótica ao final do programa preventivo nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	49
Figura 28: Fotomicrografias de uma secção longitudinal do arco aórtico. Observa-se a formação de nitrotirosina na placa aterosclerótica representativa dos grupos (A) dieta aterogênica sedentário (Ased) e (B) dieta aterogênica exercitado (Aex) ao final do programa preventivo	49

Figura 29:	Velocidade máxima atingida no teste máximo pré e pós programa terapêutico nos grupos dieta normal exercitado (Nex) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	51
Figura 30:	: Frequência cardíaca pré e pós programa terapêutico nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	52
Figura 31:	Tamanho da placa aterosclerótica ao final do programa terapêutico nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	53
Figura 32:	Fotomicrografias de uma secção transversal da aorta ascendente ao nível da valva da aorta. Observa-se o tamanho e o conteúdo de gordura na placa aterosclerótica representativa dos grupos (A) dieta aterogênica sedentário (Ased) e (B) dieta aterogênica exercitado (Aex) ao final do programa terapêutico	53
Figura 33:	Percentual de gordura na placa aterosclerótica ao final do programa terapêutico nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	54
Figura 34:	Percentual de colágeno na placa aterosclerótica ao final do programa terapêutico nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	55
Figura 35:	Fotomicrografias de uma secção longitudinal do arco aórtico representativa do grupo dieta aterogênica sedentário (Ased) ao final do programa terapêutico. Em A, observa-se o conteúdo de colágeno na placa aterosclerótica. Em B, sob luz polarizada, observa-se o conteúdo de colágeno na placa aterosclerótica	56
Figura 36:	Fotomicrografias de uma secção longitudinal do arco aórtico representativa do grupo dieta aterogênica exercitado (Aex) ao final do programa terapêutico. Em A, observa-se o conteúdo de colágeno na placa aterosclerótica. Em B, sob luz polarizada, observa-se o conteúdo de colágeno na placa aterosclerótica	56
Figura 37:	Massa corporal ao final do programa terapêutico nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	57

Figura 38: Pressão arterial caudal ao final do programa terapêutico nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	58
Figura 39: Colesterol total plasmático ao final do programa terapêutico nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	59
Figura 40: Perfil das frações de lipoproteínas ao final do programa terapêutico nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	60
Figura 41: Percentual das frações de lipoproteínas ao final do programa terapêutico nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	60
Figura 42: TNF-alfa plasmático ao final do programa terapêutico nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	61
Figura 43: IL-6 plasmático ao final do programa terapêutico nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	62
Figura 44: Atividade da MMP-9 plasmática ao final do programa terapêutico nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	63
Figura 45: Zimograma representativo da atividade da MMP-9 plasmática ao final do programa terapêutico nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	63
Figura 46: Expressão de MMP-9 na placa aterosclerótica ao final do programa terapêutico nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex)	64
Figura 47: Fotomicrografias de uma secção longitudinal do arco aórtico. Observa-se a expressão de MMP-9 na placa aterosclerótica representativa dos grupos (A) dieta aterogênica sedentário (Ased) e (B) dieta aterogênica exercitado (Aex) ao final do programa terapêutico	64

- Figura 48:** Expressão de CD40 na placa aterosclerótica ao final do programa terapêutico nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex) 65
- Figura 49:** Fotomicrografias de uma secção longitudinal do arco aórtico. Observa-se a expressão de CD40 na placa aterosclerótica representativa dos grupos (A) dieta aterogênica sedentário (Ased) e (B) dieta aterogênica exercitado (Aex) ao final do programa terapêutico 65
- Figura 50:** Expressão de CD40L na placa aterosclerótica ao final do programa terapêutico nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex) 66
- Figura 51:** Fotomicrografias de uma secção longitudinal do arco aórtico. Observa-se a expressão de CD40L na placa aterosclerótica representativa dos grupos (A) dieta aterogênica sedentário (Ased) e (B) dieta aterogênica exercitado (Aex) ao final do programa terapêutico 66
- Figura 52:** Formação de nitrotirosina na placa aterosclerótica ao final do programa terapêutico nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex) 67
- Figura 53:** Fotomicrografias de uma secção longitudinal do arco aórtico. Observa-se a formação de nitrotirosina na placa aterosclerótica representativa dos grupos (A) dieta aterogênica sedentário (Ased) e (B) dieta aterogênica exercitado (Aex) ao final do programa terapêutico 67

RESUMO

Cardinot TM. Efeito do treinamento físico aeróbico na prevenção e terapêutica da doença aterosclerótica em modelo experimental de aterosclerose [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 90p.

O conhecimento de que o exercício é benéfico na doença aterosclerótica é baseado principalmente em estudos epidemiológicos. O objetivo deste trabalho foi investigar se o treinamento físico preventivo ou terapêutico altera a evolução da placa aterosclerótica. Camundongos LDLr^{-/-} com 16 semanas de vida foram separados em dois programas: preventivo e terapêutico. Animais do programa preventivo receberam dieta normal ou aterogênica por 14 semanas. O treinamento físico foi iniciado concomitantemente ao início da dieta. Animais do programa terapêutico receberam dieta normal ou aterogênica por 28 semanas. O treinamento físico foi iniciado após 14 semanas do início da dieta, com placas bem estabelecidas. O treinamento físico aeróbico moderado foi realizado em esteira rolante, por 60 min, 5 dias/sem, durante 14 semanas. Massa corporal, pressão arterial caudal e frequência cardíaca foram registradas. Lipoproteínas plasmáticas foram separadas por FPLC e colesterol total foi dosado por métodos enzimáticos. Foram quantificados tamanho, conteúdo de gordura e de colágeno da placa por coloração de oil-red O e picro-sirius. Citocinas TNF- α , IL-6 foram medidas por Elisa. MMP-9 plasmática foi medida por zimografia. Marcadores inflamatórios teciduais, MMP-9, CD40/CD40L e nitrotirosina, foram medidos na placa por imunohistoquímica. O treinamento físico não modificou o tamanho da placa, mas tornou a placa mais estável por aumentar o conteúdo de colágeno. O treinamento físico diminuiu o conteúdo de gordura da placa, os fatores de risco e o CD40 somente no programa preventivo. Nenhuma alteração foi notada nos marcadores inflamatórios circulantes e na expressão de MMP-9 e formação de nitrotirosina na placa aterosclerótica.

Descritores: 1.Aterosclerose/prevenção & controle 2.Aterosclerose/terapia 3.Exercício 4.Camundongos Knockout

SUMMARY

Cardinot TM. Role of aerobic physical training in atherosclerotic disease prevention and treatment in an experimental model of atherosclerosis [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 90p.

The knowledge that exercise exerts beneficial effects on atherosclerotic disease is mainly based on epidemiological studies. Our aim was to investigate the effect of preventive and therapeutic exercise programs on atherosclerotic plaque formation and development. Sixteen-week-old LDLr^{-/-} mice were randomly divided into preventive and therapeutic programs. Preventive program's mice received normal or atherogenic diet for 14 weeks. Exercise training started at the same time of dieting. Therapeutic program's mice received normal or atherogenic diet for 28 weeks. Exercise training started after 14 weeks of dieting when atherosclerosis plaques were already established. Moderate intensity aerobic exercise training was performed on a motor treadmill for 60 min, 5 days/wk, during 14 weeks. Body mass, caudal blood pressure and heart rate were registered. Plasma lipoproteins were separated by FPLC and total cholesterol was determined by enzymatic methods. Cross sections of aortic root were stained with oil-red O for plaque size and fat content. Aorta longitudinal sections were stained with picro-sirius for collagen content. TNF- α and IL-6 cytokines were measured by Elisa. Plasmatic MMP-9 was determined by zimography. Inflammatory tissue markers, MMP-9, CD40/CD40L and nitrotyrosine, were measured by immunohistochemistry. We concluded that exercise training did not modify plaque size, but turned it into a more stable one by increasing its collagen content. Exercise training reduced plaque fat content, risk factors and plaque CD40 expression only in the preventive program. No difference in systemic inflammatory markers, and in plaque MMP-9 expression and nitrotyrosine formation was noted.

Descriptors: 1.Atherosclerosis/prevention & control 2.Atherosclerosis/therapy 3.Exercise 4.Mice, Knockout

A. INTRODUÇÃO

A.1. Aterosclerose: epidemiologia e relevância.

As doenças cardiovasculares representam uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo ocidental. Nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, como o Brasil, a aterosclerose é a principal causa de doenças e óbitos na população acima de 50 anos. Segundo o Banco de Dados do Sistema Unificado de Saúde (DATASUS), no ano de 2000, cerca de 27,5% do total de óbitos ocorreram por causas cardiovasculares, sendo que desse total 33% foram em consequência de acidente vascular cerebral (AVC) e 30% pela doença arterial coronariana (DAC). Além dos elevados índices de mortalidade, ambas as doenças são importante causa de morbidade e incapacidade [1].

Devido à sua alta prevalência e ao alto custo do tratamento, o impacto das doenças cardiovasculares nas despesas públicas com a saúde é importante. Em 2000, as doenças cardiovasculares foram responsáveis pela movimentação financeira de recursos públicos de, aproximadamente, 900 milhões de dólares em hospitalização no Brasil, representando a 3ª causa de permanência hospitalar prolongada. Só entre 1991 e 2000, os custos hospitalares no país, atribuídos às doenças cardiovasculares aumentaram 176%. O mais preocupante é que, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o aumento na incidência das doenças cardiovasculares tende

a persistir, agravando as condições de saúde dos países em desenvolvimento [1, 2].

A.2. Fatores de Risco

Diversos fatores aumentam o risco para a doença aterosclerótica, entre os mais estudados estão: as dislipidemias, a hipertensão arterial, o diabetes melito, a obesidade, o tabagismo e o sedentarismo. Além disso, complicações da doença aterosclerótica são mais comuns em idosos, em indivíduos do sexo masculino, em mulheres após a menopausa e em indivíduos com histórico familiar de DAC [3-5].

Um dos primeiros fatores de risco identificado para a doença aterosclerótica foram as dislipidemias, que resultam de alterações no metabolismo das lipoproteínas, partículas circulantes formadas por lípidos e proteínas, responsáveis pelo transporte dos lípidos no plasma. As dislipidemias são consideradas como fator de risco independente para a doença aterosclerótica e importante indicador de doença isquêmica coronariana, principalmente quando ocorre aumento nos níveis circulantes das lipoproteínas de baixa densidade, LDL e VLDL. As lipoproteínas de baixa densidade modificadas por ação enzimática ou oxidativa parecem estar no cerne dos mecanismos desencadeantes da formação das placas ateroscleróticas [5-7].

A.3. Fisiopatologia da Aterosclerose

Por muitos anos a aterosclerose foi considerada um processo de deposição passiva de lípidos na parede vascular, de forma irregular, determinando graus variados de estenose vascular. Essa visão da aterogênese tem sido revista em favor de um processo dinâmico em que inúmeros mediadores inflamatórios têm sido identificados como diretamente relacionados não apenas à instalação e progressão, mas também com a instabilização da placa aterosclerótica [8-10]. A hipótese mais aceita atualmente para explicar a gênese da doença aterosclerótica sugere que fatores genéticos e ambientais colaboram para que ocorra inicialmente um desequilíbrio na sinalização redox na parede vascular. Esse desequilíbrio redox induz a formação de lípidos oxidados no espaço subendotelial e à diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico [9, 11, 12].

Esse desequilíbrio na sinalização redox gera um ambiente pró-oxidante no espaço subendotelial. Os lípidos circulantes, em especial as partículas de LDL, cruzam a camada endotelial com facilidade, ao encontrarem este ambiente pró-oxidante, as partículas de LDL sofrem modificações oxidativas e ficam retidas no espaço subendotelial, onde passam a ter maior dificuldade de retornar à circulação. A LDL modificada, retida no espaço subendotelial, provoca uma reação inflamatória local, com migração de células do sistema imune, geração de mediadores e espécies reativas de oxigênio, de maneira que mais LDL pode sofrer modificação, perpetuando o processo. Além disso, a LDL modificada favorece a liberação

de citocinas que estimulam a diferenciação dos monócitos que migraram para a camada subendotelial em macrófagos, que fagocitam as LDL modificadas transformando-se em células espumosas. As LDL modificadas funcionam como antígenos para esses macrófagos, levando-os a liberarem mais quimiocinas, que recrutam mais macrófagos e citocinas dando início a um processo inflamatório local [11, 13-15].

Por outro lado, a menor atividade do NO na parede vascular está associada ao aumento das moléculas de adesão intracelular (ICAM-1), moléculas de adesão das células vasculares (VCAM-1), P-selectina, E-selectina, fator estimulador de macrófagos e expressão da proteína quimiotática de monócitos (MCP-1). Estes mediadores promovem o recrutamento de linfócitos T e a migração de monócitos para a camada subendotelial. A diminuição do NO é mais evidente em regiões da parede arterial onde o fluxo sanguíneo é mais turbulento, gerando menor *shear stress*. Esse fenômeno explica o fato da localização preferencial das placas ateroscleróticas serem nas regiões de bifurcação dos vasos, onde ocorre maior turbulência no fluxo sanguíneo [12, 13]

Paralelamente, os macrófagos infiltrados na parede vascular entram em apoptose, ocorre migração de células musculares lisas vasculares e deposição de colágeno com o objetivo de circunscrever essa área de necrose, liberando mais substâncias capazes de perpetuar a inflamação. O resultado final é a formação da placa aterosclerótica ou ateroma, que pode se desenvolver por décadas e nunca causar qualquer tipo de sintoma. Em situações especiais, e até o momento não completamente esclarecidas,

pode ocorrer ruptura na integridade dessa placa, com exposição do seu conteúdo à corrente sanguínea e/ou aumento da expressão de fatores pró-coagulantes. Ocorre então, trombose intravascular local, com oclusão do vaso e aparecimento de sintomas isquêmicos, cuja intensidade e clínica dependem da região e calibre do vaso afetado [8-10].

A.3.1. Placas instáveis e estáveis

A placa aterosclerótica é formada por uma variedade de células inflamatórias, matriz extracelular, células musculares lisas, fibroblastos e gordura intracelular na forma de células espumosas e depósitos de cálcio. A ruptura da placa não está relacionada ao tamanho ou ao grau de estenose vascular, mas sim às características morfológicas da placa [10, 16, 17].

A placa instável, ou vulnerável, mais propensa à ruptura, se caracteriza por uma capa fibrosa tênue envolvendo um núcleo necrótico abundante em gordura e em células inflamatórias, com colágeno e células musculares lisas escassos e com atividade das metaloproteinases aumentada. A região mais propensa à ruptura é a transição entre a placa e a parede vascular normal. Diante da ruptura nas artérias coronárias, ocorrem as síndromes coronárias agudas (infarto agudo do miocárdio, angina instável); nos vasos cerebrais (carótidas e seus ramos), os acidentes vasculares cerebrais e episódios isquêmicos transitórios [3, 4, 16].

