

Débora Dias Ferraretto Moura Rocco

**O treinamento físico aeróbico acelera o
transporte reverso de colesterol de macrófagos em
camundongos selvagens e transgênicos para CETP
humana**

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

Área de concentração: Endocrinologia

Orientadora: Profa Dra. Marisa Passarelli

São Paulo

2010

Este estudo foi realizado no Laboratório de Investigação Médica (LIM-10) – Laboratório de Lípidos da Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Este projeto foi desenvolvido com Bolsa de Mestrado proveniente da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e Bolsa de Doutorado proveniente da CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Dedicatória

Dedico esta tese aos meus familiares. À minha mãe, Marinês Dias Ferraretto, e ao meu pai, Enéas Antonio Rocco, pelo amor, entusiasmo e apoio dedicados a mim e à minha querida irmã, Renata Dias Ferraretto Moura Rocco, pelo carinho, amor e amizade.

Agradecimentos

É com muito carinho que agradeço à minha orientadora Dra Marisa Passarelli, à sua super orientação. Faltam-me palavras para escrever tudo o que gostaria, pois esses 5 anos de convívio com esta grande pesquisadora e professora, se refletiram num aprendizado que vai muito além do metabolismo de lípidos. Aprendi a pensar de forma mais crítica e racional, tomei consciência do que é e de como se faz pesquisa científica, aprendi muita fisiologia e biologia. Sentirei saudade de todos os momentos que passei com a Marisa, seja escrevendo, treinando aula, discutindo experimento ou falando besteira! Muito Obrigada!

Presto meus sinceros agradecimentos ao Dr Sérgio Catanozi, um grande pesquisador dedicado e extremamente competente, que me ensinou toda a parte prática do manejo e cuidado com os animais. Foi muito prazeroso trabalhar e conviver com esse palestrino incorrigível. Levarei o Catanozi na minha vida e no meu coração para sempre!

Agradeço à Dra Edna R Nakandakare, chefe do laboratório, pela oportunidade e confiança em mim depositada. A Dra Edna é uma chefe de laboratório acessível aos alunos, e que mantém um ambiente de trabalho e convívio muito agradável.

Agradeço ao Dr Eder CR Quintão, principalmente, pelo estímulo à pesquisa que ele representou na minha vida! Foi muito entusiasmante conviver durante esses anos com um homem de competência e inteligência indiscutível, e que ama o que faz. Muito obrigada pela presença em diversos momentos da minha pesquisa e constante interesse nos resultados.

Agradeço à Ligia S Okuda, Liginha, grande companheira que me auxiliou em grande parte dos meus experimentos, foi sempre muito companheira e muito solícita a ajudar em qualquer coisa que fosse necessária. Aprendi a ser mais caprichosa e pacienciosa com esta amiga! Muito obrigada pelas conversas e desabafos durante os nossos extensos experimentos, sua companhia tornou momentos difíceis em momentos agradáveis!

Caríssimo Raphael de Souza Pinto, muito obrigado pelos ensinamentos, força em diferentes experimentos e muita risada e conversas que tivemos esses anos! São inesquecíveis aqueles géis de manhã cedo, que poderiam ser chatos, devido à cansativa metodologia, no entanto foram manhãs maravilhosas, com direito a muita cantoria, de diversos generos musicais! Grande amigo que passa de um co-autor do meu trabalho e fica como um grande amigo para o resto da minha vida!

Quero agradecer com muita força ao Alexandre Galvão da Silva, meu marido, Meu Rei! Você foi, e é, fundamental em todo esse difícil processo que é a pós graduação! Muito obrigada pelas conversas, risadas, conselhos,

paciência e até mesmo, por ter me colocado em contato com minha orientadora, até nisso você esteve presente! Cresci muito ao seu lado esses anos, e nossa caminhada pela vida ainda é muito longa! “Se todos fossem iguais a você, que maravilha seria viver!”

Á minha mãe, muito obrigada. Você é, muito companheira, uma mãe a moda antiga, que está sempre lá, se tem uma pessoa que eu sei que posso contar na minha vida, essa pessoa é minha mãe! Sua presença foi muito importante para o desenvolvimento desta pesquisa, incluindo-se sua companhia na minha apresentação, em Boston, que foi divertida e me deixou muito tranquila!

Agradeço ao meu pai, primeiramente por ele ser esse pai tão pai, que vibra todas as minhas conquistas e chora junto comigo se alguma coisa não vai bem. Muito obrigada por esses anos de apoio, incentivo e amor! Tenho esse estímulo do meu pai para tudo que decido fazer, ele encara os desafios comigo, desde que sou pequena é assim! Até experimento no laboratório ele fez comigo. Esses de anos de desenvolvimento e agora conclusão da tese são nossos!

Agradeço a uma pessoa que espiritualmente fez a tese comigo, minha irmã. Nós temos uma conexão tão forte, que em todos os momentos importantes da minha vida ela está comigo! Grande companheira! Não imagino minha vida sem você! Com seus comentários muito engraçados, e nossas

reflexões sobre a vida, sou uma pessoa mais feliz! Agradeço às duas coisinha mais lindas da Tia Dé, Bela e Malu ou Malu e Bela! Elas alegam o dia de qualquer um, foi muito bom, por várias vezes, passar o dia fazendo experimento e depois no final da tarde ir curtir minhas gatas garotas!

Não poderia deixar de comentar de uma pessoa que eu conheci no laboratório e que é simplesmente VIDA!!!! Gabriela Castilho!!!! Gab,é bióloga doutoranda do laboratório, que me ensinou muita biologia, ela é inteligentíssima, sabe muita fisiologia, e ainda por cima é uma amiga como poucas. Zila, você é muito especial para mim, sentirei falta desse contato diário com a sua pessoa!

Obrigada Fabiana D Ferreira pela força que vem me deu nesses últimos experimentos, uma correria final, só para dar emoção! Agradeço também pela amizade e convivência muito gostosa que tivemos esses anos no laboratório. Fabi é uma excelente profissional que com certeza vai longe na carreira!

Agradeço também a Valéria S Nunes pelo auxílio em alguns experimentos e muitas explicações e muita paciência com essas explicações, pois minha formação em Educação Física dificulta o entendimento de técnicas que a Val faz com o pé nas costas!

Obrigada Patrícia Cazita, turma da CETP, pela força que me deu com a colônia de camundongos transgênicos para CETP, além do carinho e de muitas conversas durante esses anos!

Adriana P Machado, muito querida e solícita, obrigada pela ajuda prática no dia-a-dia, e também pelas conversas e desabafos!

Rodrigo T Iborra, companheiro de profissão no laboratório, abriu a linha de pesquisa de exercício junto a nossa orientadora (e a Isabel Dias também), agradeço a paciência e ajuda que me deu em termos práticos desde meu ingresso no laboratório!

Obrigada Ana Maria Lottengerb por todo carinho, com seu jeito querido, direta ou indiretamente você sempre ajuda quem está ao seu redor.

Presto meus agradecimentos às colegas de pós graduação, companheiras de trabalho e de alguns momentos de lazer também, Patrícia P Rios, Ângela Godoy, Roberta Machado e Camila Canteiro

Jussara Rocha, agradeço aos bons momentos e conversas e as explicações metodológicas.

Obrigada Claudia Souza e Senária Egutti pelo auxílio prático e pelas boas risadas que demos esses anos. Cada uma com suas características, mas

ambas são pessoas que seguram os momentos difíceis e estão sempre ajudando todos a resolverem problemas de diferentes tipos.

Caríssima Rosibel, muito obrigada pela ajuda que você prestou todos esses anos cuidando para que o laboratório estivesse sempre em condições de trabalho. Além de você ser uma pessoa maravilhosa a quem eu estimo muito e também sentirei grande saudade.

Agradeço aos alunos de iniciação científica, Alessandra Belikas, Karina, Juliana, Diego, Marcelo e Felipe pela troca de experiências e aos bons momentos.

Muito obrigada Walter Campestre, pela força que sempre me deu com os animais, com lugar no biotério, com os ensinamentos que me deu com criação e manejo de animais devido sua prática com o biotério por muitos anos. Agradeço também às boas risadas que demos juntos durante esses anos.

Obrigada aos funcionários, especialmente ao Antonio, do biotério da reumatologia, que sempre me ajudaram e foram muito prestativos todas as vezes que precisei.

Agradeço a Sueli Kubo pelo auxílio nos experimento da vascularização peritoneal, que ela realizou junto com Catanozi com grande destreza.

Agradeço à Márcia Fernanda de Campos Pinto pela paciência e pelo tanto que ela ouviu falar em transporte reverso de colesterol, sempre de forma bem humorada e solícita.

Obrigada Mário, Marília e Flávia Ferraretto pela força e pelo acolhimento durante esses anos!!

Agradeço também, ao Tio Zé e Tia Lú pela grande força e muito carinho que tiveram conosco.

Por fim agradeço todos aqueles que estiveram ligados de forma indireta à minha pesquisa, como avós e avôs, tios e tias, primas e primos, amigas e amigos, sogro e sogra, mas que sempre contribuem de sua maneira para que tudo ocorra da melhor forma possível

Sumário

Lista de abreviaturas	
Resumo	
Summary	
1. Introdução	1
1.1. Exercício Físico e Metabolismo de Lípides	1
1.2. Exercício Físico e Transporte Reverso de Colesterol	4
1.3. Exercício Físico e Aterosclerose	12
2. Objetivo	15
3. Material e Métodos	16
3.1. Animais.....	16
3.2. Protocolo experimental.....	16
3.2.1. Treinamento físico	16
3.3. Dosagens bioquímicas	17
3.3.1. Perfil de lipoproteínas plasmáticas	18
3.3.2. Obtenção das lipoproteínas.....	18
3.4. Marcação da HDL com [¹⁴ C]-colesteril oleato.....	19
3.5. Medida da atividade da proteína de colesterol esterificado (CETP) ..	20
3.6. Determinação do transporte reverso de colesterol <i>in vivo</i>	21
3.6.1. Cultura de macrófagos da linhagem J774	21
3.6.2. Extração de lípidos dos tecidos e das fezes.....	23
3.6.3 Avaliação do conteúdo hepático de colesterol	23
3.7. Determinação do conteúdo de ABCA-1, SR-BI, LXR e B-E hepático por imunoblot.....	24

3.8. Determinação dos receptores ABCA-1 e ABCG-1 nos macrófagos do peritônio por imunoblot.....	25
3.9. Determinação de apo A-I no lavado peritoneal.....	26
3.10. Determinação do mRNA das enzimas estero 7 e 27 alfa hidroxilase (CYP7A1 e CYP27) por RT-qPCR	26
3.11. Efluxo de ¹⁴ C-colesterol celular	28
3.12. Análise estatística	30
4. Resultados	31
5. Discussão.....	54
6. Conclusões.....	65
7. Referências	66

Lista de Abreviaturas e Siglas

ABCA-1 - *ATP binding cassette transporter A1*

ABCG-1 - *ATP binding cassette transporter G1*

ABCG-5 - *ATP binding cassette transporter G5*

ABCG-8 - *ATP binding cassette transporter G8*

Apo - apolipoproteína

CE - colesterol esterificado

CETP - proteína de transferência de colesterol esterificado

CYP27A - 27 alfa hidroxilase

CYP7A1 - 7 alfa hidroxilase

FPLC - cromatografia líquida para separação rápida de proteínas

HDL - lipoproteína de densidade alta

HDLc - HDL colesterol

IDL - lipoproteína de densidade intermediária

LDL - lipoproteína de densidade baixa

LCAT - lecitina colesterol aciltransferase

LPL - lipoproteína lipase

LRP - proteína relacionada ao receptor de LDL

LXR - receptor X hepático

QM - quilomícron

RXR - receptor X de ácido retinóico

SREBP - proteína de ligação ao elemento responsivo a esteróide

SR-BI - *scavenger receptor class B type I*

TG - triglicérides

TRC - transporte reverso de colesterol

VLDL - lipoproteína de densidade muito baixa

Resumo

Rocco DDFM. O treinamento físico aeróbio acelera o transporte reverso de colesterol de macrófagos em camundongos selvagens e transgênicos para CETP humana

O papel do exercício físico na prevenção da doença cardiovascular aterosclerótica é atribuído em parte à melhoria no metabolismo de lípidos, com evidências para regressão e prevenção no desenvolvimento de aterosclerose. Neste estudo, avaliamos o efeito de 6 semanas de treinamento físico aeróbio (protocolo diário em esteira 15 m/min, 30 min, 5 vezes na semana) sobre o transporte reverso de colesterol (TRC) em camundongos C57BL/6 selvagens e transgênicos para CETP humana (CETP-tg). Estes últimos constituem modelo experimental de TRC que se assemelha aos humanos, pela presença da CETP. O TRC é um sistema antiaterogênico, por meio do qual o colesterol é removido de células periféricas e transportado ao fígado para eliminação na bile e excreção fecal. A metodologia utilizada consistiu na injeção intraperitoneal de macrófagos J774 enriquecidos em LDL-acetilada e 3H-colesterol em animais selvagens e CETP-tg sedentários e treinados, após as 6 semanas de estudo. O perfil lipídico não foi modificado após o treinamento físico, no entanto, apenas no grupo CETP-tg treinado houve aumento na concentração de HDL colesterol ao final do estudo. O treinamento físico aeróbio acelerou o TRC em camundongos selvagens, refletido pela maior recuperação de 3H-colesterol no plasma (após 24 h e 48 h da injeção intraperitoneal) e no fígado (após 48

h), em comparação aos animais selvagens sedentários. Este evento associou-se ao aumento de 60% na expressão dos receptores hepáticos SR-BI, em relação ao grupo sedentário. Nos animais CETP-tg, o treinamento físico aumentou o TRC, com maior recuperação de 3H-colesterol - advindo dos macrófagos - no plasma, fígado e também nas fezes (após 24 h e 48 h), em comparação aos animais transgênicos sedentários. Embora a expressão de SR-BI não tenha sido alterada pelo treinamento físico nos animais CETP-tg, observou-se nestes animais aumento na expressão hepática do receptor B-E, contribuindo para a maior remoção de colesterol pelo fígado.

Os achados apontam para importante papel do exercício físico aeróbio regular sobre o transporte reverso de colesterol de macrófagos, contribuindo para a prevenção contra a gênese e progressão da aterosclerose.

Descritores: 1. Lipoproteínas / metabolismo; 2. Exercício; 3. Aterosclerose; 4. Colesterol HDL.

Summary

Rocco DDFM Aerobic Exercise Training Improves the Macrophage Reverse Cholesterol Transport in Wild-Type and in CETP Transgenic Mice

Regular exercise prevents the development of atherosclerosis. We analyzed the role of a six-week aerobic exercise training program in the macrophage reverse cholesterol transport in wild-type (WT) and in human CETP transgenic (CETP-tg) mice. Animals were randomly assigned to sedentary and trained groups (treadmill 15 m/min, 30-min sessions, 5 sessions per week). Plasma lipids were not modified after training, although HDL-cholesterol concentrations levels increased in trained CETP-tg mice only. Plasma CETP activity was not modified after training. A greater recovery of ^3H -cholesterol from J774 macrophages injected into peritoneal cavities of mice was found in plasma and in the liver from exercised WT and CETP animals in comparison to sedentary groups. Exercise training induced a greater excretion of ^3H -cholesterol in feces only in the CETP-tg mice. The SR-BI expression in the liver was increased and unchanged in trained WT and CETP-tg mice, respectively. The liver expression of LDL receptor was higher in both groups after training. Alternatively, liver X receptor (LXR) increased only in trained WT mice. Aerobic exercise training improves the macrophage RCT in mice, thereby contributing to the prevention and regression of atherosclerosis. The benefit of exercise on the cholesterol excretion in feces in mice was attained only in the presence of CETP, which

elucidates the importance of exercise in the prevention of atherosclerosis in humans.

Descriptors: 1. Lipoproteins / metabolism; 2. Exercise; 3. Atherosclerosis; 4. Cholesterol HDL

1. Introdução

1.1. Exercício Físico e Metabolismo de Lípidos

O exercício físico exerce efeitos benéficos sobre os fatores de risco para doenças cardiovasculares, como hipertensão arterial, diabetes melito, obesidade, disfunção endotelial e perfil lipídico alterado (Shepard et al., 1999), sendo adotado como conduta profilática e terapêutica contra sua gênese e progressão. A prática regular de exercício físico reduz o risco de morte por doença cardiovascular, independentemente de outras mudanças no estilo de vida, como dieta e tabagismo (Lee et al., 1995).

O benefício conferido pelo exercício físico sobre o metabolismo dos lípidos no compartimento plasmático e tecidual decorre da modulação da expressão e atividade de proteínas e enzimas envolvidas na síntese e catabolismo de lípidos e lipoproteínas.