Em contrapartida, as placas estáveis, com menor probabilidade de desencadearem síndromes isquêmicas agudas, caracterizam-se por uma

maior deposição de colágeno e de células musculares lisas, compondo uma capa fibrosa espessa, escassas células inflamatórias e conteúdo de gordura menos proeminente. A placa estável, com estenose fixa, está associada à angina estável crônica [3, 4, 16].

Embora essas características morfológicas tenham sido descritas em humanos, também podem ser observadas nas placas ateroscleróticas formadas em modelos animais de aterosclerose. Pelo fato de não existir um modelo animal facilmente reprodutível de ruptura espontânea da placa, somos obrigados a inferir indícios da probabilidade de ruptura através da análise histológica e molecular dos segmentos arteriais comprometidos pela lesão aterosclerótica [18, 19]. Apesar de imperfeito esse método é amplamente utilizado e aceito pela comunidade científica.

A.4 Aterosclerose e Marcadores Inflamatórios

A inflamação parece ter papel importante na fisiopatologia da aterosclerose e nos mecanismos envolvidos com a ruptura da placa aterosclerótica. Estudos clínicos comprovaram o valor de mediadores inflamatórios circulantes no prognóstico de complicações da doença, como, por exemplo, nas síndromes coronárias agudas [20-22].

A.4.1. Fator de Necrose Tumoral (TNF- α)

O TNF- α é uma proteína de 17,5 kDa, com 157 aminoácidos e é um dos principais componentes da grande família das citocinas. O TNF- α é produzido essencialmente por monócitos, macrófagos, células T, neutrófilos e células NK. É uma das primeiras citocinas liberadas no sítio de inflamação e um potente indutor dos mecanismos de defesa imunológica e mediador do recrutamento leucocitário [23].

Na formação da placa aterosclerótica, o TNF- α estimula a diferenciação dos monócitos que migraram para a camada subendotelial transformando-os em macrófagos. O TNF- α também pode estar envolvido nos mecanismos que levam à ruptura da placa. Foram observados aumentos de TNF- α circulantes em pacientes com infarto agudo do miocárdio [23, 24]

A.4.2. Interleucina 6 (IL-6)

A IL-6 é uma glicoproteína de 21 a 28 kDa, produzida por células T, células B, monócitos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e tumorais, entre outras. Tem importante função na resposta inflamatória inicial e na amplificação da cascata inflamatória. A IL-6 participa da imunidade celular e humoral. Estimula a proliferação e a diferenciação de linfócitos T em linfócitos T citotóxicos. Também induz a diferenciação dos linfócitos B e estimula a produção de imunoglobulinas [22, 25].

Assim como o TNF- α , a IL-6 também está relacionada com a instabilidade da placa aterosclerótica e as síndromes isquêmicas agudas. Existe uma associação dos níveis plasmáticos de IL-6 com a evolução da doença aterosclerótica. Ocorre elevação da IL-6 em pacientes com angina instável quando comparado a pacientes sem instabilidade da placa [26-28].

A.4.3. A Via de Sinalização CD40/CD40L

O CD40 é um receptor de membrana, descrito inicialmente em linfócitos B. É também expresso em macrófagos, células dendríticas, células endoteliais e células musculares lisas vasculares. O CD40 e seu ligante, CD154 ou CD40L, participam tanto da patogênese da placa aterosclerótica, quanto da sua ruptura [29-31].

A ativação da via de sinalização CD40/CD40L promove a manutenção do processo inflamatório por meio da geração de citocinas e da expressão de moléculas de adesão. A ligação CD40/CD40L também aumenta a expressão e a atividade de metaloproteinases. Os aumentos da expressão e da atividade desta via de sinalização estão envolvidos com a ruptura da placa aterosclerótica [32-34].

Tal como as citocinas, TNF- α e IL-6, o CD40L no sangue periférico está relacionado com quadros de angina instável [35-37]. Ohashi et al. [38] detectaram um aumento da fração solúvel de CD40L no sangue periférico de pacientes após infarto agudo do miocárdio, quando comparado com pacientes com angina estável, ou sem doença cardíaca.

A.5. Aterosclerose e Exercício Físico

O treinamento físico é benéfico para o controle dos fatores de risco, sendo recomendado como principal medida não farmacológica, tanto na prevenção quanto no tratamento das doenças cardiovasculares. Diversos programas de reabilitação cardíaca se baseiam nestas estratégias de prevenção e de tratamento associadas ao exercício físico regular [39-41]. No entanto, o papel do treinamento físico na formação e na evolução da placa aterosclerótica foi pouco estudado.

Os efeitos benéficos do treinamento físico são mediados por mecanismos complexos: hemodinâmicos, inflamatórios e metabólicos. Um exemplo dessa complexidade é o efeito do exercício sobre a sinalização redox. Durante o exercício aeróbico intenso ocorre aumento do consumo de oxigênio, que está associado a um aumento do estresse oxidativo circulante e tecidual, detectado através do aumento de peróxidos lipídicos no plasma e da LDL oxidada [42-45].

Liu ML et al. (1999) [46] demonstraram em maratonistas que o aumento da LDL modificada por oxidação pode permanecer por até quatro dias após a corrida. O aumento da eletronegatividade da LDL é decorrência da maior concentração de ácidos graxos livres que ocorre durante o exercício físico intenso [45]. Paradoxalmente, o aumento da LDL oxidada pode ser detectada em pacientes com doença aterosclerótica. Não obstante, atletas em treinamento possuem perfil de antioxidantes plasmáticos melhor do que indivíduos sedentários [47, 48]. Ainda, após exercício físico intenso

foi documentado aumento de antioxidantes plasmáticos e celulares [49, 50]. É possível que o estresse oxidativo causado pelo exercício físico esteja limitado à atividade intensa por curto prazo, enquanto que mecanismos de defesa antioxidantes prevaleçam em longo prazo.

Meilhac et al. (2001) [51] observaram aumento do estresse oxidativo plasmático, induzido pelo exercício físico aeróbico em camundongos hipercolesterolêmicos, o qual, no entanto, foi acompanhado por elevação das defesas antioxidantes na parede arterial, em particular, as enzimas catalase e óxido nítrico sintase. Napoli et al. [52] (2004) testaram a hipótese de que o exercício físico graduado e moderado aliado a uma intervenção metabólica poderia contribuir para a proteção vascular em camundongos hipercolesterolêmicos. O treinamento físico moderado diminuiu os níveis de colesterol e preveniu a progressão das placas ateroscleróticas. A suplementação de antioxidantes e L-arginina nos camundongos hipercolesterolêmicos exercitados foi ainda mais eficaz.

Embora importantes esses dados não são conclusivos e a integração do exercício físico com os marcadores inflamatórios nesses modelos experimentais de aterosclerose ainda não foi documentada.

A.6. Justificativa e Hipótese

O efeito do treinamento físico na prevenção e no tratamento das doenças cardiovasculares ateroscleróticas é reconhecido. No entanto, a ação do treinamento físico sobre a formação da placa aterosclerótica ainda

não foi devidamente esclarecido. Parece existir uma ação sobre os fatores de risco clássicos, como os lípides circulantes, e também um efeito local sobre a formação e desenvolvimento da placa aterosclerótica. A hipótese deste trabalho é que o treinamento físico modifica o processo inflamatório que ocorre durante a formação da placa aterosclerótica, tornando-a menos propensa a ruptura.

Para investigar essa hipótese, foram utilizados camundongos com deficiência do receptor LDL (LDLr^{-/-}). Este modelo animal de hipercolesterolemia caracteriza-se pela formação de placas ateroscleróticas somente quando alimentados com uma dieta rica em gordura e colesterol. Histologicamente, as placas que se desenvolvem nesses animais assemelham-se àsquelas observadas em humanos.

Para avaliar o efeito do treinamento físico sobre a placa aterosclerótica, dois estudos foram realizados definidos como preventivo e terapêutico. No primeiro, o treinamento físico foi instituído antes da formação da placa aterosclerótica; no segundo, o treinamento físico foi instituído em animais com placas já desenvolvidas. O estudo da morfologia das placas ateroscleróticas em animais treinados e sedentários, traz informações sobre o papel do treinamento físico na evolução da aterosclerose.

B. OBJETIVOS

B.1. Objetivo Geral

Investigar se o treinamento físico com intuito preventivo ou terapêutico altera a evolução da placa aterosclerótica e modifica os fatores de risco e os marcadores inflamatórios circulantes e teciduais característicos da aterosclerose.

B.2. Objetivos Específicos

Investigar:

B.2.1. Tamanho, conteúdo de gordura e colágeno da placa aterosclerótica.

B.2.2. Massa corporal, pressão arterial e colesterol total e frações dos animais.

B.2.3. As citocinas TNF- α e IL-6 e atividade da MMP-9 circulantes.

B.2.4. A via de sinalização CD40/CD40L, a expressão da MMP-9 e a formação de nitrotirosina nas placas ateroscleróticas.

C. MÉTODOS

C.1. Comissão de Ética

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq), nº 393/05 (ANEXO 1). O protocolo de pesquisa seguiu os critérios e normas de cuidados com os animais definidos pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) [53] e UFAW (The Universities Federation for Animals Welfare) [54].

C.2. Local

Os experimentos foram realizados:

1. No Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Emergências Clínicas (LIM-51), do Departamento de Clínica Médica, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), sob orientação do professor Heraldo Possolo de Souza;
2. No Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Exercício, da Escola de Educação Física e Esporte (EEFE), da Universidade de São Paulo (USP), em colaboração com a professora Patrícia Chakur Brum;

3. No Laboratório de Cardiovascular, do Instituto de Biologia, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), em colaboração com a professora Marta Helena Krieger;
4. No Laboratório de Lípidos (LIM-10), da Disciplina de Endocrinologia, do Departamento de Clínica Médica, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), em colaboração com a professora Patrícia Miralda Cazita.

C.3. Modelo Animal

Foram utilizados camundongos machos, com deficiência do receptor LDL (LDLr $-/-$), adquiridos de *The Jackson Laboratories* (Maine, USA). Este animal desenvolve aterosclerose somente quando alimentado com uma dieta rica em gordura e colesterol, constituindo um modelo reconhecido para o estudo da aterogênese.

Quatro a cinco camundongos foram mantidos em caixas dispostas em estantes no biotério do Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Exercício, da Escola de Educação Física e Esporte (EEFE), da Universidade de São Paulo (USP), com temperatura controlada entre 22-25°C e ciclo claro-escuro de 12 horas invertido para adequar o horário do treinamento físico à maior atividade metabólica dos camundongos.

C.4. Desenho Experimental

Com 16 semanas de vida, os animais foram separados aleatoriamente para iniciarem programa preventivo ou terapêutico.

Os animais do programa preventivo receberam dieta normal ou aterogênica por um período de 14 semanas. O treinamento físico foi iniciado concomitantemente ao início da dieta e perdurou por 14 semanas (Tabela 1).

Tabela 1: Grupos experimentais do programa preventivo.

PREVENTIVO	DIETA (duração 14 semanas)	EXERCÍCIO (duração 14 semanas)
N_{sed}	Normal	Sedentário
N_{ex}	Normal	Treinado (concomitante ao início da dieta)
A_{sed}	Aterogênica	Sedentário
A_{ex}	Aterogênica	Treinado (concomitante ao início da dieta)

Os animais do programa terapêutico receberam dieta normal ou aterogênica por um período de 28 semanas. O treinamento físico foi iniciado após 14 semanas do início da dieta, quando as placas ateroscleróticas já estavam estabelecidas, e perdurou por 14 semanas (Tabela 2).

Tabela 2: Grupos experimentais do programa terapêutico.

TERAPÊUTICO	DIETA (duração 28 semanas)	EXERCÍCIO (duração 14 semanas)
N_{sed}	Normal	Sedentário
N_{ex}	Normal	Treinado (após 14 semanas de dieta)
A_{sed}	Aterogênica	Sedentário
A_{ex}	Aterogênica	Treinado (após 14 semanas de dieta)

C.5. Dieta

De acordo com desenho experimental, os animais receberam dieta normal (Nuvital Nutrientes S/A, Curitiba, PR, Brasil) ou dieta aterogênica, rica em gordura e colesterol, composta de 51,56% de carboidratos, 17% de proteínas e 18% de lipídios (12% de óleo de coco, 4,75% de óleo de soja e 1,25% de colesterol) (HN&C Consultoria e Nutrição Experimental, Dourado, SP, Brasil) (ANEXO 2) [55]. Todos os componentes das dietas foram selecionados de acordo com os padrões da AIN-93 [56]. Todos os animais tiveram livre acesso à água e à dieta. A medida do consumo alimentar foi verificada semanalmente.

C.6. Programa de Treinamento Físico Aeróbico

Antes do início do treinamento físico, os animais foram submetidos a um teste progressivo máximo para determinação da intensidade de treinamento. O teste consistiu em um protocolo de exercício físico escalonado, com velocidade inicial de 6m/min, incrementada de 3 m/min a cada três minutos até a exaustão do animal, momento em que não mantém mais o padrão da corrida. [57].

O treinamento físico foi realizado em esteira rolante (figura 1), durante 14 semanas, cinco vezes por semana, com duração de 60 minutos cada sessão. A intensidade do treinamento foi estabelecida em 60% da velocidade máxima atingida durante o teste progressivo máximo, que

corresponde a máxima fase estável de lactato e a uma intensidade moderada de treinamento [57].

O treinamento físico consistiu em uma fase inicial de adaptação de três semanas com incrementos crescentes de duração e intensidade até serem atingidas a duração e a intensidade máximas estabelecidas (ANEXO 3). Ao final da sexta semana de treinamento os animais realizaram novo teste progressivo máximo para readequação da intensidade de treinamento. O teste foi repetido mais uma vez ao final das 14 semanas para verificar a eficácia do treinamento.

Figura 1: Fotografia de camundongos LDLr^{-/-} durante uma sessão de treinamento físico aeróbico em esteira rolante.

C.7. Coleta de Material para Análise

Vinte e quatro horas após o último teste progressivo máximo, os animais foram submetidos à eutanásia para coleta de sangue e tecidos pela administração intraperitoneal de cloridrato de ketamina (70mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg), na proporção de 2:1 (v/v).

A cavidade peritoneal foi amplamente exposta por meio de uma incisão mediana xifo-pubiana compreendendo pele, tela subcutânea, linha alba e peritônio parietal anterior, permitindo acesso ao retroperitônio para identificação e punção da veia cava inferior com seringa previamente heparinizada para coleta de sangue venoso. O sangue total foi centrifugado a 2000 rpm, por 15 minutos, em temperatura ambiente. O plasma obtido foi armazenado em freezer a -80°C para posterior análise.