Os quilomícrons (QM) são lipoproteínas de origem intestinal, formadas principalmente por triglicérides (86% a 98%), colesterol livre, colesterol esterificado e fosfolípidos oriundos da dieta. Apresentam a apolipoproteína (apo) B-48 como seu principal componente proteico, além de apo dos grupos C, E e A. Na circulação sanguínea, os QM sofrem a ação da enzima lipoproteína lipase (LPL), a qual hidrolisa triglicérides de seu núcleo, com a formação de partículas gradativamente menores, denominadas QM remanescentes. Estes são removidos pelo fígado, por meio da interação

com os receptores da família de proteínas relacionadas ao receptor de LDL (LRP) e receptores B-E.

No fígado, formam-se as lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), graças à transferência de triglicérides e outros lípidos (colesterol livre e esterificado e fosfolípidos) recém sintetizados à molécula de apoB-100 nascente. Tanto no fígado como no intestino, a síntese de colesterol e triglicérides é positivamente modulada pela proteína de ligação ao elemento responsivo a esteróide (SREBP), preferencialmente, SREBP2 e SREBP1a e 1c. Estes fatores de transcrição, quando ativados, promovem a transativação de genes que codificam para enzimas-chave na síntese do colesterol (por exemplo, HMG CoA redutase) e de ácidos graxos (por exemplo, acil CoA carboxilase), bem como do receptor B-E. Pela ação da proteína de transferência microssomal de triglicérides, estes lípidos são transferidos para as moléculas nascentes de apoB-48 e apoB-100, formando QM e VLDL, respectivamente.

Na circulação, à semelhança dos QM, as VLDL sofrem ação da LPL transformando-se, gradativamente, em lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e lipoproteínas de densidade baixa (LDL). Ao longo deste processo, as lipoproteínas enriquecem-se em colesterol esterificado, pela ação da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP).

As LDL são as principais fornecedoras de colesterol aos tecidos periféricos, graças ao seu reconhecimento pelos receptores B-E. Há um controle estreito no processo de captação das LDL na maioria das células (à exceção dos macrófagos arteriais), bem como na síntese de colesterol a

partir de acetato, desempenhado pelo SREBP2, de modo a impedir o acúmulo intracelular de colesterol.

Inerente a metabolização dos QM e VLDL está a geração de lipoproteínas de densidade alta (HDL). Isto ocorre graças ao desprendimento de componentes de superfície das lipoproteínas ricas em triglicérides, à medida que ocorre a ação da lipoproteína lipase. Além disso, as HDL, formadas a partir de partículas precursoras, denominadas pré-beta HDL, podem ser geradas por meio da síntese hepática e intestinal de apo A-I em associação a fosfolípidos e pequenas quantidades de colesterol livre.

A melhora do metabolismo de lipoproteínas ricas em triglicérides, promovida pelo exercício físico, decorre do estímulo à produção e atividade da LPL. Há uma ação direta do exercício na produção da LPL pelo músculo e, indireta, devido ao seu papel em modular positivamente a sensibilidade insulínica (Oscai et al., 1990). A consequente queda da trigliceridemia associa-se, invariavelmente, à geração de HDL. Neste sentido, a concentração de HDL no plasma é também beneficiada pelo exercício físico graças à redução do catabolismo de sua principal apoproteína, a apo A-I (Sasaki et al., 1988) e pela maior geração de partículas nascentes de HDL pelo músculo exercitado (Jafari et al., 2003). O aumento da concentração de HDL plasmática parece estar condicionado ao maior volume de treinamento físico aeróbio, quando comparado apenas ao aumento de intensidade da atividade aeróbia (Kraus et al., 2004).

Embora, em geral, não altere a concentração de LDL, o exercício físico, por reduzir a trigliceridemia, favorece a geração de partículas maiores de LDL, as quais são menos aterogênicas (Williams et al., 1986).

Diversos estudos populacionais demonstram que as HDL associam-se, inversamente, com o desenvolvimento da doença arterial coronariana. Tal evento decorre de suas ações antioxidantes, anti-inflamatórias, vasodilatadoras e anticoagulantes, bem como de sua participação no transporte reverso de colesterol (TRC) (Kwiterovich PO et al., 1998 e Leaf, 2003).

1.2. Exercício Físico e Transporte Reverso de Colesterol

O TRC (**figura 1**) é o processo pelo qual as HDL removem o excesso de colesterol de células periféricas, incluindo-se macrófagos da parede arterial, e o transportam ao fígado e órgãos esteroidogênicos. No fígado, o colesterol pode ser eliminado nas fezes na forma livre ou convertido a ácidos biliares, enquanto nas gônadas e nas adrenais, o colesterol é precursor de hormônios esteroidogênicos.

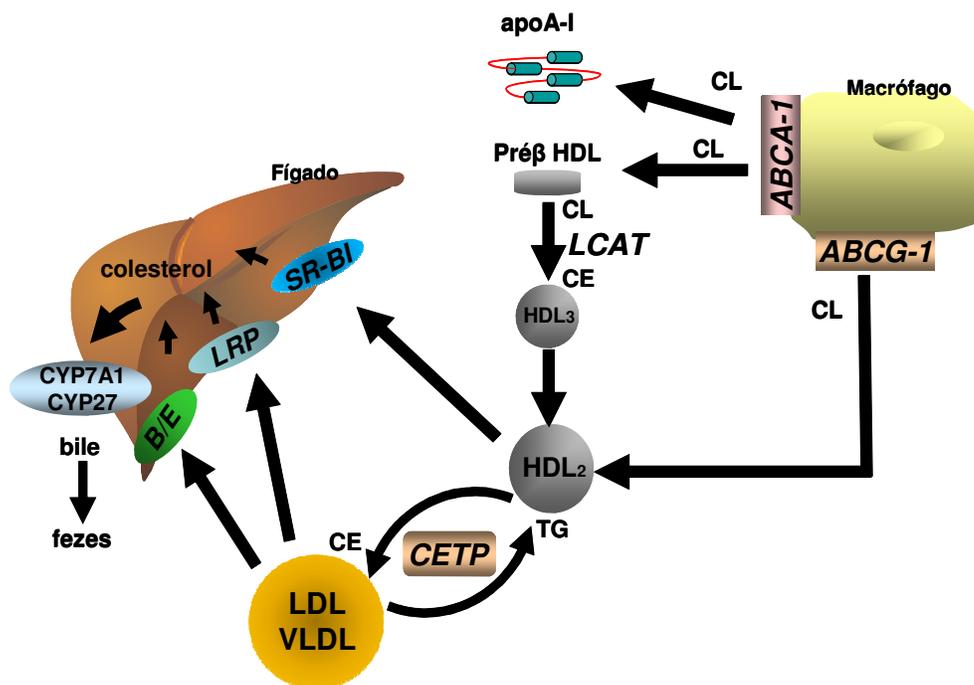


Figura 1. Transporte reverso de colesterol

Apolipoproteínas A-I e partículas nascentes de HDL (pré-beta HDL) removem o excesso de colesterol celular por meio da interação com o receptor ABCA-1. Após esterificação do colesterol pela LCAT, formam-se gradativamente partículas maiores de HDL – HDL₃ e HDL₂. O colesterol esterificado (CE) pode ser diretamente removido das HDL pelo receptor hepático SR-BI, ou transferido para QM, VLDL e LDL, por intermédio da CETP. Estas lipoproteínas podem ser removidas no fígado pelos receptores B-E ou LRP. O colesterol é, então, convertido em ácidos biliares pelas enzimas CYP7A e CYP27, sendo excretado nas fezes.

Os macrófagos arteriais, ao contrário de outras células que regulam seu conteúdo de colesterol por limitarem a sua síntese e o aporte proveniente das LDL, acumulam lípidos, pelos receptores *scavenger*, a partir da captação de lipoproteínas modificadas (Eckardstein et al., 2000). Sendo assim, a exportação de colesterol para as HDL, que caracteriza a fase inicial

do TRC (efluxo de colesterol), representa o principal mecanismo de ajuste da concentração intracelular de esteróides nestas células.

O efluxo do colesterol celular ocorre por meio da interação de partículas de apo A-I dissociadas e/ou HDL com receptores de membrana da família ABC (*ATP binding cassette transporters*), ABCA-1 e ABCG-1, respectivamente (Jessep et al., 2006).

O transportador ABCA-1 é expresso no fígado e no intestino, principalmente, além de outros órgãos como pulmão, músculo esquelético e cérebro. Diferentemente de sua expressão em macrófagos, onde modula o potencial aterogênico, embora não afete a concentração de HDL colesterol (HDLc) no plasma, a expressão hepática de ABCA-1 correlaciona-se positivamente com a concentração plasmática de HDLc (Wellington et al., 2003), sendo o fígado um órgão essencial na geração de partículas de HDL. Brunham et al. (2006) reportaram os receptores ABCA-1 nos enterócitos como intimamente envolvidos na biogênese de novas partículas HDL, contribuindo em até 30% na concentração plasmática desta lipoproteína.

O ABCA-1 enriquece a apo A-I e a pré-beta HDL em fosfolípidos e colesterol, graças à hidrólise de duas moléculas de ATP que fornecem a energia necessária para a translocação de lípidos entre os folhetos da membrana plasmática. Em casos de mutações em seu gene há uma significativa alteração na função da proteína, eventualmente com perda da capacidade de exportação de colesterol, como observado na doença de Tangier e alguns casos de deficiência familiar de HDL. Nestas condições

prevalece a drástica redução na concentração plasmática de HDLc e aumento na prevalência de aterosclerose (Stefkofva et al., 2004).

O transportador ABCG-1 também medeia a remoção de colesterol e óxidos de colesterol de macrófagos por subfrações maiores de HDL (HDL₂, principalmente). No entanto, sua implicação no desenvolvimento da aterosclerose não está totalmente estabelecida com base nos resultados em animais *knockout* ou com expressão aumentada para este receptor (Out et al., 2007 e Basso et al., 2006), o que pode resultar da expressão compensatória de ABCA-1 (Ranalletta et al., 2006).

A expressão de ABCA-1 e ABCG-1 é positivamente modulada pelo conteúdo intracelular de colesterol, mais especificamente óxidos de colesterol. Estes são ligantes do receptor X hepático (LXR), o qual se dimeriza com o receptor nuclear de ácido retinóico (RXR), induzindo a transcrição dos genes que codificam para os receptores de HDL, além de outras proteínas envolvidas no metabolismo lipídico, como apo E e CETP.

Embora a magnitude de remoção de colesterol da parede arterial não se reflita na excreção biliar e fecal deste esteróide, devido à pequena massa de colesterol arterial frente ao *pool* corpóreo muito superior, animais *knockout* para ABCA-1 (Joyce et al., 2002 e Out et al., 2008) desenvolvem aterosclerose precoce.

A literatura acerca da influência do exercício físico sobre o efluxo de colesterol ainda é controversa. Gupta et al. (1993) compararam atletas e indivíduos sedentários e não obtiveram diferenças no efluxo, mediado pelo soro, entre os dois grupos. Entretanto, Brites et al. (2004), estudando o efeito

do treinamento físico sobre as etapas do TRC compararam 35 atletas a 15 indivíduos sedentários e demonstraram que a capacidade do soro dos atletas em promover efluxo de colesterol celular foi maior. Em outro trabalho, onde os autores avaliaram atletas e indivíduos ativos, houve aumento na concentração de HDLc, do número de partículas de apo A-I e da porcentagem do efluxo de colesterol celular nos atletas, analisado *in vitro*. Porém, quando foi feita a correção do efluxo por apo A-I, a diferença desapareceu (Olchama et al., 2004). Sendo assim, os achados da literatura que descrevem aumento do efluxo de colesterol, mediado pelo soro, parecem refletir muito mais alterações na concentração de pré-beta HDL ou mesmo HDL maduras e não, propriamente, maior habilidade das HDL em receberem colesterol celular. Coincidentemente, em indivíduos saudáveis e em portadores de diabetes melito, o treinamento físico aeróbio não afetou a habilidade das subfrações de HDL em remover colesterol de macrófagos (Ribeiro et al., 2008), embora tenha aumentado o potencial antioxidante das HDL nos diabéticos (Iborra et al., 2008)

Hoang et al. (2007) compararam indivíduos sedentários com praticantes regulares de exercício físico e demonstraram que o efluxo de colesterol, mediado pelo soro, não foi diferente entre os grupos. No entanto, a expressão do mRNA de ABCA-1 em leucócitos foi maior nos indivíduos treinados.

Além do processo ativo de remoção de colesterol celular, as HDL intermedeiam o efluxo de colesterol graças à interação com os receptores SR-BI (receptor *scavenger* classe B, tipo I). Estes facilitam a formação de

um canal hidrofóbico através do qual o colesterol é difundido para as HDL. A expressão de SR-BI correlaciona-se, positivamente, com o efluxo de lípidos celulares (Duong et al., 2006). Entretanto, tal receptor também favorece a captação de lipoproteínas modificadas em macrófagos e seu papel exato no balanço de colesterol nestas células não está totalmente estabelecido.

O colesterol livre removido das células é esterificado na partícula de HDL pela lecitina colesterol aciltransferase (LCAT). Esta enzima encontra-se aderida à superfície da HDL e esterifica o colesterol por meio da transferência de um ácido graxo (geralmente o ácido graxo linoléico) da posição 2 da fosfatidilcolina para posição 3-beta hidroxil do colesterol, formando, então, lisolecitina e colesterol esterificado. Neste estágio, o colesterol esterificado pode ser removido da HDL por intermédio dos receptores hepáticos SR-BI, sendo direcionado ao canalículo biliar. Esta é denominada via direta de remoção do colesterol, a qual é preponderante em algumas espécies animais, como os roedores. Em contrapartida, em humanos esta via corresponde a apenas um terço da remoção de colesterol ao longo do TRC (Temel et al., 1997).

Nos murídeos, a formação de ácidos biliares no fígado e excreção nas fezes é a forma mais eficiente de eliminação do colesterol no organismo. Os ácidos biliares são formados a partir da atividade das enzimas 7- alfa hidroxilase, preponderantemente, e 27- alfa hidroxilase, CYP7A1 e CYP27A, respectivamente, (Gälman et al., 2003). Em roedores, a atividade da CYP7A1 é mais elevada do que em outros animais, o que favorece a rápida produção de sais biliares. Já, a via de conversão do colesterol pela CYP27A

é mais lenta, sendo esta considerada uma via alternativa (Stravitz et al., 1996).

Além da conversão a ácidos biliares, uma parte do colesterol pode ser eliminada em sua forma livre na bile. Deste processo participam os transportadores ABCG-5 e ABCG-8, os quais transferem colesterol livre para o canalículo biliar. Em oposição, a proteína Niemann-Pick C1 símile (NPC1L1) redireciona colesterol do canalículo ao hepatócito (Wu et al. 2004).

Em seres humanos e espécies que expressam a proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP), o colesterol esterificado pode ser transferido da HDL para QM, VLDL ou LDL, os quais são removidos no fígado pelos receptores B-E e LRP. A HDL, por sua vez, recebe triglicérides em troca, o que facilita a atividade da lipoproteína lipase hepática. Esta enzima hidrolisa triglicérides e fosfolípidos da HDL, favorecendo a interação destas com o SR-BI hepático.

O papel da CETP sobre a aterogênese é assunto de investigação em diferentes modelos experimentais (Tailleux et al., 2002). Embora favoreça o fluxo de colesterol da periferia ao fígado por meio do TRC, o aumento da atividade da CETP em algumas condições metabólicas (como diabetes melito, dislipidemias, entre outras) pode favorecer o enriquecimento de lipoproteínas potencialmente aterogênicas em colesterol esterificado. Estas, por sua vez, podem ser removidas por macrófagos arteriais. Por outro lado, a inibição farmacológica da CETP favoreceu importante elevação da concentração plasmática de HDLc,

embora estudos pré-clínicos com compostos que inibiram sua ação tenham sido interrompidos devido à maior mortalidade no grupo tratado (Barter et al., 2007, Niessen et al., 2007 e Kastelein et al., 2007). É provável que tal resultado advinha da ação anti-inflamatória da CETP, a qual independe de sua atividade de transferência de lípidos neutros entre lipoproteínas.