Após exsangüinação, via secção da aorta abdominal, foi realizada uma toracotomia para exposição do coração para que os animais fossem perfundidos via punção cardíaca. A solução de perfusão foi introduzida através de uma agulha hipodérmica descartável (30x7) no ventrículo esquerdo. A perfusão foi realizada primeiro com 6 mL de solução fisiológica e em seguida com 6 mL de solução aquosa de formalina a 10% (v/v).

Posteriormente foram realizadas as dissecções do coração, aorta ascendente e arco aórtico com a utilização de um microscópio óptico (Modelo M900, D.F. Vasconcellos S.A., Brasil) (figura 2). O coração e a aorta ascendente foram retirados em conjunto e o arco aórtico foi retirado

separadamente. Todo este material foi fixado em solução aquosa de formalina a 10% (v/v) por 48 horas.

Figura 2: Fotografia representativa do coração (1), aorta ascendente (2) e arco aórtico (3) dissecados *in situ*, sob microscópio óptico. Aumento 12,5 x.

C.8. Morfometria da Placa Aterosclerótica

O tamanho da placa, o conteúdo de gordura e de colágeno foram determinados para avaliar a evolução e a instabilidade da placa aterosclerótica.

C.8.1. Tamanho e Conteúdo de Gordura da Placa Aterosclerótica

O processamento do coração e da aorta ascendente e a coloração das lâminas foram realizados de acordo com a técnica de Paigen et al. (1987) [58].

Após fixação em solução aquosa de formalina a 10% (v/v) por 48 horas, os conjuntos formados pelo coração e aorta ascendente foram colocados em cassetes individuais identificados e colocados sob água corrente durante duas horas. Passado este período, os cassetes foram mergulhados em gelatina (Sigma®) a 10% e mantidos em banho-maria a 37,5°C por duas horas; em seguida, em gelatina a 15% também por duas horas e, finalmente, em gelatina a 25% por 12 horas. Posteriormente, os cassetes foram mergulhados em nova gelatina a 25% e colocados sob refrigeração por três horas. Após este período, os cassetes foram abertos e o conjunto formado pelo coração e aorta ascendente, já gelatinizados, foram cortados em blocos e colocados de volta em solução aquosa de formalina a 10% (v/v) por pelo menos 24 horas. 84

Para a realização dos cortes histológicos foi utilizado um criostato (Micrótomo CM1850, Leica, Alemanha) a uma temperatura de -25°C. Os ventrículos foram seccionados entre o ápice e a base do coração num plano paralelo a uma linha definida pelas pontas laterais dos átrios. Em seguida, foram embebidos em TBS (Tissue Freezing Medium) e colocados na câmara de congelamento do criostato. Os cortes tiveram o seu início a partir da porção distal do coração após a identificação da raiz da aorta, onde os três folhetos da valva aórtica eram visíveis. Foram realizados 48 cortes transversais da aorta, de 10 µm de espessura cada um, a partir da inserção da valva aórtica até onde esta não era mais visualizada, perfazendo 480µm de extensão. Foram colocados oito cortes em cada lâmina, previamente gelatinizadas para melhor fixação destes cortes, totalizando seis lâminas por

animal. As lâminas foram coradas com *Oil-red O* (Amresco®), que é um corante de gordura e contra-coradas com Hematoxilina de Harris (Sigma®), corante dos núcleos celulares, e com *Light Green* (Amresco®), corante das demais organelas e do citoplasma [58].

O tamanho e o conteúdo de gordura da placa aterosclerótica foram quantificados como descrito por Rubin et al (1991) [59]. A imagem da placa aterosclerótica foi capturada pelo sistema Leica (Alemanha) para análise de imagens, formado por microscópio Leica DMLB e câmera digital Leica DFC 300 FX; e quantificada utilizando-se o software Leica Qwin versão 3.0 para Windows (Media Cybernetics). O tamanho da placa aterosclerótica de cada animal foi expressa como a média das placas medidas em seis cortes de 10µm de espessura, com 80µm de distância entre os cortes, perfazendo os 480µm de extensão da valva aórtica. O conteúdo de gordura da placa aterosclerótica de cada animal foi expresso em percentual de marcação por área da placa, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de gordura na placa} = (\text{área marcada} / \text{área da placa}) \times 100$$

C.8.2. Conteúdo de Colágeno da Placa Aterosclerótica

Após fixação em solução aquosa de formalina a 10% (v/v) por 48 horas, o arco aórtico foi processado e incluído em parafina por técnicas histológicas de rotina. Foram realizados cortes longitudinais de 5µm de espessura, corados por tricômico de picrosírio para quantificação do conteúdo de colágeno na placa. O método consiste basicamente na

coloração em vermelho pelo Sirius Red da proteína colágeno presente nas fibras colágenas, fibras reticulares, cartilagens e nas membranas basais. O DNA e o RNA se coram em azul pela Hematoxilina de Harris e o citoplasma das células epiteliais e musculares em róseo ou amarelo pelo ácido pícrico [60].

A imagem da placa aterosclerótica foi capturada pelo sistema Leica (Alemanha) para análise de imagens, formado por microscópio Leica DMLB e câmera digital Leica DFC 300 FX; e o seu conteúdo de colágeno foi quantificado utilizando-se o software Leica Qwin versão 3.0 para Windows (Media Cybernetics). O conteúdo de colágeno da placa aterosclerótica de cada animal foi expresso em percentual de marcação por área da placa, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de colágeno na placa} = (\text{área marcada} / \text{área da placa}) \times 100$$

C.9. Medida dos Fatores de Risco

Os fatores de risco analisados foram a massa corporal, a pressão arterial caudal e o colesterol total e frações.

C.9.1. Massa Corporal

A massa corporal foi registrada semanalmente, com a utilização de uma balança digital (Gehaka), durante o período de estudo.

C.9.2. Pressão Arterial Caudal

A medida da pressão arterial caudal foi determinada indiretamente pelo método de pletismografia de cauda no início e ao final do estudo.

O equipamento de registro consistiu de um manguito de borracha, adaptado à região proximal da cauda; de um esfigmomanômetro, para insuflar e desinflar a uma variação de 0 a 250 mm Hg; e de um transdutor de pulso pneumático, acoplado à porção distal da cauda, para detecção dos sinais de onda de pulso da pressão arterial caudal. O registro foi feito no sistema de registro de sinais biológicos CODAS (DataQ Instruments, Inc., Ohio, EUA) utilizando uma frequência de amostragem 1000 Hz por canal.

O camundongo foi colocado em uma caixa restritora de acrílico moderadamente aquecida por uma lâmpada infravermelha para vasodilatar a artéria caudal (figura 3). Depois, o esfigmomanômetro foi insuflado até a obstrução total do fluxo sanguíneo. Em seguida, o aparelho foi desinflado lentamente até a captação do primeiro pulso de pressão arterial caudal.

Os animais receberam um treinamento prévio para adaptação a essa medida de pressão arterial caudal. Foi realizado para cada animal um total de seis medidas e a média aritmética foi calculada. As medidas foram realizadas no período da tarde, nos dias em que os animais não foram submetidos ao treinamento físico.

Figura 3: Fotografia de camundongos LDLr^{-/-} (setas) em caixas restritoras de acrílico aquecidas com lâmpada infravermelha (α) durante o registro da pressão arterial caudal.

C.9.3. Colesterol Total e Frações

O plasma obtido no momento da eutanásia foi utilizado para a medida do nível de colesterol e frações. O colesterol total foi determinado por método enzimático colorimétrico comercial da Roche (F. Hoffman Roche, Basileia, Suíça) e as frações pelo método de FPLC.

As lipoproteínas plasmáticas foram separadas por cromatografia de filtração, em gel de alta resolução, no sistema FPLC (Pharmacia, Upsalla, Suécia), com coluna de Superose 6, HR 10/30, composta de grânulos de agarose *cross-linked* de 11-15 μm . Foram aplicados 100 μL do plasma de cada animal na coluna sob um fluxo constante de 0,5 mL/min de tampão Tris-HCl (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM e NaN_3 0,03%), pH 7,4. Após a eluição as 10 frações iniciais foram descartadas e as 30 frações seguintes (0,5 mL) tiveram seu colesterol total (CT) determinado

enzimaticamente em analisador automático bioquímico Cobas Mira (F. Hoffman Roche, Basiléia, Suíça), utilizando kit comercial da Boehringer-Mannheim. A identificação dos picos correspondentes das lipoproteínas VLDL, LDL e HDL foi determinada pela absorbância do colesterol total [61].

C.10. Marcadores Inflamatórios Circulantes

As concentrações de TNF- α , IL-6 e a atividade da MMP-9 foram determinados no plasma para estimar a atividade inflamatória sistêmica.

C.10.1. Citocinas Plasmáticas TNF- α e IL-6

As concentrações de TNF- α e IL-6 foram medidas no plasma pelo método de ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay).

As placas de ELISA foram sensibilizadas com 100 ng/mL do anticorpo de captura para IL-6 e TNF- α (couiting) (R&D) e incubadas overnight a 4°C. No dia seguinte as placas foram lavadas três vezes com solução de lavagem (PBS 0,05% de Tween 20). As placas de IL-6 e TNF- α foram bloqueadas e incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. Após a incubação as placas foram lavadas novamente e foram adicionadas as curvas (standard) em diluição seriada e os sobrenadantes. As curvas foram iniciadas em 8000 pg/mL ou 4000 pg/mL para IL-6 e TNF- α , respectivamente. As placas foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente e ao término desta incubação foram lavadas. Foram adicionados os anticorpos de detecção

(biotinilado) (R&D) para IL-6 e TNF- α e as placas foram novamente incubadas em temperatura ambiente por 2 horas, sendo lavadas após o término deste tempo. Em seguida, foi adicionado streptavidina-HRP em uma diluição de 1/200 e novamente as placas foram incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente, sendo lavadas após o término deste tempo. Adicionou-se então substrato (peróxido de uréia e TMB, na proporção 1/1), que desenvolveu uma cor proporcional ao antígeno presente na amostra, após 20 minutos de incubação, sob a proteção da luz. Essa reação foi bloqueada adicionando-se solução de parada (H₂SO₄ 2M) e a intensidade desta cor foi imediatamente medida na leitora de ELISA, utilizando um comprimento de onda de 450nm.

C.10.2. Atividade da MMP-9 Plasmática

A atividade da MMP- 9 foi determinada no plasma pelo método de zimografia.

Amostras de plasma foram diluídas em PBS (1:100) e 30 μ L deste plasma diluído foram acrescidos de tampão de amostra (2% de SDS, 60 mM Tris pH 6,8; 30% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol) e carregadas em gel 10% de poliacrilamida contendo 0,2% de gelatina. Após a eletroforese, o gel foi lavado em 10 mM de Tris (pH 8,0) contendo 2,5% de Triton X-100, para remoção do SDS e renaturação das proteínas. Em seguida, incubado por 15 minutos em solução tampão reveladora do gel (50mM de Tris pH 8,8; 5 mM CaCl₂, 0,02% NaN₃) com pequena quantidade

de Triton X-100 (2 a 3 mL) a temperatura ambiente por 15 minutos, e posteriormente por 20 horas a 37°C. Após a incubação em solução reveladora, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 (Amersham) por 2-3 horas. Em seguida, o gel foi fixado e descorado em solução de 40% de metanol e 10% de ácido acético glacial em água destilada. As metaloproteinases ativas são identificadas como bandas claras de lise em fundo azul. A atividade da metaloproteinase foi analisada por densitometria de gel, utilizando-se o programa de domínio público “Image J”, criado por Wayne Rasband do National Institutes of Mental Health, NIH, USA.

C.11. Marcadores Inflamatórios Teciduais

Para estimar a atividade inflamatória das placas ateroscleróticas foram determinadas a expressão da MMP-9, a via de sinalização CD40/CD40L e a formação de nitrotirosina pelo método de imunohistoquímica.

Após fixação em solução aquosa de formalina tamponada (pH 7,4) a 10%, por 24 horas, o arco aórtico foi processado e incluído em parafina por técnicas histológicas de rotina. Cortes longitudinais de 4µm de espessura foram obtidos e colhidos em lâminas previamente preparadas com solução adesiva de 3 amino-propyltriethoxy-silane (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO/USA, cód. A3648). A seguir, foram desparafinados em 2 banhos de xilol, a 56°C durante 30 minutos e à temperatura ambiente durante 20 minutos, sendo posteriormente hidratados em seqüência decrescente de etanol

(absoluto, 95% e 70%) e água corrente e água deionizada durante 5 minutos, cada vez. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito por meio de três incubações em peróxido de hidrogênio 3% por 10 minutos cada, em câmara escura. O material foi novamente lavado em água destilada por 10 minutos e a seguir foram feitas duas lavagens com TBS-HCl (Tris Buffer Solution – Cloridric Acid) durante 10 minutos cada. A recuperação antigênica foi feita com solução de Citrato de Sódio 10mM, pH 6,0 em alta temperatura por 40 minutos. Depois de resfriados com água gelada os cortes foram lavados em PBS por 5 minutos. O bloqueio de sítios inespecíficos foi feito com leite desnatado (Molico, Nestlé, Brazil) 10% em TBS-HCl por 30 minutos a 37°C.

Os materiais foram incubados com: anticorpo primário policlonal de cabra – IgG contra MMP-9 (C20):Sc6840 (Santa Cruz Biotechnology), diluído 1:50; anticorpo primário policlonal de coelho – IgG contra CD154 (H-215) (Santa Cruz Biotechnology), diluído 1:60; e anticorpo primário policlonal de coelho – IgG contra nitrotirosina (A-21285) (Molecular Probes), diluído 1:200, todos em solução 1% de albumina bovina fração V (SERVA, Heidelberg/Alemanha, cód. 11930), pH 7,4, em TBS-HCl (Tris Buffer Solution – Cloridric Acid), por uma noite a 4°C. As lâminas foram incubadas em lâmina úmida, em temperatura ambiente, por 60 minutos com anticorpo secundário biotilado (Vector Laboratories, Cat# BA-5000 – diluição 1:500) seguido de três banhos em PBS por 5 minutos e incubados com complexo ABC (Vector Laboratories, Cat# BA-5000 – diluição 1:500) por 30 minutos em temperatura ambiente, seguida de três banhos em PBS por cinco

minutos. A seguir o material foi lavado em TBS-HCl, por 10 minutos e TBS-HCL durante 5 minutos. A revelação dos sítios de reação foi feita utilizando-se o cromógeno DAB (3,3'-Diamino-Benzidine, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO/USA, cód. D 5637) durante 3 minutos. A intensidade de cor foi monitorada com microscópio óptico, através de controles positivos que acompanharam a reação. Os cortes histológicos foram, a seguir, lavados em água corrente por 10 minutos e contra-corados com Hematoxilina de Harris por 1 minuto. Após lavagem foram desidratados em bateria ascendente de etanol, diafanizados por xilol e montados com lamínula de vidro e resina Permout (FISHER Scientific, Fair Lawn, NJ/USA, cód. SP15-100).