O efeito do exercício físico agudo ou crônico sobre a atividade e massa da LCAT e CETP é controverso e parece vinculado ao tipo de metodologia utilizada para avaliar tais proteínas, bem como às diferentes condições metabólicas das populações estudadas (Gupta et al. 1993, Brites et al., 2004, Olchawa et al., 2004 e Sutherland et al. 1993). Isto dificulta a compreensão dos efeitos do exercício sobre a concentração sérica de HDL, em função da modulação da massa e/ou atividade destas proteínas. Em estudo que avaliou o efeito crônico do exercício físico, demonstrou-se aumento da atividade de LCAT e CETP. A atividade da CETP foi medida por meio de teste exógeno, que expõe o plasma dos indivíduos ao mesmo *pool* de lipoproteínas exógenas, excluindo interferências que possam ocorrer na medida da CETP por diferenças na composição das lipoproteínas (Gupta et al., 1993). Outros dois estudos que avaliaram o efeito crônico do exercício físico sobre a atividade da LCAT e da CETP, também utilizando teste exógeno, não demonstraram diferença entre os indivíduos que se exercitaram e os controles sedentários (Brites et al., 2004 e Olchawa et al., 2004). Ainda, avaliando o efeito crônico do exercício sobre estas variáveis, Sutherland et al. (1993) não encontraram diferença na atividade de CETP, comparando-se indivíduos sedentários e maratonistas. Já, outro trabalho

que avaliou a massa de LCAT em indivíduos que participaram de um programa de exercício físico durante um ano e indivíduos que se mantiveram sedentários pelo mesmo período, não demonstrou diferença entre os grupos (Williams et al., 1990). Entretanto, o papel da LCAT na aterogênese é controverso com estudos clínicos e experimentais defendendo tanto ação pró quanto antiaterogênica (Calabresi et al., 2009)

1.3. Exercício Físico e Aterosclerose

Ramachandran et al. (2004) demonstraram que o treinamento físico aeróbio, em esteira, por 12 semanas foi capaz de reduzir área de lesão aterosclerótica pré-estabelecida, em camundongos *knockout* para o receptor de LDL, em relação ao grupo sedentário, mesmo sem alterações na colesterolemia. Napoli et al. (2006), utilizando o mesmo modelo animal, alimentado com dieta hiperlipídica, investigaram o papel do treinamento de natação por 18 semanas, sobre a progressão da aterosclerose. Os autores observaram maior bioatividade do óxido nítrico e maior expressão da óxido nítrico sintase endotelial nos animais treinados quando comparados aos que foram mantidos sedentários. Além disso, os camundongos que foram submetidos ao treinamento físico, apresentaram diminuição importante na progressão da lesão arterial, menor ocorrência de ruptura de placa aterosclerótica e de trombos. Estes eventos refletiram-se na maior taxa de sobrevivência dos animais treinados, ao longo de 18 semanas, em comparação aos sedentários. Corroborando estes achados, Shimada et al.

(2007), utilizando animais *knockout* para apoE alimentados com dieta hiperlipídica por 8 semanas, evidenciaram menor extensão da lesão aterosclerótica nos treinados em comparação aos sedentários. Tal evento foi associado à maior biodisponibilidade de óxido nítrico sintase endotelial na parede arterial dos animais exercitados. Interessante que o treinamento físico aumentou a peroxidação lipídica no plasma de camundongos, embora na parede arterial tenha elevado a expressão de catalase, óxido nítrico sintase endotelial e superóxido dismutase, com redução da área de lesão aterosclerótica (Meilhac et al., 2001). Além do benefício conferido ao balanço redox, favorecendo defesas antioxidantes, os achados experimentais podem ser resultantes da elevação do HDLc, embora nenhum dos trabalhos citados anteriormente tenha feito referência à concentração plasmática de HDLc.

Apesar dos efeitos benéficos do treinamento físico aeróbio sobre a doença macrovascular aterosclerótica terem sido bem explorados (Thompson et al., 2003), não existem evidências diretas acerca do papel do exercício físico sobre o TRC. Os achados pontuais sobre proteínas e enzimas determinantes para o fluxo de colesterol ao longo do TRC podem não refletir a inter-relação destes componentes no organismo intacto frente ao exercício físico agudo ou crônico.

Rader et al. (2003) padronizaram técnica de injeção intraperitoneal de macrófagos enriquecidos *in vitro* com colesterol radioativo, demonstrando o fluxo *in vivo* deste esterol para diversos órgãos em camundongos o que, em última análise, representa o transporte centrípeto de colesterol ao fígado e fezes. Assim, estudamos em camundongos o efeito do exercício físico

aeróbio regular, utilizando a técnica descrita acima, sobre o TRC in vivo, bem como sobre a atividade e expressão de proteínas moduladoras deste sistema.

2. Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do treinamento físico aeróbio, por 6 semanas, sobre o transporte reverso de colesterol *in vivo*, em camundongos C57BL/6 selvagens e transgênicos para CETP humana (CETP-tg). Foram determinados:

- o perfil de lípidos e lipoproteínas plasmáticas;
- o fluxo de ^3H -colesterol de macrófagos injetados no peritônio, para o plasma, fígado e fezes;
- a expressão hepática dos receptores ABCA-1, SR-BI, LXR e B-E;
- o mRNA hepático das enzimas CYP7A1 e CYP27A;
- o conteúdo hepático de colesterol;
- a expressão de apoA-I no lavado peritoneal;
- o efluxo de ^{14}C -colesterol de macrófagos controles, mediado pelo soro dos animais;
- o efluxo de ^{14}C -colesterol, mediado por HDL controle, de macrófagos isolados dos animais experimentais.

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Camundongos machos da linhagem C57BL/6J, com 21 dias de idade, foram adquiridos do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP. As matrizes dos camundongos machos transgênicos homozigotos para CETP humana (CETP-tg; linhagem 5203), com base genética dos camundongos C57BL/6J foram gentilmente fornecidas pela Prof^a. Dra. Helena C. F. Oliveira, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. Os animais foram mantidos no biotério convencional do Laboratório de Fisiopatologia Renal da FMUSP, com ciclo de 12 h claro/12 h escuro, temperatura de 22 ± 2 °C, recebendo água e dieta padrão *ad libitum*. Os animais transgênicos foram utilizados após dez cruzamentos entre irmãos.

3.2. Protocolo experimental

3.2.1. Treinamento físico

Camundongos selvagens e transgênicos para CETP, com 8 semanas de idade, foram submetidos a treinamento físico aeróbio diariamente, durante 30 min, por 6 semanas, na velocidade de 15 metros por min. Um

grupo controle de cada linhagem foi mantido sedentário durante todo o período.

O treinamento físico foi realizado em esteira própria para camundongos (marca WEG, São Carlos, Brasil), na velocidade de 15 m/min, sem inclinação. A padronização do protocolo de treinamento físico aeróbio dos camundongos em esteira foi realizada de acordo com os parâmetros utilizados na Escola de Educação Física e Esportes da Universidade de São Paulo. Os animais que não se adaptaram à corrida em esteira foram excluídos do protocolo.

As análises bioquímicas e a determinação do fluxo ao longo do transporte reverso de colesterol foram realizadas 48 h após a última sessão de exercício físico, evitando-se assim influência aguda do exercício sobre enzimas e proteínas que determinam o metabolismo lipídico.

3.3. Dosagens bioquímicas

Sangue (200µL) foi coletado da veia caudal dos animais, em capilares previamente heparinizados, no início e final do período de estudo. Para isso, o corpo dos animais, excetuando-se a cauda, foi envolvido em toalha, com dimensão apropriada, objetivando-se um procedimento adequado de imobilização e coleta (Lab Animal, 22: 177 – 182, 1988) que foi sempre realizada após 12 h de privação alimentar.

Colesterol total e triglicérides foram determinados por meio de *kits* enzimáticos colorimétricos (Roche do Brasil e Labtest do Brasil) em

analisador automático bioquímico Cobas Mira (F. Hoffman-La Roche, Basileia, Suíça)

3.3.1. Perfil de lipoproteínas plasmáticas

O perfil das lipoproteínas plasmáticas (VLDL, LDL e HDL) foi determinado por cromatografia líquida para determinação rápida de proteínas (FPLC) apenas em amostras isoladas no período final do estudo. Alíquotas de plasma (100 μ L) de cada grupo foram injetadas em coluna Superose 6HR 10/30 (FPLC System, Pharmacia, Upsalla, Suécia). O plasma foi eluído, em fluxo constante de 0,5 mL/min, com tampão Tris (Tris 10 mM, NaCl 150mM, EDTA 1 mM e NaN_3 0,03%), pH 7,4 sendo coletadas as frações de lipoproteínas para determinação do conteúdo de colesterol total e triglicérides. O HDLc foi determinado por meio da razão entre a área de colesterol da HDL e a área total de colesterol das lipoproteínas (obtidas pela FPLC), multiplicado pela concentração total de colesterol no plasma.

3.3.2. Obtenção das lipoproteínas

As lipoproteínas VLDL, LDL e HDL foram separadas para utilização no ensaio de atividade de CETP descrito abaixo. Sangue de doadores voluntários normolipidêmicos foi coletado, após jejum de 12 h, em tubos contendo EDTA (1 mg/mL) e, imediatamente, centrifugado a 4°C, 1.000 x g para separação do plasma. Os seguintes conservantes foram adicionados ao plasma: aprotinina (10 μ L/mL), benzamidina 2 mM (5 μ L/mL), gentamicina

0,5%: cloranfenicol 0,25% (20 $\mu\text{L}/\text{mL}$) e fluoreto de fenilmetilsulfonila (0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

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

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

Após a separação das lipoproteínas, a fração de HDL foi marcada com [4- ^{14}C]-colesteril oleato ([^{14}C]-CO), segundo o método de GAVISH et al. (1987). Inicialmente, o isótopo dissolvido em tolueno foi seco sob fluxo de nitrogênio, rediluído em 100 μL de etanol, e adicionado gota a gota ao infranadante do plasma de $d \geq 1,063 \text{ g}/\text{mL}$, sob agitação lenta, durante 5 min. A mistura foi, então, incubada em banho-maria com agitação a 37°C por 24 h. Após o período de incubação, a densidade da mistura foi ajustada com KBr sólido (1,21 g/mL) e ultracentrifugada a $100.000 \times g$ e a 4°C . As LP

isotopicamente marcadas foram dialisadas exaustivamente contra tampão fosfato contendo EDTA (0,01%, pH 7,4), filtradas com filtros Millipore estéreis de 0,22 μm , e determinada sua composição em CT, TG e proteína. A HDL marcada foi subseqüentemente utilizada no ensaio de atividade da CETP.

3.5. Medida da atividade da proteína de colesterol esterificado (CETP)

Nos animais transgênicos, foi medida a atividade da CETP plasmática no início e ao final do protocolo de estudo. Para tanto, foi utilizado método isotópico, que é baseado na transferência de ^{14}C -colesterol esterificado (^{14}C -CE) de lipoproteínas doadoras ($\text{HDL}_2 + \text{HDL}_3$) para lipoproteínas aceptoras ($\text{LDL} + \text{VLDL}$) de colesterol, ambas de fonte exógena (plasma humano) e o plasma dos animais experimentais como fonte de CETP. Por este método é possível estimar indiretamente a massa da proteína no plasma dos camundongos, antes e após o período de estudo. As lipoproteínas foram diluídas em tampão Tris (pH 7,4) a fim de atingirem concentrações finais de triglicérides em $\text{VLDL} + \text{LDL}$ de 200 mg/dL e de colesterol total em ^{14}C -HDL de 40 mg/dL. Em seguida, foram esterilizadas por filtração em filtros Millipore de 0,22 μm .

A atividade da CETP foi determinada utilizando 50 μL de ^{14}C -HDL e 200 μL $\text{VLDL} + \text{LDL}$, na presença de 10 μL do plasma dos animais como fonte da CETP. As incubações foram realizadas a 37°C e a 4°C (como

controle) durante 2 h. Após esse período, as LP que contêm apo B (VLDL e LDL) foram precipitadas com 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de solução de sulfato de dextrana- MgCl_2 (1:1), centrifugadas a 1.000 g por 30 min e sobrenadante (200 μL) coletado para a contagem da radioatividade. A porcentagem de transferência de [^{14}C]-colesterol esterificado das frações de HDL para as LP que contêm apoB foi calculada a partir da fórmula: % transferência de [^{14}C]CE = $[1 - (\text{contagem da radioatividade a } 37^\circ\text{C} / \text{contagem da radioatividade a } 4^\circ\text{C})] \times 100$.

3.6. Determinação do transporte reverso de colesterol *in vivo*

3.6.1. Cultura de macrófagos da linhagem J774

Macrófagos da linhagem murina J-774 foram cultivados em garrafas de 75 cm^2 com o meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino. Antes de atingirem confluência total, as células foram lavadas duas vezes com solução isotônica (PBS) contendo 1 mg/mL de albumina isenta de ácidos graxos (FAFA). A seguir, foram incubadas, por 48 h, com 50 μg de LDL acetilada / mL de meio e 5 μCi de ^3H colesterol / mL (GE Healthcare).

Após este período, as células foram removidas da garrafa por meio da incubação, na estufa, por 3 minutos com tripsina, e seguindo-se esse período foi colocado RPMI (6 ml) para cessar a ação da tripsina. Após determinação por exclusão em Trypan blue do número total de células viáveis, estas foram centrifugadas a 1500 rpm por 15 min, a 4°C . O *pellet*

celular foi rediluído em PBS e novamente centrifugado para remoção de restos do meio de cultura. Foi determinada a radioatividade após rediluição em volume conhecido de PBS. Uma fração foi submetida à cromatografia em camada delgada (TLC) para determinação da quantidade de ^3H -colesterol na forma livre ou esterificada no interior celular.

Uma fração da suspensão celular (não mais do que 100 microlitros, mas contendo aproximadamente $3,5 \times 10^6$ células e 800.000 dpm) foi injetada intraperitonealmente nos animais utilizando uma seringa de insulina estéril.

Por meio de coleta de sangue da cauda a radioatividade no plasma foi determinada após 24 h e 48 h. Nestes mesmos períodos foram colhidas as fezes para determinação da excreção fecal de colesterol. Para tanto, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas por 48 h. As fezes foram armazenadas a -70°C para posterior extração dos lípides.

O sangue coletado foi submetido imediatamente à centrifugação a 1500 rpm (15 min, a 4°C). Alíquota de plasma foi transferida para tubos de plástico contendo solução cintiladora, para determinação da radioatividade.

Após 48 h da injeção dos macrófagos no peritônio, os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (Ketalar® - 50 mg / Kg de peso corporal; i.p.) e cloridrato de xilazina hidrotiazina (Rompum® - 10 mg / Kg peso corporal; i.p.). Foram então, submetidos à laparotomia longitudinal mediana objetivando - se a perfusão dos órgãos com 5 mL de solução fisiológica a temperatura ambiente, para posterior evisceração. Após remoção, pulmão, baço, fígado, rins e coração foram lavados rapidamente

com solução fisiológica gelada, secos com papel absorvente e pesados. Uma fração do fígado foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e guardada em congelador a -70°C .

O restante do fígado e dos demais órgãos foi imediatamente congelado a -70°C .

3.6.2. Extração de lípides dos tecidos e das fezes

Para extração dos lípides, os tecidos e as fezes foram homogeneizados em 5 mL de solução de clorofórmio / metanol (2:1; v:v), e mantidos em repouso por 18 h a 4°C . Todo o material foi filtrado em papel filtro tipo 50, adicionando-se ao extrato, 2 mL de água destilada. Novamente a amostra foi mantida em repouso por 18 h a 4°C . A fase aquosa superior foi removida a vácuo e descartada com adição posterior de solução de clorofórmio / metanol / água destilada (3 : 48 : 47; v:v:v) ao extrato orgânico, o qual manteve-se em repouso por 18 h a 4°C . Após descarte da fase aquosa, a fase orgânica foi seca sob fluxo constante de nitrogênio. As amostras foram transferidas para frascos de contagem, seguindo-se lavagem repetida com clorofórmio. Após secagem completa adicionou-se solução cintiladora para determinação da radioatividade em contador beta (Beckman modelo, Palo Alto, EUA).

3.6.3 Avaliação do conteúdo hepático de colesterol

Para extração dos lípides do fígado, foram pesados ~ 200 mg de tecido em seguida esse fragmento do órgão foi macerado em 2 mL de

isopropanol, e o extrato foi agitado cuidadosamente. Posteriormente, as amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora, e deixadas em repouso por 12 horas a 4°C. No dia seguinte, o sobrenadante límpido foi coletado. E o colesterol total foi doseado o por meio de *kits* enzimáticos colorimétricos (Roche do Brasil e Labtest do Brasil).

O conteúdo total de colesterol do fígado foi corrigido pela quantidade de proteína do órgão. Para mensuração da quantidade de proteína, foram pesados ~ 200 mg de fígado, que foi então macerado em 4mL de água. Após agitar cuidadosamente a amostra, foi retirada uma alíquota e a proteína foi dosada pelo método de Lowry et al. (1951).

3.7. Determinação do conteúdo de ABCA-1, SR-BI, LXR e B-E hepático por imunoblot

Para extração da proteína foi utilizada apenas parte do fígado. O tecido foi homogeneizado a 4°C em tampão contendo 20 mM de HEPES, NaCl 150mM, glicerol 10%, Triton 1%, 1 mM de EDTA, MgCl₂ 1,5 mM e inibidores de protease (pepstatin 2mM, 1,4mg/ml in MeOH, leucopetin 2mM, 1 mg/ml in H₂O, e aprotinina 1,5mM, 10mg/ml in 20mM Tris, pH 7,5, 4°C). A seguir, a amostra foi centrifugada a 1.000 g, por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado e correspondendo à fração de membrana, foi rediluído em tampão de homogeneização e estocado em ultracongelador (-70°C).