A quantificação das células imunomarcadas para CD40 e CD40L foi realizada de forma randomizada, em oito campos da placa aterosclerótica, utilizando-se um graticulo com área de 1 cm^2 , dividido em 10 porções de 1 mm^2 , adaptado a ocular de um microscópio óptico (Axioskop Zeiss, Alemanha), com aumento de 400 vezes. Os resultados foram expressos em número de células por mm^2 [62, 63].

As imagens das placas ateroscleróticas imunomarcadas para MMP-9 e nitrotirosina foram capturadas pelo analisador de imagens Leica (Alemanha), formado por microscópio Leica DMLB e câmera digital Leica DFC 300 FX. Para quantificação foi utilizado o programa de computador Leica Qwin versão 3.0 para Windows (Media Cybernetics).

A quantidade de MMP-9 na placa aterosclerótica foi expressa pelo percentual de marcação positiva por área total das placas, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de MMP-9 na placa} = (\text{área marcada} / \text{área da placa}) \times 100$$

A quantidade de nitrotirosina na placa aterosclerótica foi expressa pelo percentual de marcação positiva por área total das placas, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de Nitrotirosina na placa} = (\text{área marcada} / \text{área da placa}) \times 100$$

C.12. Análise Estatística

As variáveis quantitativas foram apresentadas descritivamente em tabelas contendo média e erro padrão da média (EPM). A normalidade das variáveis foi avaliada com o teste de Kolmogorov-Smirnov.

Os grupos com variáveis mensuradas em um único momento com distribuição normal foram avaliados com análise de variância e respectivo teste de Tukey e quando apenas dois grupos foram comparados foi utilizado teste t-Student. Sem distribuição normal, os grupos foram avaliados com Kruskal-Wallis e o respectivo teste de Dunn e quando apenas dois grupos foram comparados foi utilizado Mann-Whitney.

Os efeitos do treinamento físico entre os grupos quando a distribuição era normal foi feita pelo teste de análise de variância para medidas repetidas. Quando a distribuição não era normal as variáveis foram

avaliadas com testes não-paramétricos: teste de Kruskal-Wallis com o respectivo teste de Dunn e Teste dos sinais de Wilcoxon.

Quando utilizado análise de variância para medidas repetidas foram testadas as três hipóteses básicas:

H_{01} : Os perfis de médias são paralelos, ou seja, o comportamento dos grupos é igual ao longo do tempo (pré e pós treinamento);

H_{02} : Os perfis de médias são coincidentes, ou seja, não existe diferença de médias entre os grupos;

H_{03} : Não há efeito de tempo, ou seja, os perfis são paralelos ao eixo das abscissas.

Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos [64].

D. RESULTADOS

Considerando que as propostas de cada programa são diferentes, os resultados estão divididos em duas partes: programa preventivo e programa terapêutico.

D.1. Programa Preventivo

No início do programa preventivo os animais apresentaram características semelhantes. A massa corporal, a pressão arterial caudal e a frequência cardíaca iniciais foram semelhantes entre os grupos de dieta normal, sedentário (Nsed) e exercitado (Nex); e dieta aterogênica, sedentário (Ased) e exercitado (Aex). No teste progressivo máximo inicial a velocidade máxima atingida pelos grupos Nex e Aex também foram semelhantes. Todos esses dados comprovam a homogeneidade da amostra (Tabela 3).

Tabela 3: Característica da amostra no início do programa preventivo.

PREVENTIVO	N_{sed}	N_{ex}	A_{sed}	A_{ex}	p
Massa Corporal (g)	28,4±0,7	28,2±0,4	27,8±0,8	28,0±0,7	> 0,05
Pressão Arterial Caudal (mm Hg)	111±3	115±2	110±2	114±4	> 0,05
Frequência Cardíaca (bpm)	688±12	680±11	684±17	694±15	> 0,05
Vel Máx Atingida (m/min)	-	23±1	-	21±1	> 0,05

Para testar a eficácia do treinamento físico, os grupos treinados realizaram novo teste progressivo máximo ao final do período de treinamento. A velocidade máxima atingida no pós-teste aumentou em relação ao pré-teste, confirmando a eficácia do treinamento físico realizado. O grupo dieta normal exercitado apresentou um aumento na velocidade máxima atingida em relação ao grupo dieta aterogênica exercitado, com valores de 28 ± 1 m/min e 25 ± 1 m/min, respectivamente, como mostra a figura 4.

Figura 4: Velocidade máxima atingida no teste máximo pré e pós programa preventivo nos grupos dieta normal exercitado (Nex) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em média $\pm$ EPM. Análise estatística: ANOVA. Nex, $n = 11$; Aex, $n = 9$. *, $p < 0,05$ vs. Pré; †, $p < 0,05$ vs. Aex Pós.

O comportamento da frequência cardíaca foi diferente ao longo do tempo. Nos grupos sedentários, dieta normal (716 ± 13 bpm) e dieta aterogênica (719 ± 10 bpm), a frequência cardíaca aumentou ao final do programa preventivo, enquanto que nos grupos exercitados, dieta normal (627 ± 17 bpm) e dieta aterogênica (630 ± 17 bpm), a frequência cardíaca

diminuiu. Essa bradicardia de repouso revela que os grupos exercitados adquiriram adaptação fisiológica ao treinamento físico aeróbico. A figura 5 mostra que ao final do programa preventivo, os grupos exercitados (Nex e Aex) apresentaram frequência cardíaca semelhantes entre si e menores do que as dos grupos sedentários (Nsed e Ased).

Figura 5: Frequência cardíaca pré e pós programa preventivo nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em média $\pm$ EPM. Análise estatística: ANOVA. Nsed e Aex, $n = 8$; Nex e Ased, $n = 10$. *, $p < 0,05$ vs. Pré; †, $p < 0,05$ vs. Nsed e Ased Pós.

D.1.1. Morfometria da Placa Aterosclerótica

O tamanho da placa, o conteúdo de gordura e de colágeno foram determinados na aorta ascendente, ao nível da valva da aorta. Os animais que receberam dieta normal, sedentários (Nsed) e exercitados (Nex), não apresentaram placas e por isso foram excluídos das análises subsequentes.

Ao final do programa preventivo, o tamanho da placa aterosclerótica foi igual nos grupos dieta aterogênica sedentário ($401 \pm 47 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) e dieta aterogênica exercitado ($564 \pm 101 \times 10^3 \mu\text{m}^2$), como mostram as figuras 6 e 7.

Figura 6: Tamanho da placa aterosclerótica ao final do programa preventivo nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em Média $\pm$ EPM. Análise estatística: Teste t-Student. Ased e Aex, $n = 6$.

Figura 7: Fotomicrografias de uma secção transversal da aorta ascendente ao nível da valva da aorta. Observa-se o tamanho e o conteúdo de gordura (em vermelho) na placa aterosclerótica representativa dos grupos (A) dieta aterogênica sedentário (Ased) e (B) dieta aterogênica exercitado (Aex) ao final do programa preventivo. Coloração por Oil Red e Light Green. Aumento 200 x.

Observa-se na figura 7 que a intensidade da marcação de gordura (em vermelho) na placa aterosclerótica do grupo dieta aterogênica exercitado foi menos intensa quando comparado ao grupo dieta aterogênica sedentário. Desse modo, o conteúdo de gordura na placa foi menor no grupo dieta aterogênica exercitado ($40 \pm 3\%$) do que no grupo dieta aterogênica sedentário ($52 \pm 3\%$) (Figura 8).

Figura 8: Percentual de gordura na placa aterosclerótica ao final do programa preventivo nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em Média $\pm$ EPM. Análise estatística: Teste t-Student. Ased e Aex, n = 6. *, $p < 0,05$ vs. Ased.

Ao contrário, o conteúdo de colágeno na placa aterosclerótica foi maior no grupo dieta aterogênica exercitado ($31 \pm 3\%$) quando comparado ao grupo dieta aterogênica sedentário ($21 \pm 3\%$), como se observa na figura 9.

Figura 9: Percentual de colágeno na placa aterosclerótica ao final do programa preventivo nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em Média $\pm$ EPM. Análise estatística: Teste t-Student. Ased e Aex, n = 6. *, $p < 0,05$ vs. Ased.

Na figura 10, observa-se que o grupo dieta aterogênica sedentário apresentou na placa aterosclerótica uma distribuição de colágeno aleatória, bastante diferente da distribuição periférica e estruturada observada no grupo dieta aterogênica exercitado (Figura 11).

Essa análise quantitativa e qualitativa sugere que as placas ateroscleróticas nos animais exercitados apresentavam sinais de instabilidade menos evidentes, sugerindo que o treinamento físico aeróbico produz um efeito negativo sobre os fatores responsáveis pela instabilidade da placa.

A seguir foram investigados possíveis mecanismos pelos quais o treinamento físico aeróbico pode influenciar a estabilidade da placa.

Figura 10: Fotomicrografias de uma secção longitudinal do arco aórtico representativa do grupo dieta aterogênica sedentário (Ased) ao final do programa preventivo. Em A, observa-se o conteúdo de colágeno (em vermelho) na placa aterosclerótica. Em B, sob luz polarizada, observa-se o conteúdo de colágeno (em verde, vermelho e amarelo) na placa aterosclerótica. Coloração por Tricrômico de Picro-Sirius. Aumento 200 x.

Figura 11: Fotomicrografias de uma secção longitudinal do arco aórtico representativa do grupo dieta aterogênica exercitado (Aex) ao final do programa preventivo. Em A, observa-se o conteúdo de colágeno (em vermelho) na placa aterosclerótica. Em B, sob luz polarizada, observa-se o conteúdo de colágeno (verde, vermelho e amarelo) na placa aterosclerótica. Coloração por Tricrômico de Picro-Sirius. Aumento 200 x.

D.1.2. Fatores de Risco

Para investigar se as modificações induzidas pelo treinamento físico aeróbico na estrutura da placa ocorre por meio do controle dos fatores de risco, foram analisados a massa corporal, a pressão arterial caudal e o colesterol total e frações.

Ao final do programa preventivo, a massa corporal foi maior no grupo dieta aterogênica sedentário ($39,5 \pm 2,5$ g) do que nos grupos dieta aterogênica exercitado ($30,9 \pm 1,8$ g) e que receberam dieta normal, sedentário ($30,2 \pm 0,8$ g) e exercitado ($28,4 \pm 0,6$ g). Observa-se na figura 12 que o treinamento físico evitou o ganho de massa corporal provocado pela dieta aterogênica.

Figura 12: Massa corporal ao final do programa preventivo nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em média $\pm$ EPM. Análise estatística: ANOVA e Teste de Tukey. Nsed, n = 16; Nex e Ased, n = 11; Aex, n = 10. *, $p < 0,05$ vs. Nsed, Nex, Aex.

A pressão arterial caudal foi menor nos grupos exercitados, dieta normal (104 ± 3 mm Hg) e dieta aterogênica (105 ± 3 mm Hg); do que nos grupos sedentários, dieta normal (129 ± 6 mm Hg) e dieta aterogênica (127 ± 5 mm Hg), como mostra a figura 13 ao final do programa preventivo.

Figura 13: Pressão arterial caudal ao final do programa preventivo nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em média $\pm$ EPM. Análise estatística: ANOVA. Nsed, $n = 8$; Nex, $n = 5$; Ased, $n = 7$; Aex, $n = 6$. *, $p < 0,05$ vs. Nsed e Ased.

O treinamento físico nos animais que receberam dieta normal diminuiu os níveis plasmáticos de colesterol quando comparado ao grupo sedentário que recebeu a mesma dieta (174 ± 11 vs 279 ± 38 mg/dL, respectivamente). O consumo de dieta aterogênica provocou aumento significativo dos níveis plasmáticos de colesterol nos animais sedentários e o treinamento físico aeróbico inibiu parcialmente esse aumento (1009 ± 148 vs 549 ± 50 mg/dL, respectivamente) (Figura 14).

Figura 14: Colesterol total plasmático ao final do programa preventivo nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em Média $\pm$ EPM. Análise estatística: ANOVA e Teste de Tukey. Nsed e Nex, $n = 6$; Ased e Aex, $n = 7$. *, $p < 0,05$ vs. Nsed; †, $p < 0,05$ vs. Ased e Nex.

Os grupos que receberam dieta aterogênica, sedentário ($57 \pm 3\%$) e exercitado ($53 \pm 2\%$), tiveram aumento na porcentagem de fração VLDL quando comparados com os grupos que receberam dieta normal, sedentário ($24 \pm 1\%$) e exercitado ($13 \pm 2\%$). Observa-se que esse padrão não foi modificado pelo treinamento físico (Figura 15 e 16).

De modo contrário, a porcentagem de fração HDL foi menor nos grupos que receberam dieta aterogênica, sedentário ($13 \pm 3\%$) e exercitado ($8 \pm 2\%$), do que nos grupos que receberam dieta normal, sedentário ($34 \pm 2\%$) e exercitado ($41 \pm 2\%$). O treinamento físico não alterou esse perfil, independente da dieta administrada (Figuras 15 e 16).

Figura 15: Perfil das frações de lipoproteínas ao final do programa preventivo nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Os valores foram calculados como a área abaixo dos picos de VLDL, LDL e HDL obtidos por FPLC da absorbância do colesterol plasmático.

Figura 16: Percentual das frações de lipoproteínas ao final do programa preventivo nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em Média $\pm$ EPM. Análise estatística: ANOVA e Teste de Tukey. Nsed e Ased, n = 6; Nex e Aex, n = 7. *, p < 0,05 vs. Nsed e Nex; †, p < 0,05 vs. Nsed e Nex.

D.1.3. Marcadores Inflamatórios Circulantes

Para investigar se as modificações induzidas pelo treinamento físico aeróbico na estrutura da placa ocorre por meio do controle da atividade inflamatória sistêmica, foram analisados as concentrações plasmáticas de TNF- α , IL-6 e a atividade da MMP-9 circulante.

Ao final do programa preventivo, não houve nenhuma diferença nas concentrações plasmáticas de TNF- α entre os grupos dieta normal, sedentário (11 ± 2 picog/mL) e exercitado (14 ± 2 picog/mL); e dieta aterogênica, sedentário (12 ± 2 picog/mL) e exercitado (14 ± 2 picog/mL), como mostra a figura 17.

Figura 17: TNF-alfa plasmático ao final do programa preventivo nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em média $\pm$ EPM. Análise estatística: ANOVA. Nsed, n = 16; Nex, n = 11; Ased e Aex, n = 9.

No entanto, a hipercolesterolemia induzida pelo consumo de dieta aterogênica provocou um aumento dos níveis plasmáticos de IL-6 nos grupos que receberam dieta aterogênica, sedentário (18 ± 2 picog/mL) e exercitado (17 ± 1 picog/mL); quando comparados aos grupos que receberam dieta normal, sedentário (13 ± 1 picog/mL) e exercitado (12 ± 0 picog/mL). O treinamento físico aeróbico não alterou os valores desta citocina (Figura 18).

Figura 18: IL-6 plasmático ao final do programa preventivo nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em Média $\pm$ EPM. Análise estatística: ANOVA e Teste de Tukey. Nsed, n = 16; Nex, n = 11; Ased e Aex, n = 9. *, $p < 0,05$ vs. Nsed e Nex; †, $p < 0,05$ vs. Nex.

A atividade da MMP-9 plasmática foi medida somente nos animais que receberam dieta aterogênica. A atividade dessa enzima foi igual nos grupos sedentário (8939 ± 2477 unidades arbitrárias) e exercitado (10694 ± 2380 unidades arbitrárias), como é possível observar nas figuras 19 e 20.

Figura 19: Atividade da MMP-9 plasmática ao final do programa preventivo nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em Média $\pm$ EPM. Análise estatística: Teste t-Student. Ased e Aex, n = 4.

Figura 20: Zimograma representativo da atividade da MMP-9 plasmática ao final do programa preventivo nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex).

D.1.4. Marcadores Inflamatórios Teciduais

Para investigar se a modulação da atividade de vias de sinalização pró-inflamatórias na placa aterosclerótica, poderiam justificar o efeito do treinamento físico em sua morfologia, foram determinadas no arco aórtico a expressão da MMP-9 tecidual, a via de sinalização CD40/CD40L e a formação de nitrotirosina.

Ao final do programa preventivo, nenhuma diferença na expressão da MMP-9 nas placas ateroscleróticas foi detectada nos grupos dieta aterogênica sedentário ($13 \pm 5\%$) e dieta aterogênica exercitado ($29 \pm 10\%$), como se observa nas figuras 21 e 22.

Figura 21: Expressão de MMP-9 na placa aterosclerótica ao final do programa preventivo nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em Média $\pm$ EPM. Análise estatística: Teste t-Student. Ased e Aex, $n = 4$.

Figura 22: Fotomicrografias de uma secção longitudinal do arco aórtico. Observa-se a expressão de MMP-9 (em castanho) na placa aterosclerótica representativa dos grupos (A) dieta aterogênica sedentário (Ased) e (B) dieta aterogênica exercitado (Aex) ao final do programa preventivo. Imunohistoquímica para MMP-9 e contra-coloração por Hematoxilina de Harris. Aumento de 400 x.

A expressão de CD40 nas placas ateroscleróticas foi menor no grupo dieta aterogênica exercitado ($30 \pm 2 \text{ mm}^2$) do que no grupo dieta aterogênica sedentário ($138 \pm 34 \text{ mm}^2$) (Figura 23 e 24).

Figura 23: Expressão de CD40 na placa aterosclerótica ao final do programa preventivo nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em média $\pm$ EPM. Análise estatística: Teste de Mann-Whitney. Ased e Aex, $n = 4$. *, $p < 0,05$ vs. Ased.

Figura 24: Fotomicrografias de uma secção longitudinal do arco aórtico. Observa-se a expressão de CD40 (em castanho) na placa aterosclerótica representativa dos grupos (A) dieta aterogênica sedentário (Ased) e (B) dieta aterogênica exercitado (Aex) ao final do programa preventivo. Imunohistoquímica para CD40 e contra-coloração por Hematoxilina de Harris. Aumento de 400 x.

Porém, nenhuma diferença estatística foi encontrada na expressão do ligante de CD40, CD40L, nas placas ateroscleróticas entre os grupos dieta aterogênica exercitado ($56 \pm 32 \text{ mm}^2$) e dieta aterogênica sedentário ($116 \pm 22 \text{ mm}^2$), como mostram as figuras 25 e 26.

Figura 25: Expressão de CD40L na placa aterosclerótica ao final do programa preventivo nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em Média $\pm$ EPM. Análise estatística: Teste t-Student. Ased e Aex, $n = 5$.

Figura 26: Fotomicrografias de uma secção longitudinal do arco aórtico. Observa-se a expressão de CD40L (em castanho) na placa aterosclerótica representativa dos grupos (A) dieta aterogênica sedentário (Ased) e (B) dieta aterogênica exercitado (Aex) ao final do programa preventivo. Imunohistoquímica para CD40L e contra-coloração por Hematoxilina de Harris. Aumento de 400 x.

A medida da formação de nitrotirosina é uma medida indireta da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Os dados das figuras 27 e 28 sugerem que nenhuma diferença na formação de nitrotirosina nas placas ateroscleróticas foi encontrada entre os grupos dieta aterogênica sedentário ($30 \pm 7\%$) e dieta aterogênica exercitado ($37 \pm 7\%$).

Figura 27: Formação de nitrotirosina na placa aterosclerótica ao final do programa preventivo nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em Média $\pm$ EPM. Análise estatística: Teste t-Student. Ased e Aex, $n = 4$.

Figura 28: Fotomicrografias de uma secção longitudinal do arco aórtico. Observa-se a formação de nitrotirosina (em castanho) na placa aterosclerótica representativa dos grupos (A) dieta aterogênica sedentário (Ased) e (B) dieta aterogênica exercitado (Aex) ao final do programa preventivo. Imunohistoquímica para nitrotirosina e contra-coloração por Hematoxilina de Harris. Aumento de 400 x.

D.2. Programa Terapêutico

No início do programa terapêutico os animais apresentaram mesma massa corporal entre os grupos: dieta normal sedentário ($29,1 \pm 0,7$ g), dieta normal exercitado ($29,2 \pm 0,5$ g), dieta aterogênica sedentário ($28,4 \pm 0,6$ g) e dieta aterogênica exercitado ($28,6 \pm 0,8$ g), caracterizando a homogeneidade da amostra.

Mas, no início do treinamento físico, após 14 semanas de dieta, os grupos de dieta aterogênica (Ased e Aex) apresentaram massa corporal maior do que os grupos de dieta normal (Nsed e Nex), como mostra a tabela 4. Além disso, no teste progressivo máximo inicial a velocidade máxima atingida pelo grupo dieta normal exercitado foi maior quando comparado ao grupo dieta aterogênica exercitado. No entanto, todos os grupos (Nsed, Nex, Ased e Aex) apresentaram pressão arterial caudal e frequência cardíaca semelhantes (Tabela 4).

Tabela 4: Característica da amostra do programa terapêutico ao iniciar o treinamento físico.

TERAPÊUTICO	N _{sed}	N _{ex}	A _{sed}	A _{ex}	p
Massa Corporal (g)	29,9 $\pm$ 0,7	30,0 $\pm$ 0,4	42,7 $\pm$ 1,9	43,3 $\pm$ 1,0	< 0,05
Pressão Arterial Caudal (mm Hg)	123 $\pm$ 4	124 $\pm$ 6	122 $\pm$ 3	124 $\pm$ 3	> 0,05
Frequência Cardíaca (bpm)	705 $\pm$ 6	710 $\pm$ 4	700 $\pm$ 11	709 $\pm$ 9	> 0,05
Vel Máx Atingida (m/min)	-	26 $\pm$ 1	-	16 $\pm$ 1	< 0,05

Para testar a eficácia do treinamento físico, os grupos treinados realizaram novo teste progressivo máximo ao final do período de treinamento. A velocidade máxima atingida no pós-teste pelo grupo dieta normal exercitado não aumentou em relação ao pré-teste. Mas, o grupo dieta aterogênica exercitado apresentou aumento da velocidade máxima atingida. A velocidade máxima atingida no pós-teste para os dois grupos, Nex e Nsed, foi semelhante, com valores de 26 ± 1 m/min e 24 ± 1 m/min, respectivamente, como mostra a figura 29.

Figura 29: Velocidade máxima atingida no teste máximo pré e pós programa terapêutico nos grupos dieta normal exercitado (Nex) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em média $\pm$ EPM. Análise estatística: Teste Mann-Whitney e Teste dos sinais de Wilcoxon. Nex, n = 12; Aex, n = 10. *, $p < 0,05$ vs. Aex Pré.

Os grupos sedentários, dieta normal (718 ± 5 bpm) e dieta aterogênica (718 ± 8 bpm), apresentaram frequência cardíaca semelhantes no início e ao final do programa terapêutico, enquanto que nos grupos exercitados, dieta normal (718 ± 8 bpm) e dieta aterogênica (653 ± 15 bpm), a frequência cardíaca diminuiu ao final do período de treinamento físico. Essa bradicardia

de repouso revela que os grupos exercitados adquiriram adaptação fisiológica ao treinamento físico aeróbico. A figura 30 mostra que ao final do programa terapêutico, os grupos exercitados (Nex e Aex) apresentaram frequência cardíaca semelhantes entre si e menores do que as dos grupos sedentários (Nsed e Ased).

Figura 30: Frequência cardíaca pré e pós programa terapêutico nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em média $\pm$ EPM. Análise estatística: ANOVA. Nsed e Nex, $n = 10$; Ased, $n = 6$; Aex, $n = 8$. *, $p < 0,05$ vs. Pré; †, $p < 0,05$ vs. Nex e Aex Pós.

D.2.1. Morfometria da Placa Aterosclerótica

O tamanho da placa, o conteúdo de gordura e de colágeno foram determinados na aorta ascendente, ao nível da valva da aorta. Os animais que receberam dieta normal, sedentários (Nsed) e exercitados (Nex), não apresentaram placas e por isso foram excluídos das análises subsequentes.

Ao final do programa terapêutico, o tamanho da placa aterosclerótica foi igual nos grupos dieta aterogênica sedentário ($880 \pm 100 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) e dieta aterogênica exercitado ($1019 \pm 134 \times 10^3 \mu\text{m}^2$), como mostram as figuras 31 e 32.

Figura 31: Tamanho da placa aterosclerótica ao final do programa terapêutico nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em Média $\pm$ EPM. Análise estatística: Teste t-Student. Ased, n = 4; Aex, n = 5.

Figura 32: Fotomicrografias de uma seção transversal da aorta ascendente ao nível da valva da aorta. Observa-se o tamanho e o conteúdo de gordura (em vermelho) na placa aterosclerótica representativa dos grupos (A) dieta aterogênica sedentário (Ased) e (B) dieta aterogênica exercitado (Aex) ao final do programa terapêutico. Coloração por Oil Red e Light Green. Aumento 200 x.

Observa-se na figura 32 que a intensidade de marcação de gordura (em vermelho) na placa aterosclerótica do grupo dieta aterogênica exercitado foi igual quando comparado ao grupo dieta aterogênica sedentário. Desse modo, o conteúdo de gordura na placa foi igual nos grupos dieta aterogênica sedentário ($31 \pm 2\%$) e dieta aterogênica exercitado ($32 \pm 2\%$) (Figura 33).

Figura 33: Percentual de gordura na placa aterosclerótica ao final do programa terapêutico nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em Média $\pm$ EPM. Análise estatística: Teste t-Student. Ased, n = 4; Aex, n = 5.

Diferentemente, o conteúdo de colágeno na placa aterosclerótica foi maior no grupo dieta aterogênica exercitado ($33 \pm 2\%$) quando comparado ao grupo dieta aterogênica sedentário ($17 \pm 4\%$), como se observa na figura 34.

Figura 34: Percentual de colágeno na placa aterosclerótica ao final do programa terapêutico nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em Média $\pm$ EPM. Análise estatística: Teste t-Student. Ased e Aex, n = 6. *, $p < 0,05$ vs. Ased.

Na figura 35, observa-se que o grupo dieta aterogênica sedentário apresentou na placa aterosclerótica uma distribuição de colágeno aleatória, bastante diferente da distribuição periférica e estruturada observada no grupo dieta aterogênica exercitado (Figura 36).

Essa análise quantitativa e qualitativa sugere que as placas ateroscleróticas nos animais exercitados apresentavam sinais de instabilidade menos evidentes, sugerindo que o treinamento físico aeróbico produz um efeito negativo sobre os fatores responsáveis pela instabilidade da placa.

A seguir foram investigados possíveis mecanismos pelos quais o treinamento físico aeróbico pode influenciar a estabilidade da placa.

Figura 35: Fotomicrografias de uma secção longitudinal do arco aórtico representativa do grupo dieta aterogênica sedentário (Ased) ao final do programa terapêutico. Em A, observa-se o conteúdo de colágeno (em vermelho) na placa aterosclerótica. Em B, sob luz polarizada, observa-se o conteúdo de colágeno (em verde, vermelho e amarelo) na placa aterosclerótica. Coloração por Tricrômico de Picro-Sirius. Aumento 200 x.

Figura 36: Fotomicrografias de uma secção longitudinal do arco aórtico representativa do grupo dieta aterogênica exercitado (Aex) ao final do programa terapêutico. Em A, observa-se o conteúdo de colágeno (em vermelho) na placa aterosclerótica. Em B, sob luz polarizada, observa-se o conteúdo de colágeno (verde, vermelho e amarelo) na placa aterosclerótica. Coloração por Tricrômico de Picro-Sirius. Aumento 200 x.

D.2.2. Fatores de Risco

Para investigar se as modificações induzidas pelo treinamento físico aeróbico na estrutura da placa ocorre por meio do controle dos fatores de risco, foram analisados a massa corporal, a pressão arterial caudal e o colesterol total e frações.

Ao final do programa terapêutico, a massa corporal foi maior nos grupos que receberam dieta aterogênica, sedentário ($38,5 \pm 1,7$ g) e exercitado ($38,2 \pm 1,4$ g), do que nos grupos que receberam dieta normal, sedentário ($29,0 \pm 1,0$ g) e exercitado ($28,5 \pm 0,7$ g). Observa-se na figura 37 que o treinamento físico não provocou perda de massa corporal no grupo que recebeu dieta aterogênica.

Figura 37: Massa corporal ao final do programa terapêutico nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em média $\pm$ EPM. Análise estatística: ANOVA e Teste de Tukey. Nsed, n = 7; Nex, n = 12; Ased, n = 4; Aex, n = 10. *, $p < 0,05$ vs. Nsed, Nex.