O conteúdo de proteína das amostras foi mensurado utilizando-se kit BCA (Pierce, Rockford, IL, EUA) e quantidades iguais de proteína foram aplicadas em gel de poliacrilamina a 6% para determinação de ABCA-1 (220 kDa), 10% para SR-BI (82 kDa), 12% para LXR (50 kDa), 8% para LDLr (160 kDa) e 12% para β actina (38 kDa). Após transferência para membrana de nitrocelulose por 1h a 346 mA, foi realizado bloqueio de sítios não ocupados na mesma usando leite desnatado (5%) diluído em PBS e acrescido com Tween (0,05%). As membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos: anti-ABCA-1 (Novus Biologicals, USA), anti-SR-BI (Novus Biologicals, USA), anti-LXR (Santa Cruz Biotechnology, INC), anti-B-E (Santa Cruz Biotechnology, INC) e anti- β actina, controle positivo, (Fitzgerald, USA) em diluição 1:1.000 e reagidas com peroxidase. A visualização das bandas foi obtida após reação com ECL (Super Signal West Pico Chemiluminescent substract, Pierce, Rockford, IL, EUA) e revelação em fotodocumentador ImageQuant 300 (GE Healthcare).

3.8. Determinação dos receptores ABCA-1 e ABCG-1 nos macrófagos do peritônio por imunoblot

Após o protocolo experimental de 6 semanas, os macrófagos foram extraídos do peritônio dos camundongos sedentários e treinados por meio de injeção de PBS (6 ml) contendo antibióticos. Após centrifugação a 4°C (1.000 rpm), o botão celular foi rediluído e homogeneizado em SDS glicerol (1 mL) e congelado a -70°C.

Posteriormente, o conteúdo de proteína dos receptores ABCA-1 e ABCG-1 foi mensurado seguindo-se o protocolo descrito acima e utilizando-se gel de poliacrilamina a 6% para determinação de ABCA-1 (220 kDa) e a 10% para determinação de ABCG-1 (60kDa).

3.9. Determinação de apo A-I no lavado peritoneal

A presença de apo A-I livre foi determinada no peritônio dos animais sedentários e treinados. Para tanto, após o período de 6 semanas de estudo, uma solução salina estéril (6 mL) foi injetada no peritônio desses animais. Após massagem suave, o lavado peritoneal foi retirado com auxílio de seringa e a amostra protéica concentrada por centrifugação em filtros Amicon. Seguindo protocolo de imunoblot descrito acima, quantidades iguais de proteína foram aplicadas em gel de poliacrilamina 10% para detecção de apo A-I, utilizando-se anticorpo anti apo A-I murino (1:2.000) (Santa Cruz Diag, EUA).

3.10. Determinação do mRNA das enzimas esterol 7 e 27 alfa hidroxilase (CYP7A1 e CYP27) por RT-qPCR

Células do fígado (~50 mg) foram homogeneizadas em solução em 1mL de Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e congeladas a -70°C. Após descongelamento, a solução foi homogeneizada, permanecendo em repouso a temperatura ambiente, por 5 min. Logo após, foram adicionados 200µL de clorofórmio com agitação vigorosa por 15 seg.

A solução foi mantida a temperatura ambiente por mais 2-3 min e centrifugada a 12.000g, 4º, por 15 min. A fase aquosa superior foi transferida para outro tubo, ao qual, foram adicionados 500µL de isopropanol, seguindo-se repouso a temperatura ambiente, por 10 min e centrifugação a 12.000g, por 10 min, 4ºC. O sobrenadante foi removido e o *pellet* de RNA lavado uma vez com 1 mL de etanol 75% gelado. A amostra foi centrifugada a 7.500g, por 5 min, 4º C. O *pellet* de RNA, parcialmente seco, foi dissolvido com água tratada com DEPC e incubado durante 10 min, a 65ºC.

As concentrações de RNA total foram determinadas por espectrofotometria. A integridade do RNA foi determinada em gel de agarose.

A quantificação dos transcritos de CYP7A1 e CYP27A foram determinadas por RT-qPCR e os resultados normalizados de acordo com valores obtidos para m RNA β-actina, utilizado como controle interno. Os *Primers* foram desenhados de acordo com a referência Wilund et al. (2008).

As sequências dos *primers* (sense e anti-sense) para cada transcrito foram:

β-Actin: sense 5' - GGGTGTGAAGGTCTCAA- 3' e antisense 5' - TGTTACCAACTGGGACGACA 3'

CYP7A1: sense 5' - AGCAACTAAACAACCTGCCAGTACTA-3' e antisense 5' – GTCCGGATATTCAAGGATGCA - 3'

CYP27A: sense 5' – GGAGGGCAAGTACCCAATAAGA - 3' e antisense 5' – TGCGATGAAGATCCCATAGGT – 3'

A determinação da expressão do mRNA foi realizada em Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research, Sidney, Australia) com uso de SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) de acordo com instruções do fabricante.

O conteúdo de mRNA de CYP7A1 e CYP27A foi determinado como o número de transcritos em a β -actin e normalizados com a média do valor dos fígados controles.

3.10.1 Método de Análise da expressão Gênica

Para análise da expressão gênica foi utilizado o modelo matemático descrito por Pfaffl (2001). Este modelo utiliza os valores de eficiência obtidos nas curvas de expressão gênica e a taxa de expressão relativa (R).

3.11. Efluxo de ¹⁴C-colesterol celular

Foram utilizados macrófagos isolados do peritônio dos camundongos sedentários e treinados, utilizando-se HDL₃ de *pool* humano, comoceptoras de colesterol. Em outro experimento, células foram obtidas do peritônio de animais controles (camundongos suíços), enquanto soro dos animais experimentais (treinados e sedentários selvagens ou CETP-tg) foi utilizado como receptor de colesterol celular. Isto nos permite distinguir entre alterações celulares que modulem o efluxo e/ou alterações no soro que impliquem em sua capacidade como receptor de lípidos celulares (por exemplo, pelo aumento de pré-beta HDL).

Macrófagos foram obtidos por meio de injeção de PBS contendo antibióticos no peritônio dos camundongos. Após centrifugação a 4°C (1.000

rpm), o botão celular foi rediluído em meio RPMI contendo soro fetal bovino 10%. As células foram incubadas em placas de cultura com 24 cavidades de forma a manter a concentração de $0,5 \times 10^6$ células por cavidade, e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de CO₂ 5%. Após remoção das células não aderidas, os macrófagos foram incubados com DMEM contendo 0,1% de albumina isenta em ácidos graxos acrescido com 50 µg de LDL acetilada / mL de meio e 0,5 µCi de ¹⁴C-colesterol / mL de meio, por 24 h.

Após lavagem com PBS/FAFA, as células foram mantidas por 24 h apenas com DMEM/FAFA para equilíbrio dos *pools* intracelulares de colesterol. A seguir (considerando-se o uso de macrófagos dos animais experimentais), as células foram incubadas, por 5 h, com 50 µg de HDL₃/mL DMEM para a determinação do efluxo de colesterol. Nos experimentos com uso de *pool* de células de animais controles foi utilizado soro dos animais experimentais a 2% diluído em DMEM/FAFA por período de 2 h.

A quantidade de radioatividade presente no meio, ao final do período de incubação, indicou o efluxo basal de colesterol (incubações meio contendo apenas albumina) e o mediado pela HDL₃ (incubações com meio acrescido com HDL₃). O meio de cultura foi recolhido para tubos de vidro, ultracentrifugado a 1500 rpm durante 10 min a 4°C para remoção de debris celulares, e transferido para frascos de cintilação, seguindo-se a adição de solução contadora. As cavidades das placas foram lavadas com solução fisiológica gelada.

Os lípides celulares foram extraídos com solução de hexana:isopropanol (3:2) e a radioatividade determinada, após evaporação

do solvente. As células foram incubadas com NaOH (250 µL de 0,2 N), durante 3 h, a temperatura ambiente para lise celular e medida da concentração de proteína pelo método de Lowry et al. (1951).

Os valores obtidos em incubações na presença de HDL e albumina foram subtraídos daqueles obtidos apenas com albumina, de maneira a refletir o efluxo mediado somente por HDL.

A porcentagem de efluxo foi calculada como:

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

3.12. Análise estatística

As comparações entre os grupos, camundongos treinados e sedentários, foram realizadas pelo teste t de *Student* não pareado e os dados são apresentados como média ± EP. As bandas de imunoblot foram quantificadas por densitometria. Em todos os casos, foram consideradas significantes todas as situações nas quais o nível descritivo de significância for inferior a 5%.

4. Resultados

Após 6 semanas de estudo (período final), não se observou diferença, em relação ao período basal, no peso corporal e nas concentrações plasmáticas de colesterol total (CT), triglicérides (TG) e HDLc dos animais selvagens treinados e sedentários (**tabela 1**).

Tabela 1 – Peso e concentração de lípides plasmáticos dos animais selvagens treinados e sedentários, antes (basal) e após (final) o período de 6 semanas de estudo

	Selvagem			
	Treinado (n = 10)		Sedentário (n = 9)	
	basal	final	basal	final
Peso (g)	17,3 ± 1,7	17,0 ± 1,3	17,8 ± 2,0	18,0 ± 2,0
CT (mg/dL)	93 ± 11	73 ± 17	96 ± 18	78 ± 20
TG (mg/dL)	47 ± 12	41 ± 15	43 ± 12	72 ± 20
HDLc (mg/dL) #	-	59 ± 4	-	54 ± 3

Antes do início do protocolo experimental e após 6 semanas, os animais treinados e sedentários foram pesados e a dosagem de colesterol total (CT) e triglicérides (TG) foi determinada no plasma. # O HDLc foi determinado apenas no final do estudo, por meio da razão entre a área de colesterol da HDL e a área total de colesterol das lipoproteínas, obtidas por FPLC, multiplicado pela concentração total de colesterol no plasma

O perfil de distribuição de colesterol nas lipoproteínas plasmáticas, determinado por FPLC, não variou entre os grupos treinado e sedentário nos camundongos selvagens (**Figura 2**).

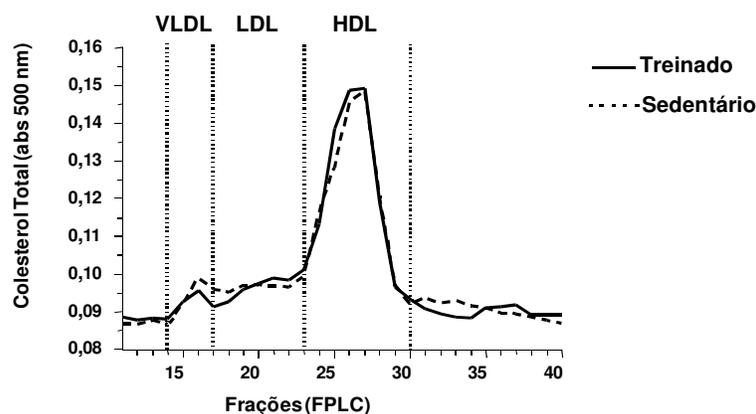
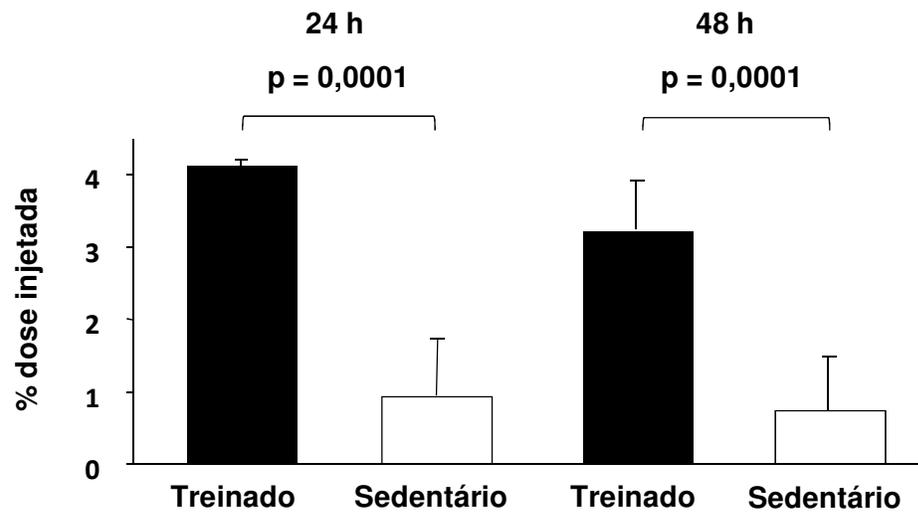
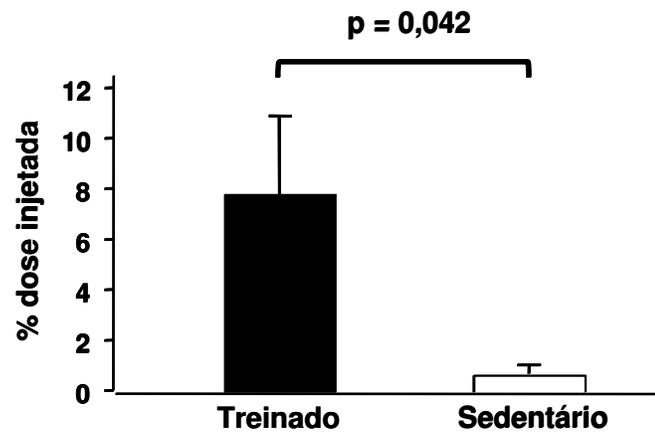


Figura 2. Perfil de lipoproteínas plasmáticas dos camundongos selvagens treinados e sedentários.

Após 6 semanas de protocolo experimental, plasma (100 μ L) de cada um dos animais selvagens, treinados e sedentários, foi aplicado em cromatografia líquida para determinação rápida de proteínas (FPLC). O perfil de distribuição de colesterol total nas frações de lipoproteínas (VLDL, LDL e HDL) foi analisado por método enzimático colorimétrico em sistema automatizado.

Após injeção intraperitoneal de macrófagos marcados com ^3H -colesterol, observou-se nos animais selvagens treinados maior recuperação de radioatividade no plasma, após 24 h e 48 h (**Figura 3A**) e no fígado, após 48 h (**Figura 3B**), em comparação aos selvagens sedentários. No entanto, nenhuma diferença foi observada na excreção fecal de ^3H -colesterol entre animais selvagens treinados e sedentários (**Figura 3C**).

A. Plasma**B. Fígado**

C. Fezes

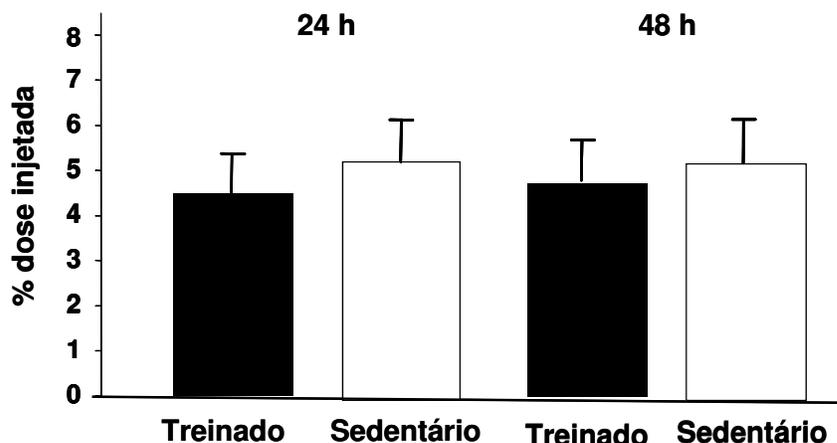


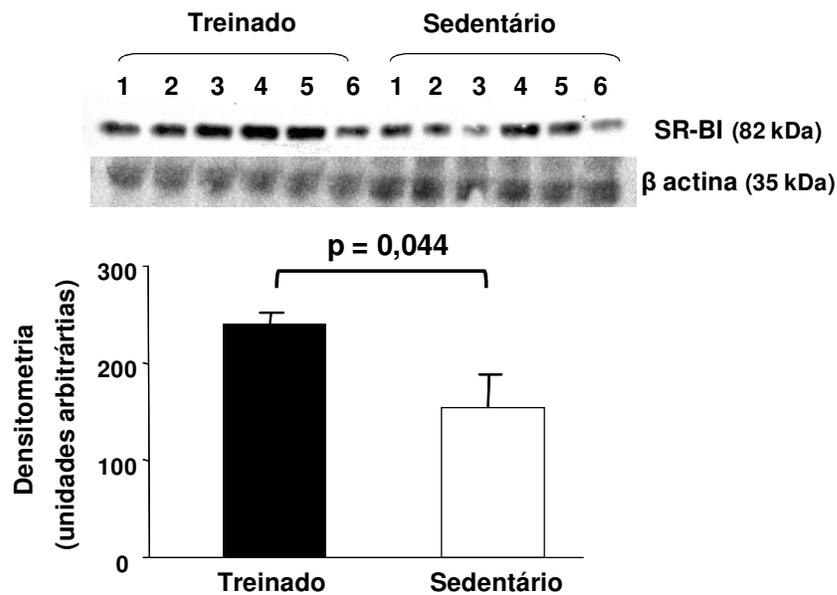
Figura 3. Porcentagem da dose injetada de ^3H -colesterol recuperada no plasma, fígado e fezes dos camundongos selvagens treinados e sedentários.