A pressão arterial caudal foi menor nos grupos exercitados, dieta normal (109 ± 2 mm Hg) e dieta aterogênica (110 ± 2 mm Hg); do que nos grupos sedentários, dieta normal (129 ± 4 mm Hg) e dieta aterogênica (133 ± 4 mm Hg), como mostra a figura 38 ao final do programa terapêutico.

Figura 38: Pressão arterial caudal ao final do programa terapêutico nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em média $\pm$ EPM. Análise estatística: ANOVA. Nsed, $n = 9$; Nex, $n = 10$; Ased, $n = 6$; Aex, $n = 8$. *, $p < 0,05$ vs. Nsed e Ased.

O consumo de dieta aterogênica provocou aumento significativo nos níveis plasmáticos de colesterol nos grupos dieta aterogênica, sedentário (864 ± 56 mg/dL) e exercitado (706 ± 80 mg/dL); quando comparados aos grupos que receberam dieta normal, sedentário (212 ± 25 mg/dL) e exercitado (255 ± 26 mg/dL). O treinamento físico aeróbico não foi capaz de reduzir esse aumento nos níveis plasmáticos de colesterol (Figura 39).

Figura 39: Colesterol total plasmático ao final do programa terapêutico nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em média $\pm$ EPM. Análise estatística: ANOVA e Teste de Tukey. Nsed, Nex, Ased, n = 6; Aex, n = 7. *, $p < 0,05$ vs. Nsed, Nex.

Os grupos que receberam dieta aterogênica, sedentário ($51 \pm 2\%$) e exercitado ($53 \pm 2\%$), tiveram aumento na porcentagem de fração VLDL quando comparados com os grupos que receberam dieta normal, sedentário ($23 \pm 6\%$) e exercitado ($20 \pm 4\%$). Observa-se que esse padrão não foi modificado pelo treinamento físico (Figura 40 e 41).

De modo contrário, a porcentagem de fração HDL foi menor nos grupos que receberam dieta aterogênica, sedentário ($9 \pm 2\%$) e exercitado ($8 \pm 1\%$), do que nos grupos que receberam dieta normal, sedentário ($29 \pm 4\%$) e exercitado ($31 \pm 2\%$). O treinamento físico não alterou esse perfil, independente da dieta administrada (Figuras 40 e 41).

Figura 40: Perfil das frações de lipoproteínas ao final do programa terapêutico nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Os valores foram calculados como a área abaixo dos picos de VLDL, LDL e HDL obtidos por FPLC da absorbância do colesterol plasmático.

Figura 41: Percentual das frações de lipoproteínas ao final do programa terapêutico nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em média $\pm$ EPM. Análise estatística: ANOVA e Teste de Tukey. Nsed, Nex, Aex, $n = 7$; Ased, $n = 6$. *, $p < 0,05$ vs. Nsed e Nex; †, $p < 0,05$ vs. Nsed e Nex.

D.2.3. Marcadores Inflamatórios Circulantes

Para investigar se as modificações induzidas pelo treinamento físico aeróbico na estrutura da placa ocorre por meio do controle da atividade inflamatória sistêmica, foram analisados as concentrações plasmáticas de TNF- α , IL-6 e a atividade da MMP-9 circulante.

Ao final do programa terapêutico, não houve nenhuma diferença nas concentrações plasmáticas de TNF- α entre os grupos dieta normal, sedentário (11 ± 2 picog/mL) e exercitado (10 ± 1 picog/mL); e dieta aterogênica, sedentário (18 ± 5 picog/mL) e exercitado (13 ± 1 picog/mL), como mostra a figura 42.

Figura 42: TNF-alfa plasmático ao final do programa terapêutico nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em média $\pm$ EPM. Análise estatística: ANOVA. Nsed, n = 14; Nex, n = 12; Ased, n = 5; Aex, n = 9.

Da mesma forma, não houve nenhuma diferença nos níveis plasmáticos de IL-6 entre os grupos dieta normal, sedentário (14 ± 1 picog/mL) e exercitado (14 ± 1 picog/mL); e dieta aterogênica, sedentário (20 ± 3 picog/mL) e exercitado (15 ± 1 picog/mL), como se observa na figura 43.

Figura 43: IL-6 plasmático ao final do programa terapêutico nos grupos dieta normal sedentário (Nsed), dieta normal exercitado (Nex), dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em média $\pm$ EPM. Análise estatística: ANOVA. Nsed, $n = 14$; Nex, $n = 12$; Ased, $n = 6$; Aex, $n = 7$.

A atividade da MMP-9 plasmática foi medida somente nos animais que receberam dieta aterogênica. A atividade dessa enzima foi igual nos grupos sedentário (5195 ± 654 unidades arbitrárias) e exercitado (6555 ± 2119 unidades arbitrárias), como é possível observar nas figuras 44 e 45.

Figura 44: Atividade da MMP-9 plasmática ao final do programa terapêutico nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em Média $\pm$ EPM. Análise estatística: Teste t-Student. Ased e Aex, n = 4.

Figura 45: Zimograma representativo da atividade da MMP-9 plasmática ao final do programa terapêutico nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex).

D.2.4. Marcadores Inflamatórios Teciduais

Para investigar se a modulação da atividade de vias de sinalização pró-inflamatórias na placa aterosclerótica, poderiam justificar o efeito do treinamento físico em sua morfologia, foram determinadas no arco aórtico a expressão da MMP-9 tecidual, a via de sinalização CD40/CD40L e a formação de nitrotirosina.

Ao final do programa terapêutico, nenhuma diferença na expressão da MMP-9 nas placas ateroscleróticas foi detectada nos grupos dieta aterogênica sedentário ($16 \pm 3\%$) e dieta aterogênica exercitado ($26 \pm 7\%$), como se observa nas figuras 46 e 47.

Figura 46: Expressão de MMP-9 na placa aterosclerótica ao final do programa terapêutico nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em média $\pm$ EPM. Análise estatística: Teste t-Student. Ased e Aex, $n = 4$.

Figura 47: Fotomicrografias de uma secção longitudinal do arco aórtico. Observa-se a expressão de MMP-9 (em castanho) na placa aterosclerótica representativa dos grupos (A) dieta aterogênica sedentário (Ased) e (B) dieta aterogênica exercitado (Aex) ao final do programa terapêutico. Imunohistoquímica para MMP-9 e contra-coloração por Hematoxilina de Harris. Aumento de 400 x.

As figuras 48 e 49 mostram que a expressão de CD40 nas placas ateroscleróticas parece ser semelhante entre os grupos dieta aterogênica sedentário ($29 \pm 3 \text{ mm}^2$) e dieta aterogênica exercitado ($28 \pm 6 \text{ mm}^2$), mas não foi possível fazer a análise estatística pelo reduzido número de casos.

Figura 48: Expressão de CD40 na placa aterosclerótica ao final do programa terapêutico nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em média $\pm$ EPM. Ased e Aex, $n = 2$.

Figura 49: Fotomicrografias de uma secção longitudinal do arco aórtico. Observa-se a expressão de CD40 (em castanho) na placa aterosclerótica representativa dos grupos (A) dieta aterogênica sedentário (Ased) e (B) dieta aterogênica exercitado (Aex) ao final do programa terapêutico. Imunohistoquímica para CD40 e contra-coloração por Hematoxilina de Harris. Aumento de 400 x.

Nas figuras 50 e 51 se nota que a expressão do ligante de CD40, CD40L, nas placas ateroscleróticas parece ser maior no grupo dieta aterogênica sedentário ($32 \pm 12 \text{ mm}^2$) do que no grupo dieta aterogênica exercitado ($21 \pm 3 \text{ mm}^2$), mas também não foi possível fazer a análise estatística pelo reduzido número de casos.

Figura 50: Expressão de CD40L na placa aterosclerótica ao final do programa terapêutico nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em média $\pm$ EPM. Ased e Aex, $n = 2$.

Figura 51: Fotomicrografias de uma secção longitudinal do arco aórtico. Observa-se a expressão de CD40L (em castanho) na placa aterosclerótica representativa dos grupos (A) dieta aterogênica sedentário (Ased) e (B) dieta aterogênica exercitado (Aex) ao final do programa terapêutico. Imunohistoquímica para CD40L e contra-coloração por Hematoxilina de Harris. Aumento de 400 x.

A medida da formação de nitrotirosina é uma medida indireta da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Os dados das figuras 52 e 53 sugerem que nenhuma diferença na formação de nitrotirosina nas placas ateroscleróticas foi encontrada entre os grupos dieta aterogênica sedentário ($24 \pm 1\%$) e dieta aterogênica exercitado ($30 \pm 6\%$).

Figura 52: Formação de nitrotirosina na placa aterosclerótica ao final do programa terapêutico nos grupos dieta aterogênica sedentário (Ased) e dieta aterogênica exercitado (Aex). Valores expressos em média $\pm$ EPM. Análise estatística: Teste de Mann-Whitney. Ased e Aex, $n = 4$.

Figura 53: Fotomicrografias de uma secção longitudinal do arco aórtico. Observa-se a formação de nitrotirosina (em castanho) na placa aterosclerótica representativa dos grupos (A) dieta aterogênica sedentário (Ased) e (B) dieta aterogênica exercitado (Aex) ao final do programa terapêutico. Imunohistoquímica para nitrotirosina e contra-coloração por Hematoxilina de Harris. Aumento de 400 x.

E. DISCUSSÃO

O efeito do treinamento físico na prevenção e no tratamento das doenças cardiovasculares ateroscleróticas é reconhecido. No entanto, a ação do treinamento físico sobre a formação da placa aterosclerótica ainda não foi devidamente determinado.

No presente trabalho foi investigado o efeito do treinamento físico sobre a placa aterosclerótica, para isso dois estudos foram realizados definidos como preventivo e terapêutico. No primeiro, o treinamento físico foi instituído antes da formação da placa aterosclerótica; no segundo, após o desenvolvimento das placas.

A ação do treinamento físico aeróbico de intensidade moderada sobre a placa aterosclerótica foi benéfica. Esse efeito sobre as características de instabilidade da placa ocorreu de modo diferente no programas preventivo e terapêutico. No entanto, a hipótese deste trabalho de que o treinamento físico modifica o processo inflamatório que ocorre durante a formação da placa aterosclerótica não foi comprovada.

No início dos programas preventivo e terapêutico os camundongos LDLr^{-/-} tinham características semelhantes, mesma idade e massa corporal, frequência cardíaca e pressão arterial caudal iguais. Como o treinamento físico do programa preventivo foi iniciado concomitantemente ao início da dieta aterogênica, os animais atingiram velocidades máximas semelhantes no teste progressivo máximo inicial. Já o treinamento físico do programa terapêutico foi iniciado após 14 semanas do início da dieta, com os animais

do grupo dieta aterogênica apresentando aumento de massa corporal, por isso obtiveram um desempenho pior no teste progressivo máximo inicial em relação aos animais do grupo dieta normal. O treinamento físico aeróbico, de intensidade moderada, com duração de 14 semanas, foi eficaz nos programas preventivo e terapêutico porque os animais treinados, independentemente da dieta administrada, apresentaram bradicardia de repouso, mostrando que adquiriram adaptação fisiológica ao treinamento físico ministrado.

No presente trabalho, o treinamento físico aeróbico não modificou o tamanho da placa aterosclerótica em nenhum dos programas estudados, preventivo e terapêutico, muito provavelmente pelo fato da dieta aterogênica ter sido mantida durante o período de treinamento físico. Ramachandran et al. (2005) [65] demonstraram que o treinamento físico e o retorno à dieta normal foram capazes de reduzir o tamanho da placa aterosclerótica pré-estabelecida por dieta aterogênica em camundongos hipercolesterolêmicos. Napoli et al. (2004) [52] mostraram que o treinamento físico aeróbico, de intensidade moderada, combinado a uma intervenção com L-Arginina e antioxidantes foi capaz de reduzir o tamanho da placa aterosclerótica, apesar da manutenção da dieta aterogênica, em camundongos LDLr-/-. Porém, o presente trabalho é o primeiro a investigar a ação do treinamento físico aeróbico, com a manutenção da dieta aterogênica, sem nenhuma outra intervenção.

Foi observado também que o treinamento físico aeróbico foi capaz de reduzir o conteúdo de gordura da placa aterosclerótica somente no

programa preventivo. No entanto, é interessante notar que o treinamento físico aeróbico provocou uma melhora quantitativa e qualitativa no conteúdo de colágeno em ambos os programas, preventivo e terapêutico. As placas dos animais treinados apresentaram maior porcentagem de colágeno e uma distribuição periférica mais estruturada, que é uma característica de estabilidade. Tais resultados sugerem que o treinamento físico aeróbico produz um efeito negativo sobre os fatores responsáveis pela instabilidade da placa no programa preventivo, e um efeito positivo sobre a estabilidade da placa no programa preventivo e terapêutico, por serem respectivamente, o conteúdo de gordura e de colágeno, importantes marcadores de instabilidade e estabilidade da placa aterosclerótica [16, 66].

Kramsch et al. (1981) [67] estudaram o efeito de treinamento físico aeróbico, de intensidade moderada, sobre o desenvolvimento da doença arterial coronariana em macacos submetidos à dieta aterogênica. Nenhuma redução nos níveis plasmáticos de colesterol foi observada, mas o treinamento físico provocou um aumento na deposição de colágeno nas placas ateroscleróticas das artérias coronárias. Napoli et al. (2006) [68] mostraram que o treinamento físico aeróbico, de intensidade moderada, combinado a uma tratamento metabólico (L-Arginina e antioxidantes) foi capaz de reduzir a instabilidade das placas ateroscleróticas em camundongos hipercolesterolêmicos. Em humanos, estudos epidemiológicos mostraram um efeito protetor do treinamento físico aeróbico, de baixa a moderada intensidade, associado a uma dieta saudável, no desenvolvimento e progressão da doença aterosclerótica [39, 69]. Mas dados que

correlacionem exercício físico e deposição de colágeno na parede vascular são escassos em humanos.

O Consenso do American Heart Association (AHA) de 2003 [39] sobre Cardiologia, Nutrição e Atividade Física enfatiza o uso do treinamento físico na prevenção primária ou secundária da doença aterosclerótica por agir positivamente na redução e no controle de muitos dos fatores de risco para a aterosclerose. A obesidade é considerada pelo AHA como o principal fator de risco modificável para a DAC [70]. No presente trabalho foi evidenciado que o treinamento físico aeróbico evitou o ganho de massa corporal provocado pela dieta aterogênica no programa preventivo, mas não foi capaz de promover a perda de massa corporal, ganha em 14 semanas de dieta aterogênica, no programa terapêutico. Diversos estudos mostraram que para a redução de massa corporal ser mais eficaz é necessário associar ao treinamento físico uma dieta alimentar com restrição calórica [71-73], o que não foi o caso do presente estudo, pois em ambos os programas a dieta aterogênica foi mantida durante o período de treinamento físico aeróbico.

Animais com deficiência do receptor de LDL apresentam níveis plasmáticos de colesterol total próximos dos normais quando alimentados com uma dieta normal, mas a administração de uma dieta aterogênica provocou aumento nestes parâmetros. O treinamento físico aeróbico foi capaz de evitar parcialmente a hipercolesterolemia apenas no programa preventivo, além de não ter produzido qualquer alteração no perfil das frações de colesterol em ambos os programas. Tal fato pode estar

relacionado à manutenção da dieta rica em gordura e colesterol durante o período de treinamento físico e ao ganho de massa corporal principalmente no programa terapêutico. Vários estudos mostraram que a redução do colesterol plasmático, frações de LDL e triglicérides é mais eficaz quando o treinamento físico é associado a uma redução de massa corporal [74-77].

O exercício físico aeróbico, agudo ou crônico, é capaz de reduzir a pressão arterial em pacientes hipertensos [78, 79]. O efeito hipotensivo do exercício físico também é observado em indivíduos normotensos e em idosos [80, 81], em ratos normais e em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) [82, 83]. Camundongos LDLr^{-/-} possuem níveis pressóricos normais, mas por não existirem relatos na literatura do comportamento da pressão arterial quando esses camundongos são submetidos a um programa de treinamento físico aeróbico, a pressão arterial caudal foi analisada neste trabalho. Foi observado que o comportamento hipotensivo do exercício físico crônico também ocorreu nos camundongos LDLr^{-/-} nos programas preventivo e terapêutico.

No presente estudo, o treinamento físico aeróbico, de intensidade moderada, foi capaz de exercer uma ação benéfica sobre o controle dos fatores de risco, massa corporal e colesterol total, apenas no programa preventivo.

A indução de hipercolesterolemia pela administração de uma dieta aterogênica provocou aumento nas concentrações plasmáticas de IL-6 apenas no programa preventivo. Como a IL-6 está relacionada com a

instabilidade da placa aterosclerótica [26, 27], tal fato pode ser explicado pelo conteúdo de gordura nas placas dos animais mais jovens, programa preventivo, ter sido maior do que nos animais mais velhos, programa terapêutico. O treinamento físico não alterou a concentração plasmática dessa citocina nos programas preventivo e terapêutico. Nenhuma diferença nas concentrações plasmáticas de $\text{TNF-}\alpha$ foi observada nos programas preventivo e terapêutico pela indução de hipercolesterolemia. Aqui também o treinamento físico não provocou nenhuma alteração nesses parâmetros. No presente estudo, parece não haver relação entre o efeito benéfico do treinamento físico aeróbico sobre a placa aterosclerótica com o controle da atividade inflamatória sistêmica.

Pedersen et al. (2006) [84] mostraram que o exercício físico regular induz ações antiinflamatórias. Durante o exercício a IL-6, produzida pelas fibras musculares, estimula a produção de citocinas antiinflamatórias como IL-1-ra e IL-10 e inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias como o $\text{TNF-}\alpha$. Alguns estudos corroboram esses achados [85-87]. No entanto, outros autores [88, 89] afirmaram que somente a associação entre o treinamento físico e a redução da massa corporal é capaz de produzir ações antiinflamatórias.

Dados que correlacionem treinamento físico e MMP-9 são escassos na literatura. Os aumentos da síntese intramuscular de MMP-9 e da sua atividade de degradação do colágeno foram detectados após sessões de exercício físico aeróbico de alta intensidade [90, 91]. Mas, este fenômeno deve ser relacionado à injúria muscular provocada pelo exercício e não pode

ser extrapolado para a inflamação que ocorre nas placas ateroscleróticas. No entanto, no presente estudo foi observado que o treinamento físico aeróbico não provocou nenhuma alteração na atividade da MMP-9 plasmática e na expressão da MMP-9 na placa aterosclerótica nos programas preventivo e terapêutico. Em conjunto, esses dados sugerem que o treinamento físico aeróbico não altera a deposição de colágeno na placa pela ação da MMP-9. Outros fatores devem estar relacionados à maior deposição de colágeno encontrada nas placas dos animais treinados em ambos os programas.

A via de sinalização CD40/CD40L tem um importante papel não apenas na imunidade celular e inflamação, mas também na fisiopatologia da aterosclerose [32-34]. O presente trabalho mostrou que, no programa preventivo, o treinamento físico aeróbico diminuiu a expressão de CD40 na placa aterosclerótica, mas que curiosamente não alterou de modo significativo a expressão do seu ligante, o CD40L. No programa terapêutico, o treinamento físico aeróbico pareceu não alterar a expressão de CD40, assim como pareceu diminuir a expressão de CD40L, mas não foi possível fazer a análise estatística pelo reduzido número de casos estudados.

Geertsema et al. (2008) [92] mostraram que atletas de *ultra-endurance* apresentaram diminuição dos níveis plasmáticos de CD40L. Essa ação do treinamento físico sobre a via de sinalização CD40/CD40L é também relatada em doentes. Devries et al. (2008) [93] em um estudo com pacientes com insuficiência cardíaca moderada mostraram que o treinamento físico aeróbico é capaz de reduzir os níveis plasmáticos de

CD40L, apesar de nenhuma alteração nas concentrações plasmáticas de TNF- α ter sido observado. Um ano após o término do treinamento, os níveis plasmáticos de CD40L retornaram aos níveis de antes do treinamento físico.

Diversos estudos mostraram que o aumento do metabolismo aeróbico durante o exercício físico é uma fonte de estresse oxidativo. No entanto, as progressivas adaptações ao exercício físico regular podem diminuir o estresse oxidativo sistêmico e reduzir o risco cardiovascular [42, 94-96]. Paradoxalmente, o estresse oxidativo induzido pelo exercício físico pode ser um fator de proteção contra a disfunção vascular e a aterogênese por induzir respostas antioxidantes vasculares. Napoli et al. (2004) (2006) [52, 68] mostraram que o treinamento físico aeróbico moderado em camundongos LDLr-/- aumenta a biodisponibilidade do óxido nítrico, por meio do aumento da expressão da óxido nítrico sintase, além de melhorar a atividade das defesas antioxidantes. No presente trabalho, foi medida a formação de nitrotirosina que é uma medida indireta da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Foi observado que o treinamento físico aeróbico não interferiu na formação da nitrotirosina nos programas preventivo e terapêutico.

As evidências de que o treinamento físico é um fator de proteção contra a doença arterial coronariana são circunstanciais, porque as evidências diretas dos benefícios do treinamento físico sobre a placa aterosclerótica em humanos são difíceis de obter, por isso modelos animais têm sido utilizados para esse fim. Ainda não se sabe a relevância que o estudo da evolução da aterosclerose em um modelo animal traria para o

entendimento da ruptura das placas ateroscleróticas humanas, uma vez que eventos trombóticos ainda não estão bem estabelecidos em modelos animais. A necessidade de um modelo animal em que se possa estudar os eventos que levam à ruptura da placa e o próprio processo de ruptura continua a existir [18, 19].

No entanto, o uso de camundongos com deficiência do receptor de LDL (LDLr^{-/-}) permite o estudo da aterogênese, uma vez que este modelo animal de hipercolesterolemia caracteriza-se pela formação de placas ateroscleróticas somente quando alimentados com uma dieta rica em gordura e colesterol. Histologicamente, as placas que se desenvolvem nesses animais assemelham-se às aquelas observadas em humanos [18, 19]. A formação de capa fibrosa e a apoptose de macrófagos no núcleo necrótico estão bem descritos nesses modelos animais em experimentos bem idealizados e por isso sua relevância pode ser testada com dados humanos.

O presente estudo demonstrou que o treinamento físico, executado precocemente, isto é, desde o início do desenvolvimento da hipercolesterolemia pode modificar benéficamente os fatores de risco e a morfologia da placa aterosclerótica, mesmo que a dieta rica em gordura e colesterol seja mantida. Na doença já estabelecida, com a manutenção da dieta, os efeitos do treinamento físico são menos evidentes. Comparando esses achados com os de outros autores, pode-se sugerir que o treinamento físico, isoladamente, não é um tratamento adequado para a aterosclerose, devendo ser associado a outras medidas, principalmente a correção, medicamentosa ou não, dos teores de gordura e colesterol da dieta.

F. CONCLUSÕES

- ❖ No programa preventivo, o treinamento físico aeróbico, de intensidade moderada:
 - Não alterou o tamanho da placa aterosclerótica, mas reduziu o conteúdo de gordura e aumentou o conteúdo de colágeno das placas;
 - Evitou o ganho de massa corporal, diminuiu a pressão arterial caudal, evitou o aumento do colesterol total, mas não modificou as frações;
 - Não provocou alterações nas citocinas plasmáticas TNF- α e IL-6 e na atividade da MMP-9 plasmática;
 - Diminuiu a expressão de CD40 na placa aterosclerótica, mas não alterou a expressão de CD40L, a expressão da MMP-9 e a formação da nitrotirosina nas placas.

- ❖ No programa terapêutico, o treinamento físico aeróbico, de intensidade moderada:
 - Não alterou o tamanho e o conteúdo de gordura da placa aterosclerótica, mas aumentou o conteúdo de colágeno da placa;
 - Diminuiu a pressão arterial caudal, mas não provocou a perda de massa corporal, não diminuiu o colesterol total plasmático e não modificou as frações;
 - Não provocou alterações nas citocinas plasmáticas TNF- α e IL-6 e na atividade da MMP-9 plasmática;
 - Não alterou a expressão da MMP-9 e a formação da nitrotirosina nas placas ateroscleróticas e devido ao reduzido número de casos, não foi possível tirar conclusões a respeito da expressão da via de sinalização CD40/CD40L na placa aterosclerótica.

Referências

1. Ministério da Saúde. Informações hospitalares do DataSus. [aceso em 03/06/2008]. Disponível em <http://www.datasus.gov.br/>.
2. Organização Mundial da Saúde. [acesso em 03/06/2008]. Disponível em <http://www.who.int/research/en/>.
3. Naghavi, M., et al., *From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II*. Circulation, 2003. **108**(15): p. 1772-8.
4. Naghavi, M., et al., *From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I*, in Circulation. 2003. p. 1664-72.
5. Strong, J.P., *Atherosclerotic lesions. Natural history, risk factors, and topography*. Arch Pathol Lab Med, 1992. **116**(12): p. 1268-75.
6. Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arq Bras Cardiol, 2007. **88**(Supl I): p. 2-19.
7. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. **70**(10): p. 2804-8.
8. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
9. Libby, P., *Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art*. Am J Cardiol, 2003. **91**(3A): p. 3A-6A.
10. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 233-41.
11. Sevanian, A., L. Asatryan, and O. Ziouzenkova, *Low density lipoprotein (LDL) modification: basic concepts and relationship to atherosclerosis*. Blood Purif, 1999. **17**(2-3): p. 66-78.
12. Napoli, C., et al., *Nitric oxide and atherosclerosis: an update*. Nitric Oxide, 2006. **15**(4): p. 265-79.
13. Hulthe, J., et al., *Circulating ICAM-1 (intercellular cell-adhesion molecule 1) is associated with early stages of atherosclerosis development and with inflammatory cytokines in healthy 58-year-old men: the Atherosclerosis and Insulin Resistance (AIR) study*. Clin Sci (Lond), 2002. **103**(2): p. 123-9.
14. Frostegard, J., et al., *Oxidized low density lipoprotein induces differentiation and adhesion of human monocytes and the monocytic cell line U937*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(3): p. 904-8.
15. Hulthe, J. and B. Fagerberg, *Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR Study)*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(7): p. 1162-7.
16. Fishbein, M.C., *The vulnerable and unstable atherosclerotic plaque*. Cardiovasc Pathol, 2008.

17. Glagov, S., et al., *Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries*. N Engl J Med, 1987. **316**(22): p. 1371-5.
18. Schwartz, S.M., et al., *Plaque rupture in humans and mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(4): p. 705-13.
19. Jackson, C.L., et al., *Assessment of unstable atherosclerosis in mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(4): p. 714-20.
20. Blake, G.J., *Inflammatory biomarkers of the patient with myocardial insufficiency*. Curr Opin Crit Care, 2003. **9**(5): p. 369-74.
21. Blake, G.J. and P.M. Ridker, *Novel clinical markers of vascular wall inflammation*. Circ Res, 2001. **89**(9): p. 763-71.
22. Koenig, W. and N. Khuseynova, *Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(1): p. 15-26.
23. Ferrari, R., *The role of TNF in cardiovascular disease*. Pharmacol Res, 1999. **40**(2): p. 97-105.
24. Ridker, P.M., et al., *Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction*. Circulation, 2000. **101**(18): p. 2149-53.
25. Montero-Julian, F.A., *The soluble IL-6 receptors: serum levels and biological function*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2001. **47**(4): p. 583-97.
26. Biasucci, L.M., et al., *Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina*. Circulation, 1996. **94**(5): p. 874-7.
27. Biasucci, L.M., et al., *Increasing levels of interleukin (IL)-1Ra and IL-6 during the first 2 days of hospitalization in unstable angina are associated with increased risk of in-hospital coronary events*. Circulation, 1999. **99**(16): p. 2079-84.
28. Ridker, P.M., et al., *Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men*. Circulation, 2000. **101**(15): p. 1767-72.
29. Mach, F., et al., *Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(5): p. 1931-6.
30. van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(1): p. 2-17.
31. Santilli, F., et al., *CD40/CD40L system and vascular disease*. Intern Emerg Med, 2007. **2**(4): p. 256-68.
32. Yellin, M.J., et al., *Functional interactions of T cells with endothelial cells: the role of CD40L-CD40-mediated signals*. J Exp Med, 1995. **182**(6): p. 1857-64.
33. Phipps, R.P., *Atherosclerosis: the emerging role of inflammation and the CD40-CD40 ligand system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(13): p. 6930-2.
34. Schonbeck, U. and P. Libby, *CD40 signaling and plaque instability*. Circ Res, 2001. **89**(12): p. 1092-103.