Camundongos selvagens treinados ($n = 9$) e sedentários ($n = 10$) receberam injeção intraperitoneal de macrófagos J774 enriquecidos com LDL acetilada e marcados com ^3H -colesterol ($\sim 3,5 \times 10^6$ células e 800.000 dpm). **A.** Após 24 h e 48 h, determinou-se a radioatividade em $10 \mu\text{L}$ de plasma. A radioatividade foi corrigida por 1 mL de plasma. **B.** Após 48h, o fígado foi removido e a radioatividade determinada após extração lipídica de um fragmento do órgão. A radioatividade foi corrigida pela massa total do órgão. **C.** O total de fezes foi colhido após 24 h e 48 h e a radioatividade determinada após extração lipídica. A radioatividade foi corrigida por 1 g de fezes.

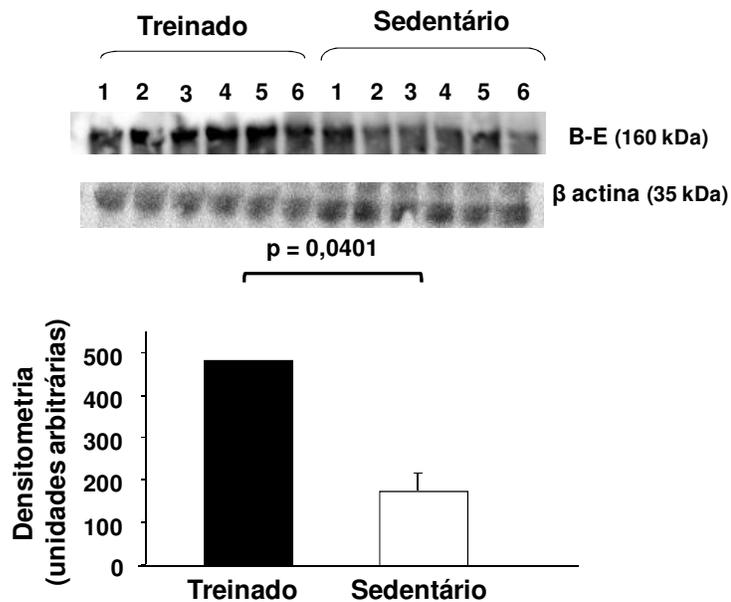
A expressão hepática dos receptores SR-BI e B-E aumentaram 60% e 2,5 vezes, respectivamente, nos animais selvagens treinados em comparação aos sedentários (**Figuras 4A e 4B**). Além disso, nos camundongos selvagens treinados, observou-se aumento de 2,4 vezes na

expressão do receptor nuclear LXR no fígado, em comparação aos sedentários (Figura 4C).

A. SR-BI



B. Receptor B-E



C. LXR

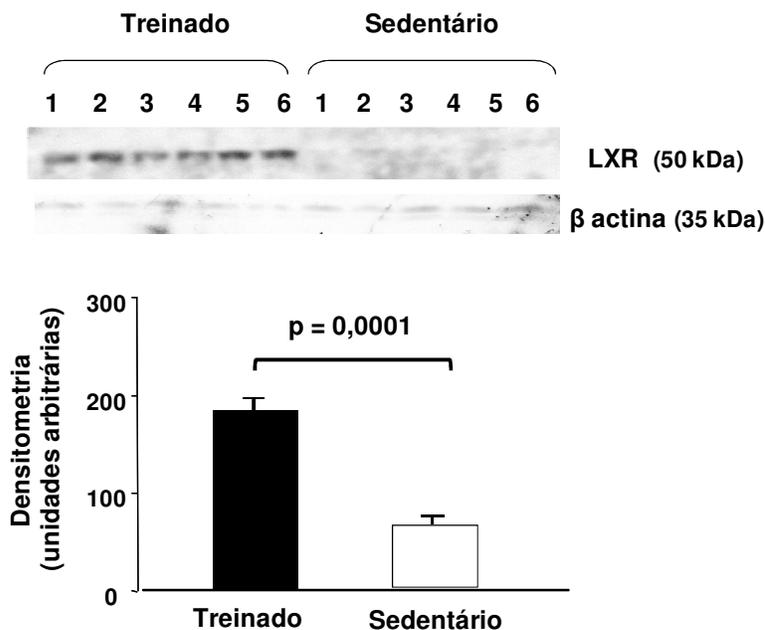
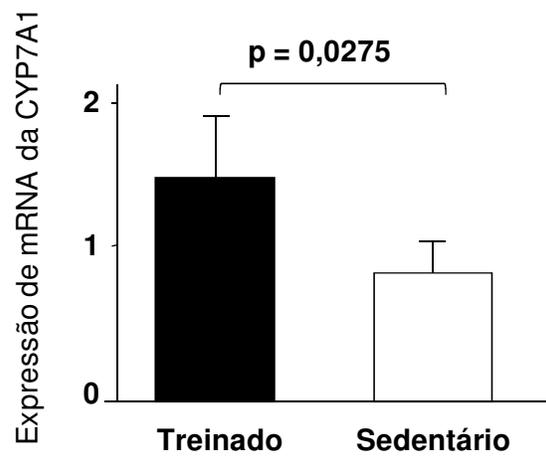
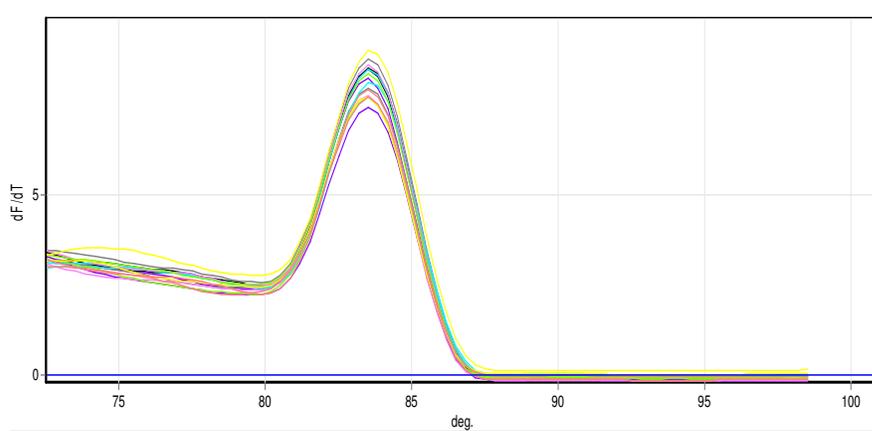


Figura 4. Expressão hepática dos receptores SR-BI, B-E e LXR em camundongos selvagens treinados e sedentários.

Após 6 semanas de protocolo experimental, a expressão hepática dos receptores SR-BI, B-E e LXR em camundongos selvagens treinados ($n = 6$) e sedentários ($n = 6$) foi determinada por meio de eletroforese em gel de poli-acrilamida 10%, 8% e 12%, respectivamente, seguida de imunoblot com anticorpo anti SB-BI, anti B-E e anti LXR (vide material e métodos). As bandas foram analisadas por densitometria e os valores expressos em unidades arbitrárias.

A expressão hepática do mRNA da enzima CYP7A1 foi aumentada pelo treinamento físico (**Figura 5A**), no entanto, o mRNA da enzima CYP27A foi semelhante entre os camundongos selvagens treinados e sedentários (**Figura 5B**).

A. CYP7A1**CURVA DE DISSOCIAÇÃO DO GENE 7 ALFA**

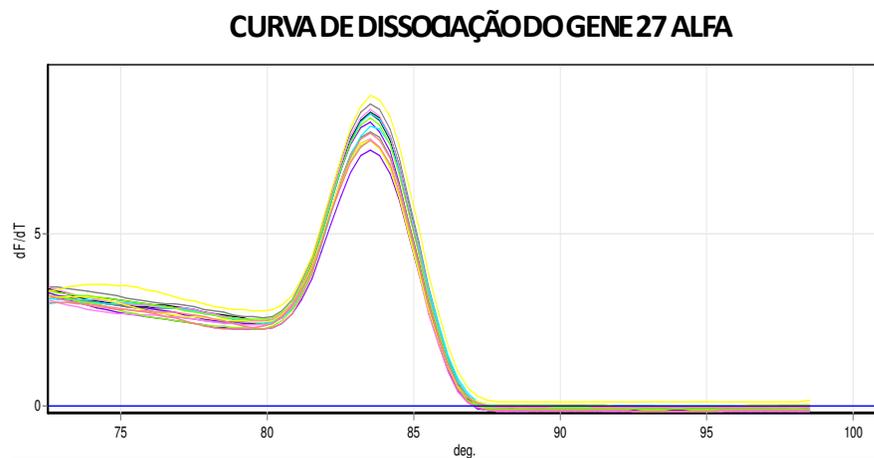
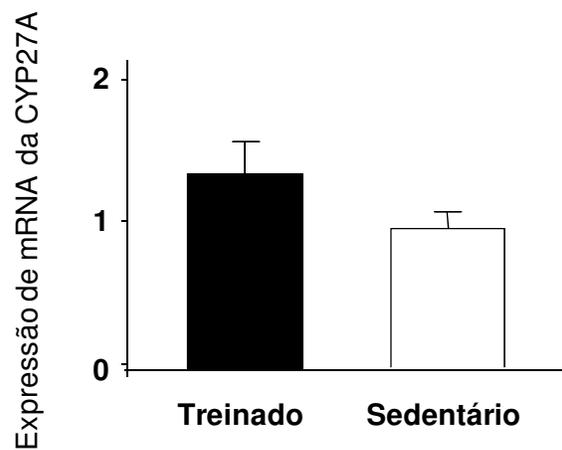
B. CYP27A

Figura 5. Expressão hepática do mRNA das enzimas CYP7A1 e CYP27A nos camundongos selvagens treinados e sedentários

Após 6 semanas de protocolo experimental, a expressão hepática do mRNA das enzimas CYP7A1 e CYP27A em camundongos selvagens treinados (n = 6) e sedentários (n = 4) foi determinada por meio de RT-PCR (vide materiais e métodos)

O conteúdo de colesterol no fígado dos camundongos selvagens não diferiu entre os grupos treinado (408 ± 12 mg/g de tecido) e sedentário (417 ± 28 mg/g de tecido).

Macrófagos isolados do peritônio dos animais selvagens sedentários e treinados foram testados quanto à habilidade em exportar ^{14}C -colesterol para um *pool* de HDL controle, isolada do plasma de indivíduos saudáveis. Não se observou diferença na saída de colesterol entre células isoladas de camundongos selvagens sedentários e treinados (**Figuras 6**). Além disso, nenhuma diferença na remoção de ^{14}C -colesterol foi encontrada quando macrófagos, isolados do peritônio de camundongos suíços controles, foram expostos ao soro dos animais selvagens treinados ou sedentários (**Figuras 7**).

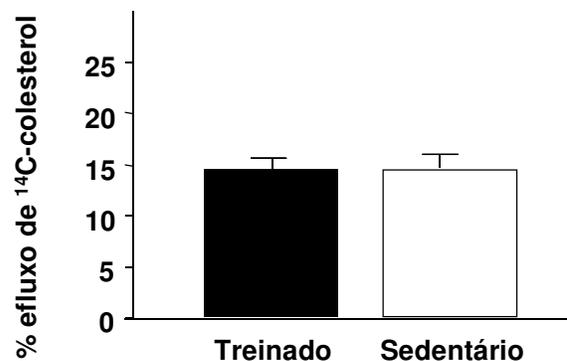


Figura 6. Efluxo de ^{14}C -colesterol de macrófagos isolados do peritônio de camundongos selvagens treinados e sedentários.

Após 6 semanas de estudo, macrófagos foram isolados do peritônio dos camundongos selvagens treinados e sedentários e incubados com LDL acetilada e ^{14}C -colesterol. O efluxo de ^{14}C -colesterol foi determinado mediante incubação, por 5h, com HDL₃ isolada de *pool* de plasma de indivíduos saudáveis. As incubações foram realizadas em quadruplicatas

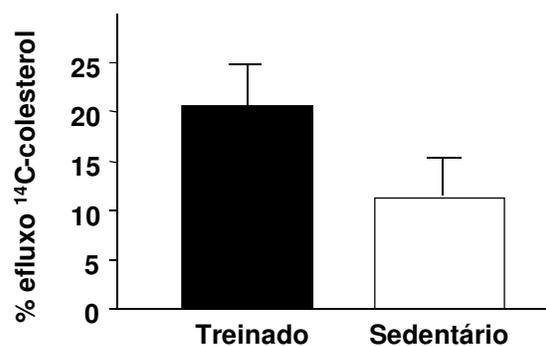


Figura 7. Efluxo de ^{14}C -colesterol de macrófagos isolados do peritônio de camundongos suíços controles para o soro de camundongos selvagens treinados e sedentários.

Macrófagos foram isolados do peritônio de camundongos suíços controles e incubados com LDL acetilada e ^{14}C -colesterol. O efluxo de ^{14}C -colesterol foi determinado mediante incubação, por 2h, com 0,2% de soro dos animais selvagens, obtido após 6 semanas de estudo. Os ensaios foram feitos em quadruplicatas.

A concentração de apoA-I no lavado peritoneal não foi alterada pelo treinamento físico nos animais selvagens (**Figura 8**).

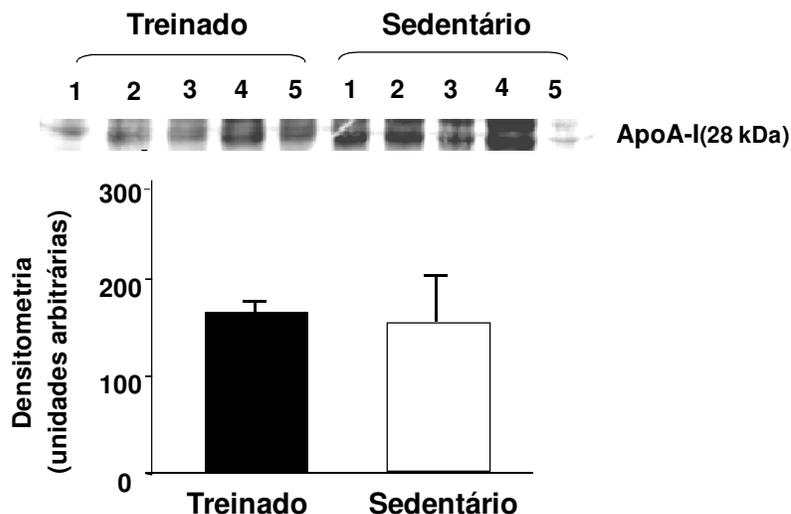


Figura 8. Expressão de apoA-I no lavado peritoneal dos camundongos selvagens treinados e sedentários

Após 6 semanas de estudo, macrófagos foram isolados do peritônio dos camundongos selvagens treinados ($n = 5$) e sedentários ($n = 5$), e a expressão de apoA-I no lavado peritoneal foi determinada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, seguida de imunoblot com anticorpo anti Apo A-I (vide material e métodos). As bandas foram analisadas por densitometria e os valores expressos em unidades arbitrárias.

Considerando-se o importante papel da CETP na modulação do fluxo centrípeto de colesterol ao longo do TRC em humanos, experimentos semelhantes foram realizados em camundongos transgênicos para CETP humana. O desenho experimental não objetivou a comparação entre animais selvagens e transgênicos; os experimentos foram realizados de forma independente e os animais não eram descendentes da mesma base genética.

O peso corporal, a concentração de colesterol total, triglicérides e a atividade da CETP não diferiram entre os grupos treinado e sedentário, nos

períodos basal e final e não variou após 6 semanas de treinamento. No entanto, a concentração plasmática de HDLc foi maior no período final do estudo nos animais CETP-tg treinados em comparação aos sedentários. (tabela 2).

Tabela 2 – Peso, concentração de lípides plasmáticos e atividade de CETP dos animais CETP-tg sedentários e treinados, antes (basal) e após (final) o período de 6 semanas de estudo

	C57BL/6 CETP - tg			
	Treinado (n = 10)		Sedentário (n = 11)	
	basal	final	basal	final
Peso (g)	19,4 ± 1,2	20,3 ± 1.3	20 ± 2,0	19,2 ± 2,0
CT (mg/dL)	52 ± 6	48 ± 5	61 ± 15	58 ± 12
TG (mg/dL)	56 ± 19	51 ± 19	41 ± 13	46 ± 14
HDLc (mg/dL) #	-	46 ± 2 *	-	38 ± 2
CETP atividade (%)	29 ± 5	32 ± 8	28 ± 5	34 ± 11

Antes do início do protocolo experimental e após 6 semanas, os animais treinados e sedentários foram pesados e a dosagem de colesterol total (CT), triglicérides (TG) e atividade da CETP foi determinada no plasma. # O HDLc foi determinado apenas no final do estudo, por meio da razão entre a área de colesterol da HDL e a área total de colesterol das lipoproteínas, obtidas por FPLC, multiplicado pela concentração total de colesterol no plasma. * p = 0,033

Observou-se maior área de colesterol da HDL nos animais CETP-tg treinados em comparação aos sedentários no final do estudo (**Figura 9**).

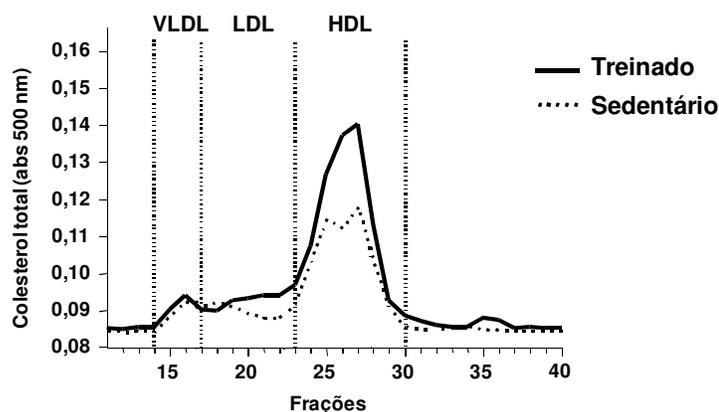
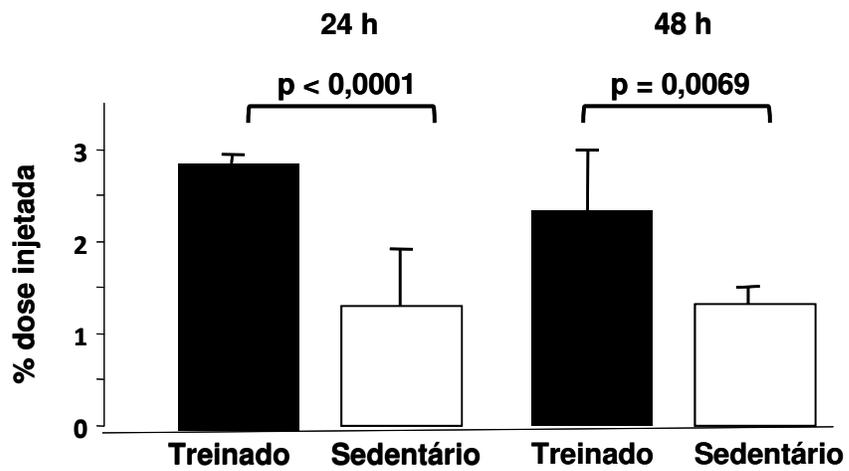
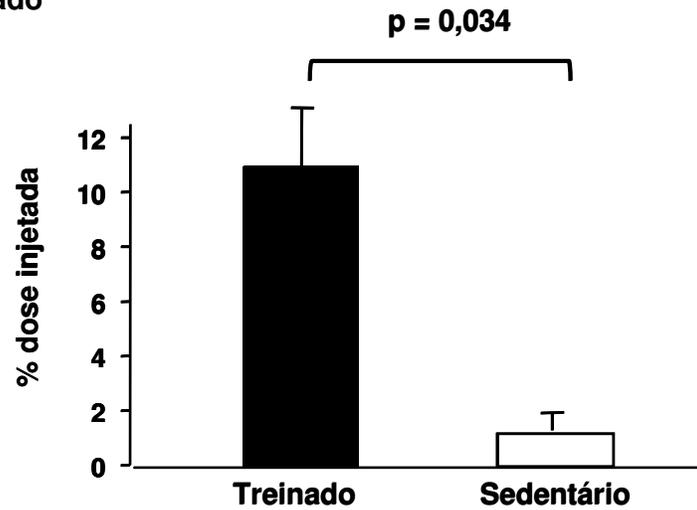


Figura 9. Perfil de lipoproteínas plasmáticas dos camundongos CETP-tg treinados e sedentários.

Após 6 semanas de protocolo experimental, plasma (100 μ L) de cada um dos animais CETP-tg, treinados e sedentários, foi aplicado em cromatografia líquida para determinação rápida de proteínas (FPLC). O perfil de distribuição de colesterol total nas frações de lipoproteínas (VLDL, LDL e HDL) foi analisado por método enzimático colorimétrico em sistema automatizado.

O aumento no transporte reverso de colesterol de macrófagos também foi evidenciado nos animais CETP-tg treinados, neste caso com maior recuperação de radioatividade no plasma (**Figura 10A**), fígado (**Figura 10B**) e, também, nas fezes (**Figura 10C**). A distribuição de ^3H -colesterol para outros órgãos, como baço, rins, pulmões e coração, tanto nos animais CETP-tg, como nos selvagens foi insignificante (dados não mostrados).

A. Plasma**B. Fígado**

C. Fezes

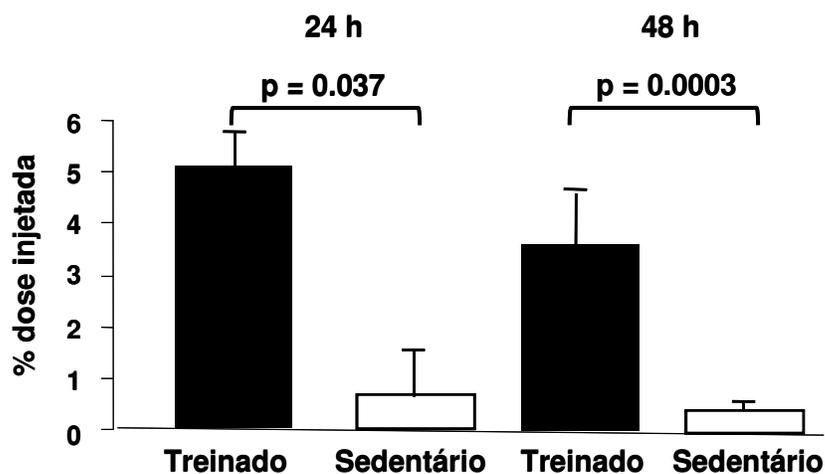


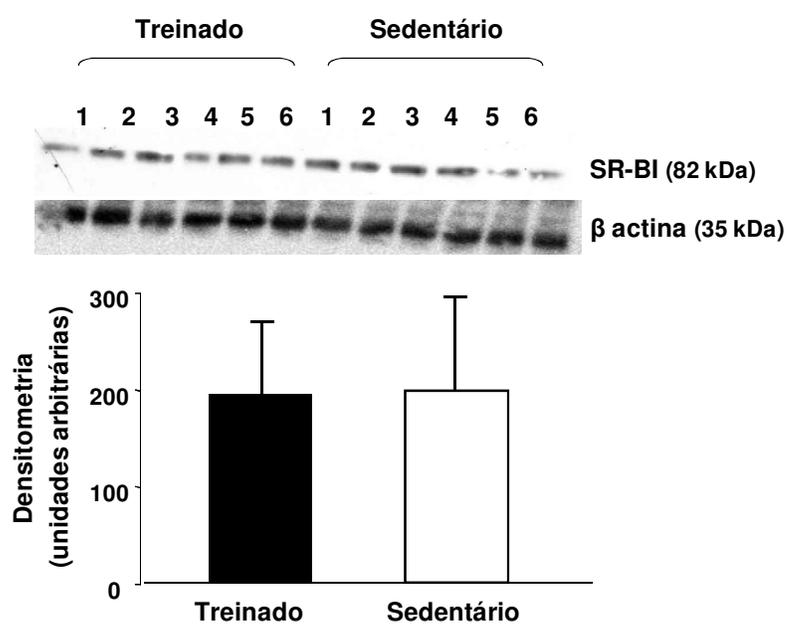
Figura 10. Porcentagem da dose injetada de ^3H -colesterol recuperada no plasma dos camundongos CETP-tg treinados e sedentários.

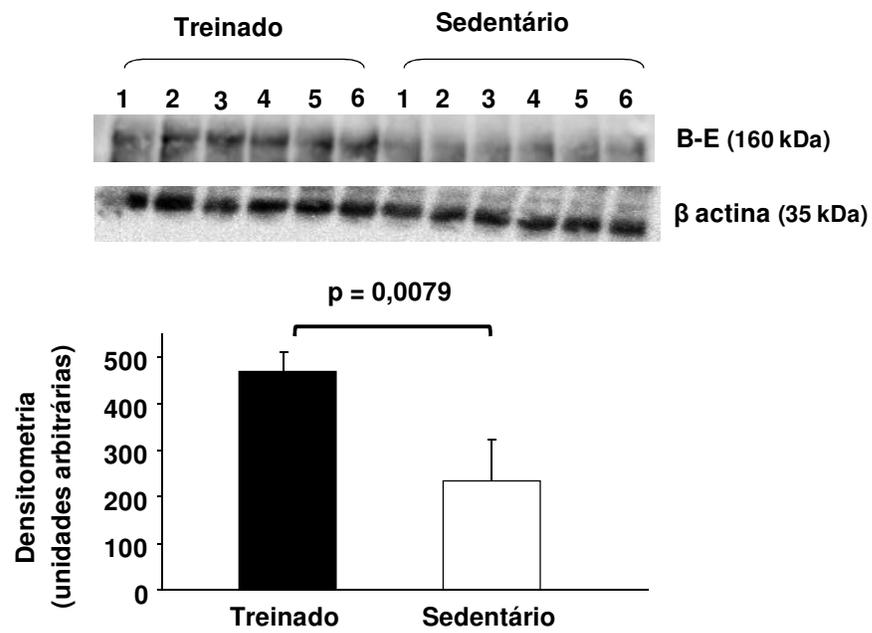
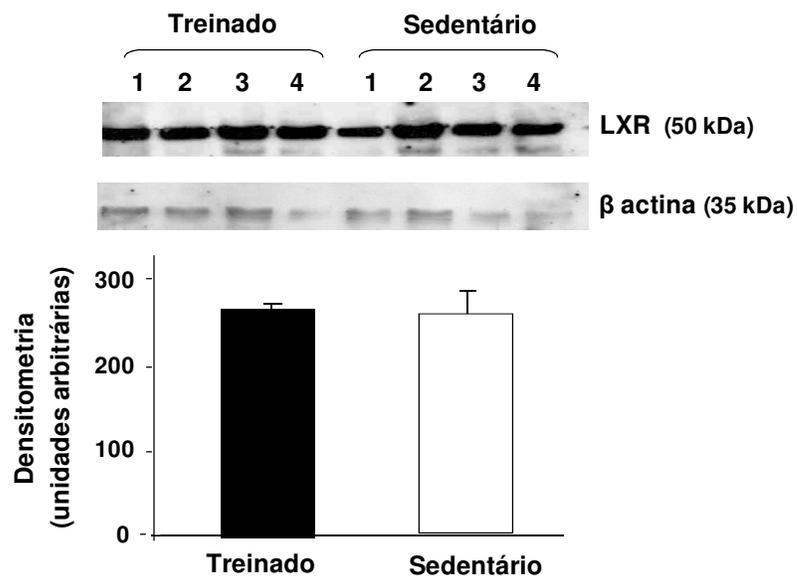
Camundongos CETP-tg treinados ($n = 11$) e sedentários ($n = 10$) receberam injeção intraperitoneal de macrófagos J774 enriquecidos com LDL acetilada e marcados com ^3H -colesterol ($\sim 3,5 \times 10^6$ células e 800.000 dpm). **A.** Após 24h e 48 h, determinou-se a radioatividade em 10 μL de plasma. A radioatividade foi corrigida por 1 mL de plasma. **B.** Após 48h, o fígado foi removido e a radioatividade determinada após extração lipídica de um pequeno fragmento do órgão. A radioatividade foi corrigida pela massa total do órgão. **C.** O total de fezes foi colhido após 24 h e 48 h e a radioatividade determinada após extração lipídica. A radioatividade foi corrigida por 1 g de fezes.

A expressão hepática do receptor SR-BI não diferiu entre os animais CETP-tg sedentários e treinados (**Figura 11A**). Porém, a expressão do receptor B-E foi aumentada no fígado dos animais CETP-tg treinados, em comparação aos sedentários (**Figuras 11B**). Na **Figura 11C** nota-se

expressão semelhante de LXR entre os animais CETP-tg treinados e sedentários. Todavia, a expressão de ABCA-1, cujo gene é positivamente modulado por LXR, foi 100% maior nos camundongos CETP-tg treinados em comparação aos sedentários (**Figura 11D**).

A. SR-BI



B. Receptor B-E**C. LXR**

D. ABCA-1

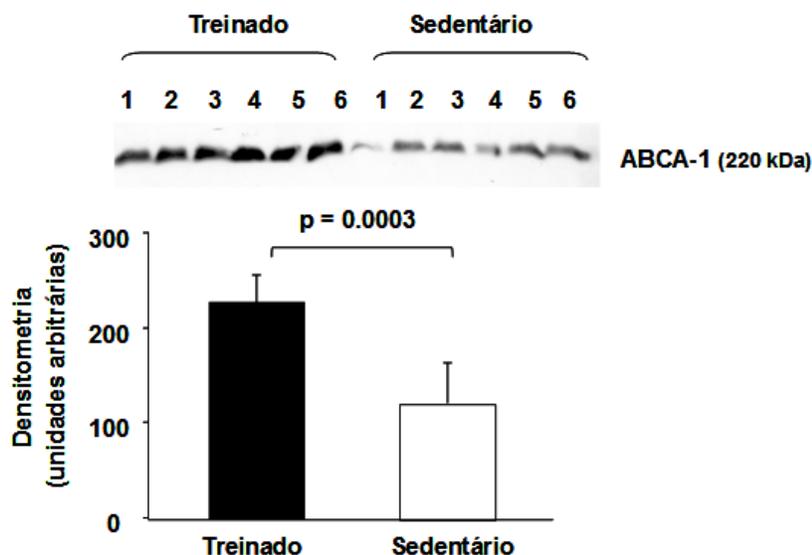
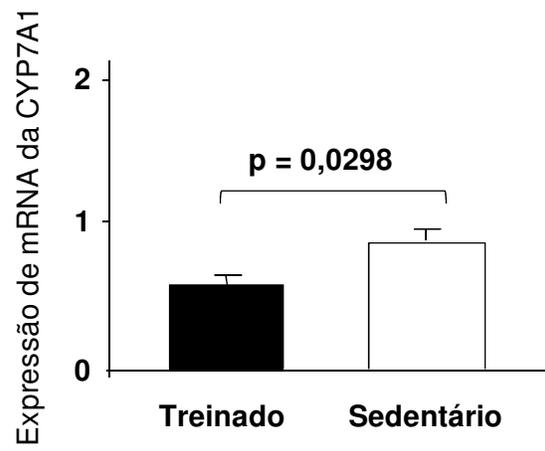
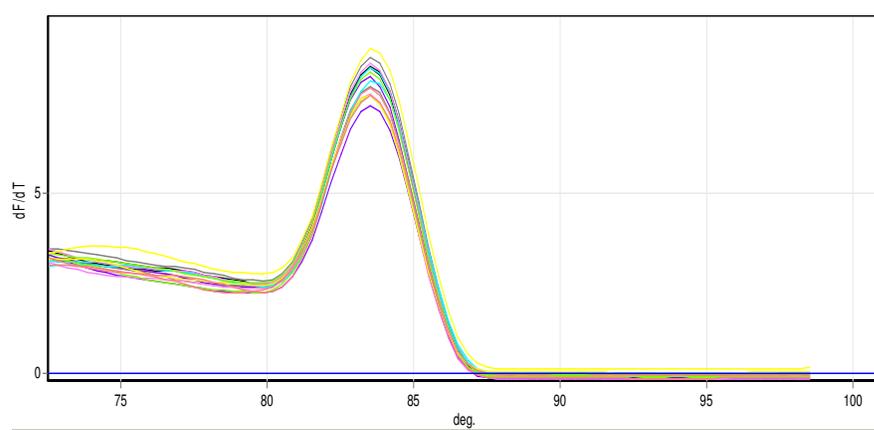


Figura 11. Expressão hepática dos receptores SR-BI, B-E, LXR e ABCA-1 em camundongos CETP-tg treinados e sedentários.