35. Heeschen, C., et al., *Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes*. N Engl J Med, 2003. **348**(12): p. 1104-11.
36. Varo, N., et al., *Soluble CD40L: risk prediction after acute coronary syndromes*. Circulation, 2003. **108**(9): p. 1049-52.
37. Aukrust, P., et al., *Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes*. Circulation, 1999. **100**(6): p. 614-20.
38. Ohashi, Y., et al., *Soluble CD40 ligand and interleukin-6 in the coronary circulation after acute myocardial infarction*. Int J Cardiol, 2006. **112**(1): p. 52-8.
39. Thompson, P.D., et al., *Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: a statement from the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention) and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity)*. Circulation, 2003. **107**(24): p. 3109-16.
40. Pina, I.L., et al., *Exercise and heart failure: A statement from the American Heart Association Committee on exercise, rehabilitation, and prevention*. Circulation, 2003. **107**(8): p. 1210-25.
41. Ades, P.A., *Cardiac rehabilitation and secondary prevention of coronary heart disease*. N Engl J Med, 2001. **345**(12): p. 892-902.
42. Chevion, S., et al., *Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(9): p. 5119-23.
43. Goto, C., et al., *Effect of different intensities of exercise on endothelium-dependent vasodilation in humans: role of endothelium-dependent nitric oxide and oxidative stress*. Circulation, 2003. **108**(5): p. 530-5.
44. Sanchez-Quesada, J.L., et al., *Increase of LDL susceptibility to oxidation occurring after intense, long duration aerobic exercise*. Atherosclerosis, 1995. **118**(2): p. 297-305.
45. Benitez, S., et al., *Changes in low-density lipoprotein electronegativity and oxidizability after aerobic exercise are related to the increase in associated non-esterified fatty acids*. Atherosclerosis, 2002. **160**(1): p. 223-32.
46. Liu, M.L., et al., *A marathon run increases the susceptibility of LDL to oxidation in vitro and modifies plasma antioxidants*. Am J Physiol, 1999. **276**(6 Pt 1): p. E1083-91.
47. Brites, F.D., et al., *Soccer players under regular training show oxidative stress but an improved plasma antioxidant status*. Clin Sci (Lond), 1999. **96**(4): p. 381-5.
48. Evelson, P., et al., *Higher antioxidant defences in plasma and low density lipoproteins from rugby players*. Eur J Clin Invest, 2002. **32**(11): p. 818-25.
49. Sanchez-Quesada, J.L., et al., *LDL from aerobically-trained subjects shows higher resistance to oxidative modification than LDL from sedentary subjects*. Atherosclerosis, 1997. **132**(2): p. 207-13.

50. Vasankari, T., et al., *Reduced mildly oxidized LDL in young female athletes*. *Atherosclerosis*, 2000. **151**(2): p. 399-405.
51. Meilhac, O., et al., *Role of arterial wall antioxidant defense in beneficial effects of exercise on atherosclerosis in mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. **21**(10): p. 1681-8.
52. Napoli, C., et al., *Long-term combined beneficial effects of physical training and metabolic treatment on atherosclerosis in hypercholesterolemic mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(23): p. 8797-802.
53. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). In: <http://www.cobea.org.br/index.php>.
54. *Science in the Service of Animal Welfare*. UFAW (The Universities Federation for Animals Welfare) In: <http://www.ufaw.org.uk/>
55. Lichtman, A.H., et al., *Hyperlipidemia and atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice fed defined semipurified diets with and without cholate*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(8): p. 1938-44.
56. Reeves, P.G., F.H. Nielsen, and G.C. Fahey, Jr., *AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet*. *J Nutr*, 1993. **123**(11): p. 1939-51.
57. Ferreira, J.C.R., N.; Graná, O.; Bartholomeu, J.B.; Brum, P.C. , *Padronização da intensidade de treinamento físico aeróbio em esteira para camundongos*. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo*, 2004. **14**(3): p. 74.
58. Paigen, B., et al., *Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice*. *Atherosclerosis*, 1987. **68**(3): p. 231-40.
59. Rubin, E.M., et al., *Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI*. *Nature*, 1991. **353**(6341): p. 265-7.
60. Junqueira, L.C.U., *Histologia Básica*. 11a ed. 2008, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
61. Jiao, S., et al., *Genetic heterogeneity of lipoproteins in inbred strains of mice: analysis by gel-permeation chromatography*. *Metabolism*, 1990. **39**(2): p. 155-60.
62. Baar, J.P.A., *A manual of morphometry in diagnostic pathology*. 1983, Berlin: Springer Verlag. pp. 105-108.
63. Fakhouri, R., et al., *Nodular leprosy of childhood and tuberculoid leprosy: a comparative, morphologic, immunopathologic and quantitative study of skin tissue reaction*. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 2003. **71**(3): p. 218-26.
64. Rosner, B., *FUNDAMENTALS OF BIOSTATISTICS*. 4 ed. 1994, New York: Duxbury Press. 682p
65. Ramachandran, S., et al., *Exercise reduces preexisting atherosclerotic lesions in LDL receptor knock out mice*. *Atherosclerosis*, 2005. **178**(1): p. 33-8.
66. Libby, P. and M. Aikawa, *New insights into plaque stabilisation by lipid lowering*. *Drugs*, 1998. **56 Suppl 1**: p. 9-13; discussion 33.

67. Kramsch, D.M., et al., *Reduction of coronary atherosclerosis by moderate conditioning exercise in monkeys on an atherogenic diet*. N Engl J Med, 1981. **305**(25): p. 1483-9.
68. Napoli, C., 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): p. 10479-84.
69. Ignarro, L.J., M.L. Balestrieri, and C. Napoli, *Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: an update*. Cardiovasc Res, 2007. **73**(2): p. 326-40.
70. Mooradian, A.D., et al., *Obesity-related changes in high-density lipoprotein metabolism*. Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(6): p. 1152-60.
71. Weiss, E.P., et al., *Caloric restriction but not exercise-induced reductions in fat mass decrease plasma triiodothyronine concentrations: a randomized controlled trial*. Rejuvenation Res, 2008. **11**(3): p. 605-9.
72. Linke, A., S. Mobius-Winkler, and R. Hambrecht, *[Exercise training in the treatment of coronary artery disease and obesity]*. Herz, 2006. **31**(3): p. 224-33.
73. Johannsen, D.L., L.M. Redman, and E. Ravussin, *The role of physical activity in maintaining a reduced weight*. Curr Atheroscler Rep, 2007. **9**(6): p. 463-71.
74. Fonong, T., et al., *Relationship between physical activity and HDL-cholesterol in healthy older men and women: a cross-sectional and exercise intervention study*. Atherosclerosis, 1996. **127**(2): p. 177-83.
75. Ben Ounis, O., et al., *Effects of two-month physical-endurance and diet-restriction programmes on lipid profiles and insulin resistance in obese adolescent boys*. Diabetes Metab, 2008.
76. Suchanek, P., et al., *Changes of Plasma Lipids during Weight Reduction in Females Depends on APOA5 Variants*. Ann Nutr Metab, 2008. **53**(2): p. 104-108.
77. King, R.F., et al., *Low-density lipoprotein sub-fraction profiles in obese children before and after attending a residential weight loss intervention*. J Atheroscler Thromb, 2008. **15**(2): p. 100-7.
78. *Controlling hypertension is crucial for heart patients. A healthy diet and regular exercise will help reduce blood pressure and lower your risk of stroke and future cardiac events*. Heart Advis, 2008. **11**(6): p. 5, 7.
79. Suzuki, S. and T. Ohta, *[Exercise therapy for patients with mild hypertension]*. Nippon Rinsho, 2008. **66**(8): p. 1553-9.
80. Manfredini, F., et al., *Sport Therapy for Hypertension: Why, How, and How Much?* Angiology, 2008.
81. Barone, B.B., et al., *Decreased exercise blood pressure in older adults after exercise training: contributions of increased fitness and decreased fatness*. Br J Sports Med, 2008.

82. Brum, P.C., et al., *Exercise training increases baroreceptor gain sensitivity in normal and hypertensive rats*. Hypertension, 2000. **36**(6): p. 1018-22.
83. Krieger, E.M., P.C. Brum, and C.E. Negrao, *State-of-the-Art lecture: influence of exercise training on neurogenic control of blood pressure in spontaneously hypertensive rats*. Hypertension, 1999. **34**(4 Pt 2): p. 720-3.
84. Pedersen, B.K., *The anti-inflammatory effect of exercise: its role in diabetes and cardiovascular disease control*. Essays Biochem, 2006. **42**: p. 105-17.
85. Kohut, M.L., et al., *Aerobic exercise, but not flexibility/resistance exercise, reduces serum IL-18, CRP, and IL-6 independent of beta-blockers, BMI, and psychosocial factors in older adults*. Brain Behav Immun, 2006. **20**(3): p. 201-9.
86. Thomas, N.E. and D.R. Williams, *Inflammatory factors, physical activity, and physical fitness in young people*. Scand J Med Sci Sports, 2008.
87. Dekker, M.J., et al., *An exercise intervention without weight loss decreases circulating interleukin-6 in lean and obese men with and without type 2 diabetes mellitus*. Metabolism, 2007. **56**(3): p. 332-8.
88. You, T. and B.J. Nicklas, *Chronic inflammation: role of adipose tissue and modulation by weight loss*. Curr Diabetes Rev, 2006. **2**(1): p. 29-37.
89. Devries, M.C., et al., *Endurance training without weight loss lowers systemic, but not muscle, oxidative stress with no effect on inflammation in lean and obese women*. Free Radic Biol Med, 2008. **45**(4): p. 503-11.
90. Koskinen, S.O., et al., *Physical exercise can influence local levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tendon-related connective tissue*. J Appl Physiol, 2004. **96**(3): p. 861-4.
91. Koskinen, S.O., et al., *Acute exercise induced changes in rat skeletal muscle mRNAs and proteins regulating type IV collagen content*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001. **280**(5): p. R1292-300.
92. Geertsema, L., et al., *The cardiovascular risk factor, soluble CD40 Ligand (CD154), but not soluble CD40, is lowered by ultra-endurance exercise in athletes*. Br J Sports Med, 2008.
93. Bjornstad, H.H., et al., *Exercise training decreases plasma levels of soluble CD40 ligand and P-selectin in patients with chronic heart failure*. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, 2008. **15**(1): p. 43-8.
94. Leeuwenburgh, C. and J.W. Heinecke, *Oxidative stress and antioxidants in exercise*. Curr Med Chem, 2001. **8**(7): p. 829-38.
95. Vincent, K.R., et al., *Resistance exercise training attenuates exercise-induced lipid peroxidation in the elderly*. Eur J Appl Physiol, 2002. **87**(4-5): p. 416-23.
96. Leaf, D.A., et al., *The exercise-induced oxidative stress paradox: the effects of physical exercise training*. Am J Med Sci, 1999. **317**(5): p. 295-300.

ANEXO 1

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 13.07.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 393/05, intitulado: "Efeito do treinamento com exercício físico na modulação do processo inflamatório característico da aterosclerose em camundongos LDLr-/- hipercolesterolêmicos" apresentado pela CLÍNICA MÉDICA.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parcial e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: Drº Heraldo Possolo de Souza

Pesquisador(a) Executante: Themis Moura Cardinot

CAPPesq, 13 de Julho de 2005.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

ANEXO 2

Anexo 2: Composição da dieta aterogênica

COMPONENTE	QUANTIDADE
CARBOIDRATOS	51,56%
PROTEÍNAS (CASEÍNA COMERCIAL)	17%
LIPÍDIOS	18%: Gordura de coco – 12% Óleo de soja – 4,75% Colesterol – 1,25%
FIBRAS	5%
MISTURA DE MINERAIS	3,5%
MISTURA DE VITAMINAS	1%

ANEXO 3

Anexo 3: Protocolo de treinamento físico em esteira rolante para camundongos

Frequência (dias)	Duração (min)	Velocidade 15 m/min				
		Aquecimento	Corrida	Recuperação		
SEMANA 1						
1	30		5m/min (10)	10m/min (10)	8m/min (10)	
2	30	5m/min (5)	8m/min (5)	12m/min (10)	8m/min (5)	5m/min (5)
3	35	5m/min (5)	8m/min (5)	12m/min (15)	8m/min (5)	5m/min (5)
4	35	6m/min (5)	8m/min (5)	12m/min (15)	8m/min (5)	5m/min (5)
5	40	7m/min (5)	10m/min (5)	15m/min (20)	10m/min (5)	5m/min (5)
SEMANA 2						
1	40	7m/min (5)	10m/min (5)	15m/min (20)	10m/min (5)	7m/min (5)
2	40	8m/min (5)	12m/min (5)	15m/min (20)	12m/min (5)	8m/min (5)
3	45	8m/min (5)	12m/min (5)	15m/min (25)	12m/min (5)	8m/min (5)
4	45	8m/min (5)	12m/min (5)	15m/min (25)	12m/min (5)	8m/min (5)
5	50	8m/min (5)	12m/min (5)	15m/min (30)	12m/min (5)	8m/min (5)
SEMANA 3						
1	50	8m/min (5)	12m/min (5)	15m/min (30)	12m/min (5)	8m/min (5)
2	55	8m/min (5)	12m/min (5)	15m/min (35)	12m/min (5)	8m/min (5)
3	60	8m/min (5')	12m/min (5)	15m/min (40)	12m/min (5)	8m/min (5)
4	60	8m/min (5)	12m/min (5)	15m/min (40)	12m/min (5)	8m/min (5)
5	60	8m/min (5)	12m/min (5)	15m/min (40)	12m/min (5)	8m/min (5)
SEMANA 4						
1	60	8m/min (5)	12m/min (5)	15m/min (40)	12m/min (5)	8m/min (5)
2	60	8m/min (5)	12m/min (5)	15m/min (40)	12m/min (5)	8m/min (5)
3	60	8m/min (5)	12m/min (5)	15m/min (40)	12m/min (5)	8m/min (5)
4	60	8m/min (5)	12m/min (5)	15m/min (40)	12m/min (5)	8m/min (5)
5	60	8m/min (5)	12m/min (5)	15m/min (40)	12m/min (5)	8m/min (5)
SEMANA 5						
1	60	8m/min (5)	12m/min (5)	15m/min (40)	12m/min (5)	8m/min (5)
2	60	8m/min (5)	12m/min (5)	15m/min (40)	12m/min (5)	8m/min (5)
3	60	8m/min (5)	12m/min (5)	15m/min (40)	12m/min (5)	8m/min (5)
4	60	8m/min (5)	12m/min (5)	15m/min (40)	12m/min (5)	8m/min (5)
5	60	8m/min (5)	12m/min (5)	15m/min (40)	12m/min (5)	8m/min (5)
SEMANA 6						
1	60	8m/min (5)	12m/min (5)	15m/min (40)	12m/min (5)	8m/min (5)
2	60	8m/min (5)	12m/min (5)	15m/min (40)	12m/min (5)	8m/min (5)
3	60	8m/min (5)	12m/min (5)	15m/min (40)	12m/min (5)	8m/min (5)
4	60	8m/min (5)	12m/min (5)	15m/min (40)	12m/min (5)	8m/min (5)
5	60	8m/min (5)	12m/min (5)	15m/min (40)	12m/min (5)	8m/min (5)

REAValiação ATRAVÉS DO TESTE MÁXIMO