Após 6 semanas de protocolo experimental, a expressão hepática dos receptores SR-BI, B-E, LXR e ABCA-1 em camundongos selvagens e CETP-tg treinados (n = 6, n=4 no receptor LXR) e sedentários (n = 6, n=4 no receptor LXR), foi determinada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, 8%, 12% e 6%, respectivamente, seguida de imunoblot com anticorpo anti SR-BI, anti B-E, anti LXR e anti ABCA-1 (vide material e métodos). As bandas foram analisadas por densitometria e os valores expressos em unidades arbitrárias

A expressão do mRNA da enzima CYP7A1 no fígado foi menor nos animais treinados em relação aos sedentários (**Figura 12A**), porém a expressão hepática do mRNA da enzima CYP27A não diferiu entre os camundongos CETP-tg treinados e sedentários (**Figura 12B**).

A. CYP7A1**CURVA DE DISSOCIAÇÃO DO GENE 7 ALFA**

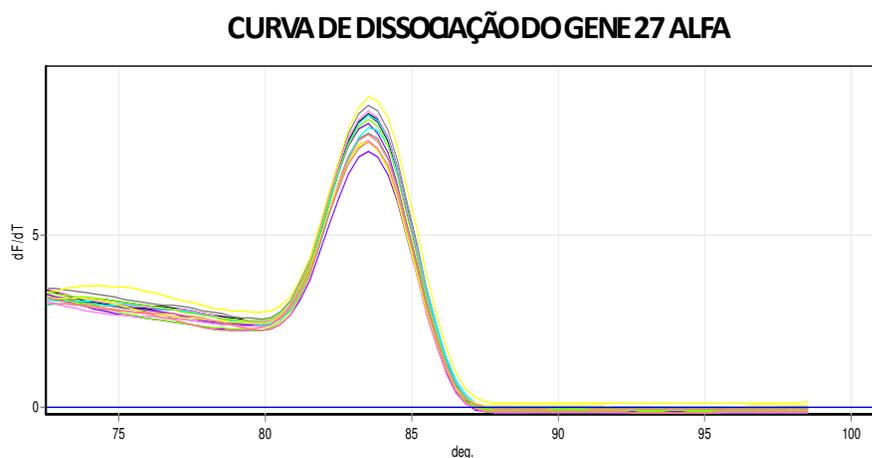
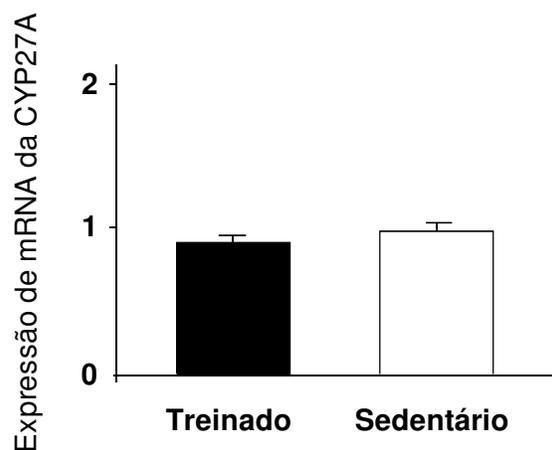
B.CYP27A

Figura 12. Expressão hepática do mRNA das enzimas CYP7A1 e CYP27A nos camundongos CETP-tg treinados e sedentários

Após 6 semanas de protocolo experimental, a expressão hepática do mRNA das enzimas CYP7A1 e CYP27A em camundongos CETP-tg treinados (n = 6) e sedentários (n = 6) foi determinada por meio de RT-PCR (vide materiais e métodos)

Nos camundongos CETP-tg o conteúdo hepático de colesterol não foi alterado pelo treinamento físico (animais treinados 433 ± 30 mg/g de tecido) em comparação aos animais sedentários (404 ± 18 mg/g de tecido).

A exportação de ^{14}C -colesterol de macrófagos isolados do peritônio dos animais CETP-tg sedentários e treinados para um *pool* de HDL controle, foi semelhante (**Figura 13**). Da mesma forma, não se observou diferença na remoção de ^{14}C -colesterol, mediada pelo soro dos animais CETP-tg treinados e sedentários (**Figura 14**).

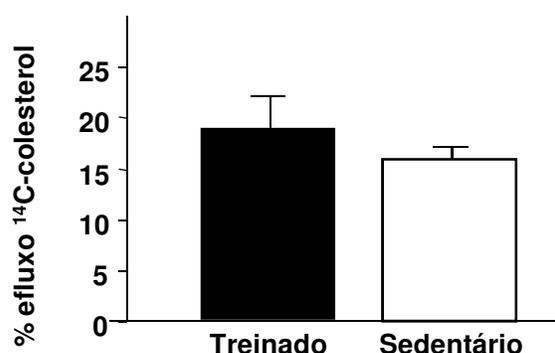


Figura 13. Efluxo de ^{14}C -colesterol de macrófagos isolados do peritônio de camundongos CETP-tg treinados e sedentários.

Após 6 semanas de estudo, macrófagos foram isolados do peritônio dos camundongos CETP-tg treinados e sedentários e incubados com LDL acetilada e ^{14}C -colesterol. O efluxo de ^{14}C -colesterol foi determinado mediante incubação, por 5h, com HDL₃ isolada de *pool* de plasma de indivíduos saudáveis. As incubações foram realizadas em quadruplicata.

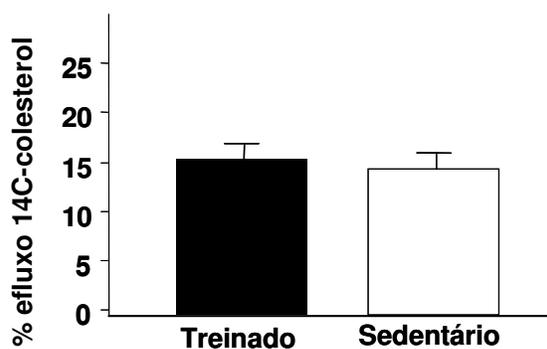


Figura 14. Efluxo de ^{14}C -colesterol de macrófagos isolados do peritônio de camundongos suíços controles para o soro de camundongos CETP-tg treinados e sedentários.

Macrófagos foram isolados do peritônio de camundongos suíços controles e incubados com LDL acetilada e ^{14}C -colesterol. O efluxo de ^{14}C -colesterol foi determinado mediante incubação, por 2h, com 0,2% de soro dos animais selvagens e CETP-tg, obtido após 6 semanas de estudo. Os ensaios foram feitos em quadruplicata.

A concentração de apoA-I no lavado peritoneal não foi alterada pelo treinamento físico nos animais selvagens e CETP-tg (**Figura 15**).

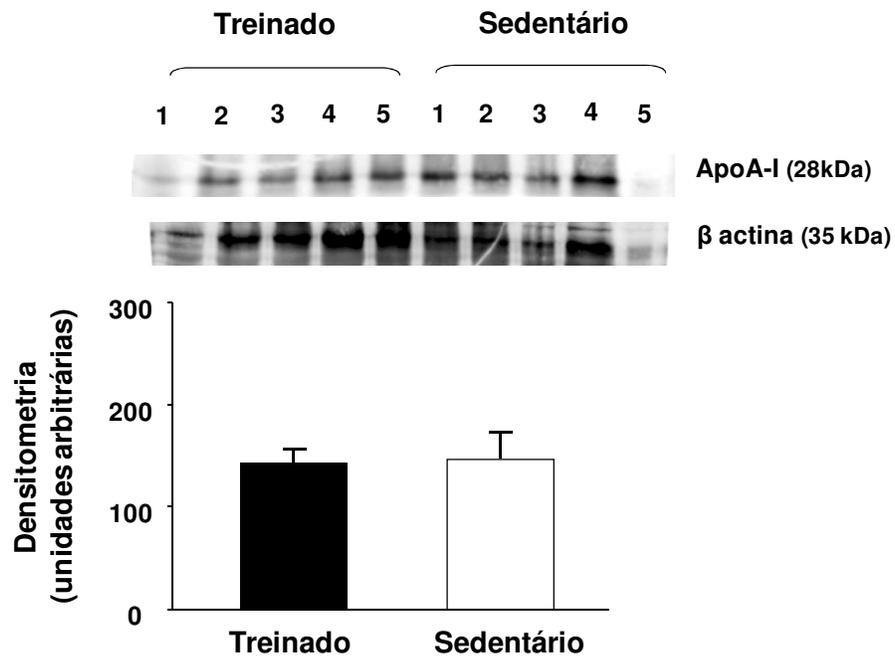


Figura 15. Expressão de apoA-I no lavado peritoneal dos camundongos CETP-tg treinados e sedentários

Após 6 semanas de estudo, macrófagos foram isolados do peritônio dos camundongos selvagens e CETP-tg treinados ($n = 5$) e sedentários ($n = 5$), e a expressão de apoA-I no lavado peritoneal foi determinada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, seguida de imunoblot com anticorpo anti Apo A-I (vide material e métodos). As bandas foram analisadas por densitometria e os valores expressos em unidades arbitrárias

5. Discussão

A prática regular de exercício físico aeróbio exerce importantes ações antiaterogênicas, as quais se refletem na prevenção do estabelecimento e progressão da lesão aterosclerótica (Shimada et al., 2007, Napoli et al. 2006 e Ramachandran et al., 2004).

No presente estudo, avaliamos o papel do treinamento físico em camundongos C57BL/6 selvagens e CETP-tg sobre o TRC. Este sistema representa mecanismo ímpar de ajuste da concentração de colesterol em macrófagos arteriais, constituindo importante via antiaterogênica (Johnson et al., 1997). A metodologia de injeção intraperitoneal de macrófagos sobrecarregados com LDL acetilada e marcados com ^3H -colesterol foi validada para determinação do TRC *in vivo*, refletida pela recuperação da radioatividade, ao longo do tempo, no compartimento plasmático, diferentes órgãos e fezes.

Macrófagos cultivados são marcados, na maioria dos estudos, com colesterol livre radioativo e, embora este seja passível de difusão inespecífica através das membranas celulares, a maior eficiência do TRC, observada em animais com expressão aumentada de proteínas-chave para o metabolismo das HDL, demonstra especificidade do método. Além disso, a quantidade de colesterol livre radioativo encontrada no plasma e nas hemácias é diminuta, evidenciando o processo subsequente de esterificação

do colesterol pela LCAT. Este último precede a remoção hepática de colesterol esterificado pelos receptores SR-BI, B-E e LRP.

Em camundongos com expressão aumentada de ABCA-1 e ABCG-1, seletivamente em macrófagos, ou animais que superexpressam apo A-I, observa-se maior eficiência do TRC (Wang et al., 2007 e Zhang et al., 2003). Interessante que, nestes animais, o desenvolvimento de aterosclerose, induzido por dieta, é menor em comparação aos selvagens, o que reforçou o importante papel do TRC de macrófagos na prevenção da aterosclerose, especificamente mediado pelos transportadores ABCA-1 e ABCG-1. A importância desta via também foi evidenciada em diferentes estudos (Calpe-Berdiel et al., 2005 e Wang et al., 2007) que demonstraram menor eficiência do TRC de macrófagos *in vivo* e maior susceptibilidade à aterosclerose em camundongos que não expressavam ABCA-1 (Mukhamedova et al., 2008). No entanto, a transfecção do receptor nestes animais restaurou o TRC e minimizou a sensibilidade à aterosclerose (Pennings et al., 2006).

Em nosso estudo, maior fluxo de colesterol dos macrófagos ao longo do TRC foi evidenciado pela recuperação de ^3H -colesterol no plasma e no fígado dos animais selvagens treinados em comparação aos sedentários. No entanto, não foi verificada maior excreção fecal de colesterol radioativo. Neste aspecto, a eliminação de colesterol nas fezes não tem sido sistematicamente alcançada em diferentes modelos experimentais que avaliam o TRC. Isto pode ser decorrente das diferentes metodologias utilizadas, bem como da pequena massa de colesterol arterial frente ao *pool* total deste esterol no plasma, linfa e fígado (Harada et al., 2007, Brousseau

et al., 2005 e Masson et al., 2004) ou ainda de uma cinética de excreção fecal que poderia requerer coleta fracionada e contínua de fezes por tempo mais longo do que tem sido feito habitualmente.

Embora o aumento da vascularização em diferentes territórios, decorrente do treinamento físico, possa contribuir para o maior fluxo sanguíneo ao fígado, a expressão do receptor SR-BI (60% superior em relação aos animais sedentários), certamente contribuiu como importante via para a captação hepática de colesterol advindo das HDL nos animais selvagens treinados. Apesar do receptor SR-BI não ser determinante para o efluxo de colesterol de macrófagos (Wang et al., 2007), sua participação no TRC é confirmada no tecido hepático e em órgãos esteroidogênicos (Williams et al., 1999). Neles, o SR-BI favorece a captação seletiva de colesterol esterificado das HDL, em detrimento de seus componentes proteicos. Em animais transgênicos para SR-BI, a prevalência de aterosclerose é reduzida, embora se observe redução do HDLc no plasma (Zhang, et al., 2005). Por outro lado, animais *knockout* para este receptor, apresentam menor eliminação de colesterol na bile e maior incidência de aterosclerose, embora com concentração elevada de HDLc (Zhang et al., 2003 e van der Velde et al., 2005).

Paralelamente ao incremento na expressão do SR-BI, obtivemos maior expressão do mRNA da CYP7A1, crítica para conversão de colesterol em ácidos biliares, quenodeoxicólico e cólico. Neste sentido, estudos prévios evidenciam que a captação de colesterol esterificado da HDL pelo SR-BI

favorece uma transferência direta de colesterol e ácidos biliares ao canalículo biliar.

Em camundongos selvagens submetidos a treinamento físico aeróbio por 12 semanas, Wilund et al. (2008) demonstraram aumento na expressão do mRNA da CYP27A e dos receptores SR-BI e B-E, embora não tenham evidenciado modificação no mRNA da CYP7A1. Diferentemente do que foi relatado por esses autores, em nosso estudo a expressão do mRNA enzima CYP7A1 foi maior nos camundongos selvagens treinados em comparação aos sedentários. Por outro lado, não observamos modificações na expressão da CYP27A entre os animais selvagens. Vale ressaltar, que a CYP27A medeia a via neutra, alternativa de conversão de colesterol em ácidos biliares que promove principalmente a formação de quenodeoxicólico. O aumento da expressão da CYP7A1 reforça a evidência de aumento no TRC neste modelo, apesar de não termos notado diferença quanto à excreção fecal de colesterol radioativo entre o grupo selvagem treinado e sedentário.

Embora a expressão do receptor B-E tenha sido aumentada pelo treinamento físico nos camundongos selvagens, sua contribuição ao TRC pode ter sido pequena em decorrência da ausência da CETP nestes animais. Sob este aspecto, estudo prévio de Wei et al. (2005) demonstrou aumento do mRNA do receptor B-E em camundongos selvagens submetidos a 2 semanas de treinamento físico; embora a quantificação do mRNA possa não corresponder ao conteúdo proteico expresso no hepatócito devido a mecanismos de estabilização pós-traducional deste receptor.

Não foi observada diferença na concentração plasmática de HDLc entre animais selvagens treinados e sedentários. Por esta razão, vale a pena ressaltar que, devido à limitação na quantidade de amostras de plasma dos animais, a determinação do HDLc foi indiretamente calculada a partir da razão entre a área de colesterol da HDL e a área total de colesterol das lipoproteínas (obtidas por FPLC), multiplicada pela concentração total de colesterol no plasma. Além disso, o aumento da expressão do SR-BI poderia ter contrabalançado a elevação do HDLc, frequentemente observada após treinamento físico aeróbio.

A utilização de camundongos CETP-tg foi importante para melhor entendimento dos efeitos do treinamento físico num modelo experimental cujo metabolismo lipídico é mais semelhante ao do ser humano. A CETP é a força motriz para o TRC contribuindo para a transferência de lípidos neutros entre as lipoproteínas e, conseqüentemente, para a maturação das partículas de HDL e reciclagem de seus componentes.

Em estudo recente, a expressão elevada de CETP aumentou de forma concentração-dependente o TRC de macrófagos (Tanigawa et al., 2007). Resultado semelhante foi observado por Tchoua et al. (2008), que observaram maior porcentagem de colesterol radioativo recuperada no plasma, fígado e fezes em animais que expressavam CETP em comparação aos selvagens. No entanto, Rotllan et al., (2008) não mostraram estímulo ao TRC em animais CETP-tg quando comparados aos selvagens. As discrepâncias observadas entre estes estudos podem estar relacionadas a diferenças no modelo animal estudado (CETP-tg / LDRr / apobec-1-DKO e

CETP-tg/ SR-BI KO e CETP-tg nos primeiros estudos e CETP-tg apenas, no segundo), bem como a linhagem celular injetada na cavidade peritoneal. Além disso, os animais diferiam em relação à espécie de CETP que expressavam (humano nos dois primeiros e macaco no último).

Em nosso estudo, maior fluxo de colesterol ao plasma, fígado e fezes, independentemente de variação na atividade plasmática de CETP, foi observado nos camundongos CETP-tg treinados. É interessante notar que a CETP contribui, diretamente, para a captação hepática de colesterol esterificado das HDL. Este evento parece ser desvinculado de sua atividade plasmática (Klerkx et al., 2006) e independente dos receptores B-E, SR-BI e LRP (Gauthier, et al., 2005 e, Zhou, et al., 2006). Hepatócitos isolados de camundongos *knockout* para SR-BI apresentam menor captação de ^3H -colesterol esterificado advindo de HDL. Porém, quando os mesmos foram incubados com CETP exógena, observou-se aumento na internalização de colesterol, em extensão similar àquela observada em células controles, isoladas de animais que expressavam SR-BI. Sendo assim, o SR-BI e a CETP constituem vias distintas que agem sinergicamente, no hepatócito, mediando a captação de colesterol esterificado das HDL.

A expressão hepática de SR-BI foi semelhante entre camundongos CETP-tg treinados e sedentários. Sendo assim, nestes animais, o SR-BI não parece ter contribuído para a maior captação hepática de colesterol e excreção fecal.

Conforme salientado, a CETP cria uma via adicional de remoção hepática de colesterol por intermédio dos receptores B-E, LRP e E, uma vez

que transfere colesterol esterificado para lipoproteínas que contêm apo B (quilomícrons, VLDL e LDL). Desta maneira, a maior expressão do receptor B-E no fígado dos camundongos CETP-tg treinados contribuiu para a maior eficiência do TRC. Isto reforça a importância da CETP na distribuição do colesterol entre lipoproteínas que podem ser captadas pelos receptores B-E e não prioritariamente pelo SR-BI, como ocorre em espécies que não expressam CETP.

Surpreendentemente, a expressão do mRNA da CYP7A1 foi menor nos animais CETP-tg treinados, em comparação aos sedentários. A interpretação deste achado fica limitada pela falta de análise da distribuição de colesterol livre e ácidos biliares na bile e nas fezes destes animais. A modulação de outros transportadores de colesterol, que não foram avaliados no presente estudo, poderia ter contribuído para a maior eliminação de colesterol livre na bile, a saber: os receptores ABCG-5 e ABCG-8. No entanto, Wilund et al. (2008) não evidenciaram alteração hepática no mRNA de ABCG-5, ABCG-8, embora os camundongos estudados não tenham sido CETP-tg. Além disso, a ação do exercício físico sobre outros importantes mediadores da excreção líquida de colesterol no canalículo biliar, como a proteína NPC1L1 (Temel et al., 2007) não foi demonstrada até o momento.

O treinamento físico aeróbio, em grande parte dos estudos (Kodama et al., 2007), demonstra-se efetivo em elevar o HDLc no plasma. No entanto, observa-se grande heterogeneidade na resposta, a qual está, na maioria das vezes, vinculada à melhor metabolização dos triglicérides, sensibilidade à insulina, perda de peso, bem como às características do exercício, como

frequência, intensidade e duração (Kraus et al., 2004). Além disso, polimorfismos da CETP e de outras proteínas envolvidas no metabolismo das HDL, como as apoE e A-I, parecem influenciar a resposta do HDLc frente ao exercício (Sorlí et al., 2006, Mukherjee et al., 2004 e Ruãno et al., 2006).

A modulação da atividade da CETP pode contribuir para incremento no HDLc, embora não haja consenso acerca do papel do exercício físico sobre sua atividade. Gupta et al. (1993) demonstraram aumento na atividade CETP em atletas comparados a sedentários. Outros autores (Sutherland et al., 1993, Brites et al., 2004 e Olchawa et al., 2004), entretanto, não demonstraram diferença entre indivíduos que se exercitavam e controles sedentários. Föger et al. (1994) demonstraram que após uma sessão de exercício físico, a massa de CETP apresentava-se diminuída. Estas discrepâncias podem estar relacionadas a diferentes metodologias empregadas para medida da CETP, bem como à variação no perfil lipídico dos indivíduos.

Conforme já salientado, em nosso estudo não se observou variação na atividade plasmática da CETP. No entanto, a concentração de HDLc foi maior nos animais exercitados, o que pode caracterizar modificação em vias de geração e/ ou catabolismo das HDL que não foram avaliadas.

Maior geração muscular de pré-beta HDL é demonstrada durante sessão de exercício (Sviridov et al., 2003), a qual parece refletir maior habilidade do soro de atletas em remover colesterol celular (Brites et al., 2004). Além disso, favorecimento da maturação de pequenas partículas de

HDL tem sido descrita frente ao treinamento físico em diabéticos, com enriquecimento de HDL maiores (HDL₂) em triglicérides (Ribeiro et al., 2008). A concentração de HDL no plasma é também beneficiada pelo exercício físico aeróbio, graças à redução do catabolismo de sua principal apolipoproteína, a apo A-I (Sasaki et al., 1988) e, provavelmente, pelo aumento da expressão do mRNA de ABCA-1 no fígado (Ghanbari-Niaki et al., 2007) e no intestino (Khabazian et al., 2009). De fato, evidenciamos aumento na expressão hepática de ABCA-1 nos camundongos CETP-tg treinados, o que se refletiu na maior concentração de HDLc. Além disso, o incremento na expressão de ABCA-1 poderia representar um mecanismo de adaptação dos animais CETP-tg frente à maior expressão dos receptores B-E. No entanto, a falta de determinação da expressão de ABCA-1 nos animais selvagens treinados e sedentários constitui uma limitação a esta interpretação.

A concentração de apo A-I no lavado peritonial não foi alterada pelo treinamento físico nos animais selvagens e CETP-tg, não sendo, portanto, responsável pelo maior fluxo de colesterol dos macrófagos injetados ao plasma. Não obstante, a concentração de HDLc, maior nos animais CETP-tg treinados, contribui também para o maior tráfego ao longo do TRC.

Não foi evidenciada alteração no efluxo de colesterol de macrófagos isolados de animais selvagens ou CETP-tg treinados e sedentários. Da mesma forma, não houve alteração no efluxo de colesterol de macrófagos controles, mediado pelo soro dos animais treinados e sedentários. Uma importante consideração deve ser feita, já que as análises realizadas em células cultivadas podem não refletir apropriadamente as interações

metabólicas que ocorrem no organismo intacto. Sendo assim, é possível que outros mecanismos no âmbito celular, por exemplo, relativos à expressão de receptores de HDL que medeiam a exportação de colesterol também possam ser modulados pelo exercício físico.

Hoang et al. (2007) demonstraram aumento na expressão de mRNA de ABCA-1 em leucócitos de indivíduos treinados em relação aos sedentários. Butcher et al. (2008) evidenciaram que o treinamento físico aeróbio de baixa intensidade, por 8 semanas, foi capaz de aumentar a expressão do mRNA dos receptores ABCA-1, ABCG-1 e CD-36 em leucócitos humanos. O aumento do receptor CD-36 que capta lipoproteínas modificadas poderia, a princípio, ser de um lado considerado pró-aterogênico, embora o maior aporte de colesterol suscitado por este receptor associe-se ao aumento de vias de exportação de lípidos de macrófagos (ABCA-1 e ABCG-1). Estes eventos foram vinculados com a maior ativação de fatores de transcrição relacionados à modulação do metabolismo de lípidos plasmáticos e teciduais, como o LXR e o receptor ativado por proliferadores de peroxissomos do tipo gama (PPAR γ) (Butcher et al., 2008).

Em nosso estudo, a expressão hepática de LXR aumentou nos animais selvagens treinados em comparação aos sedentários. Naik et al. (2006), demonstraram aumento no TRC em três diferentes modelos de camundongos (selvagens, LDLr/apobec-1 *knockout* e duplo transgênico para apoB e CETP humana) quando tratados com agonista de LXR, reforçando a importância deste receptor para o TRC. Em contrapartida, no presente estudo, no grupo CETP-tg o exercício físico não alterou a expressão

hepática do LXR. Por outro lado, expressão hepática de ABCA-1, cujo gene é alvo do LXR, aumentou 100% nos animais CETP-tg exercitados, refletindo possivelmente uma regulação pós-traducional da proteína deste receptor.

Observamos maior eficiência no TRC nos modelos experimentais estudados, porém, pelo fato dos camundongos CETP-tg representarem um modelo semelhante aos humanos no que se refere o TRC, os achados apontam para importante papel do exercício físico aeróbio regular na melhoria do TRC em humanos e na prevenção da gênese e progressão da aterosclerose.

6. Conclusões

O treinamento físico aeróbio acelera o TRC de macrófagos em camundongos C57BL/6 selvagens, devido ao aumento da expressão do receptor hepático SR-BI e maior expressão do mRNA da CYP7A. Nos animais transgênicos para CETP humana, a maior eficiência deste sistema, decorrente do treinamento físico aeróbio, é consequente da maior expressão dos receptores de LDL no fígado e do aumento de HDLc, embora a ação direta da CETP sobre a captação hepática de colesterol esterificado das HDL não possa ser descartada.

7. Referências

- Baker N, Schotz MC. Use of multicompartmental models to measure rates of triglyceride metabolism in rats. *J Lipid Res* 1964; 5: 1888 - 97.
- Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJ, Komajda M, Lopez-Sendon J, Mosca L, Tardif JC, Waters DD, Shear CL, Revkin JH, Buhr KA, Fisher MR, Tall AR, Brewer B; ILLUMINATE Investigators. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Eng. J Med.* 2007;357:2109–22.
- Basso F, Amar MJ, Wagner EM, Vaisman B, Paigen B, Santamarina-Fojo S, Remaley AT. Enhanced ABCG1 Expression Increases Atherosclerosis in LDLr-KO Mice on a Western Diet. *Bioch Biophys Res Comm.* 2006; 351: 398 – 404.
- Brites F, Verona J, Gietere CD, Fruchart JC, Castro G, Wikinski R. Enhanced cholesterol efflux promotion in well trained soccer players. *Metabolism* 2004; 53: 1262 - 6.
- Brousseau ME, Diffenderfer MR, Millar JS, Nartsupha C, Asztalos BF, Welty FK, Wolfe ML, Rudling M, Björkhem I, Angelin B, Mancuso JP, Digenio AG, Rader DJ, Schaefer EJ. Effects of cholesteryl ester transfer protein inhibition on high-density lipoprotein subspecies, apolipoprotein A-I metabolism, and fecal sterol excretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 1057-64.
- Brunham LR, Kruit JK, Iqbal J, Fievet C, Timmins JM, Pape TD, Coburn BA, Bissada N, Staels B, Groen AK, Hussain MM, Parks JS, Kuipers F,

- Hayden MR. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest*. 2006;116: 1052 – 62.
- Butcher LR, Thomas A, Backx K, Roberts A, Webb R, Morris K. Low-intensity exercise exerts beneficial effects on plasma lipids via PPAR γ . *Med Sci Sports Exerc* 2008; 40: 1263-70.
- Calabresi L, Baldassarre D, Castelnuovo S, Conca P, Bocchi L, Candini C, Frigerio B, Amato M, Sirtori CR, Alessandrini P, Arca M, Boscutti G, Cattin L, Gesualdo L, Sampietro T, Vaudo G, Veglia F, Calandra S, Franceschini G. Functional Lecithin: Cholesterol Acyltransferase Is Not Required for Efficient Atheroprotection in Humans. *Circulation*. 2009 no prelo.
- Calpe-Berdiel L, Rotllan N, Palomer X, Ribas V, Blanco-Vaca F, Escolà-Gil JC. Direct evidence *in vivo* of impaired macrophage-specific reverse cholesterol transport in ATP-binding cassette transporter A1-deficient mice, *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1738: 6 – 9.
- Duong M, Collins HL, Jin W, Zanotti I, Favari E, Rothblat G. Relative contributions of ABCA-1 and SR-BI to cholesterol efflux to serum from fibroblasts and Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26: 541-7.
- Eckardstein AV, Nofer JR, Assman G. Acceleration of Reverse Cholesterol Transport. *Curr Opin Cardiol*. 2000; 15: 348-54.
- Föger B, Wohlfarter T, Ritsch A, Lechleitner M, Miller CH, Dienstl A, Patsch JR. Kinetics of lipids, apolipoproteins, and cholesteryl ester transfer protein in plasma after a bicycle marathon. *Metabolism*. 1994; 43: 633 – 9.

- Gälman C, Arvidsson I, Angelin B, Rudling M. Monitoring Hepatic Cholesterol 7 α -hydroxylase Activity by Assay of the Stable Bile Acid Intermediate 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one in peripheral blood. *J Lipid Res* 2003; 4: 859-65.
- Gauthier A, Lau P, Zha X, Milne R, McPherson R. Cholesteryl ester transfer protein directly mediates selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters by the liver. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 2177-84.
- Ghanbari-Niaki A, Khabazian BM, Hossaini-Kakhak SA, Rahbarizadeh F, Hedayati M. Treadmill exercise enhances ABCA1 expression in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 361: 841-6.
- Gupta AK, Ross EA, Myers JN, Kashyap ML. Increased Reverse Cholesterol Transport in Athletes. *Metabolism* 1993; 42: 684-90.
- Harada LM, Amigo L, Cazita PM, Salerno AG, Rigotti AA, Quintão EC, Oliveira HC. CETP expression enhances liver HDL-cholesteryl ester uptake but does not alter VLDL and biliary lipid secretion. *Atherosclerosis.* 2007;191: 313-8.
- Havel RJ, Edre HÁ, Gragdon JH The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoprotein in human serum *J Clin Invest.* 1955; 34: 345-53.
- Hoang A, Tefft C, Duffy SJ, Formosa M, Henstridge DC, Kingwell BA, Sviridov D. ABCA1 expression in humans is associated with physical activity and alcohol consumption. *Atherosclerosis* 2008; 197: 197-203.

- Iborra RT, Ribeiro IC, Neves MQ, Charf AM, Lottenberg SA, Negrão CE, Nakandakare ER, Passarelli M. Aerobic exercise training improves the role of high-density lipoprotein antioxidant and reduces plasma lipid peroxidation in type 2 diabetes mellitus. *Scand J Med Sci Sports*. 2008; 18: 742-50.
- Jafari M, Leaf DA, MacRae H, Kasem J, O'Conner P, Pullinger C, Malloy M, Kane JP. The effects of physical exercise on plasma prebeta-1 high density lipoprotein. *Metabolism* 2003; 52: 437 – 42.
- Jessep W, Gelissen IC, Gaus K, Kritharides L. Roles of ATP binding cassette transporters A1 and G1, scavenger receptor BI and membrane lipid domains in cholesterol export from macrophages. *Curr Opin Lipidol*. 2006; 17: 247 – 57.
- Joyce CW, Amar MJ, Lambert G, Vaisman BL, Paigen B, Najib-Fruchart J, Hoyt RF Jr, Neufeld ED, Remaley AT, Fredrickson DS, Brewer HB Jr, Santamarina-Fojo S. The ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) modulates the development of aortic atherosclerosis in C57BL/6 and apoE-knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99: 407-12
- Johnson WJ, Phillips MC, Rothblat GH. Lipoproteins and cellular cholesterol homeostasis. *Subcell Biochem*. 1997; 28: 235-76.
- Kastelein JJ, van Leuven SI, Burgess L, Evans GW, Kuivenhoven JA, Barter PJ, Revkin JH, Grobbee DE, Riley WA, Shear CL, Duggan WT, Bots ML; RADIANCE 1 Investigators. Effect of torcetrapib on carotid atherosclerosis in familial hypercholesterolemia. *N Eng. J Med* 2007; 356: 1620–30.

- Khabazian BM, Ghanbari-Niaki A, Safarzadeh-Golpordesari A, Ebrahimi M, Rahbarizadeh F, Abednazari H. Endurance training enhances ABCA1 expression in rat small intestine. *Eur J Appl Physiol*. 2009;107: 351-8.
- Klerkx AH, El Harchaoui K, van der Steeg WA, Boekholdt SM, Stroes ES, Kastelein JJ, Kuivenhoven JA. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibition beyond raising high-density lipoprotein cholesterol levels: pathways by which modulation of CETP activity may alter atherogenesis. *Arterioscler ThrombVasc Biol*. 2006; 26: 706-15.
- Kodama S, Tanaka S, Saito K, Shu M, Sone Y, Onitake F, Suzuki E, Shimano H, Yamamoto S, Kondo K, Ohashi Y, Yamada N, Sone H. Effect of aerobic exercise training on serum levels of high-density lipoprotein cholesterol: a meta-analysis. *Arch Intern Med*. 2007; 167: 999-1008.
- Kraus WE, Houmard JA, Duscha BD, Knetzger KJ, Wharton MB, McCartney JS, Bales CW, Henes S, Samsa GP, Otvos JD, Kulkarni KR, Slentz CA. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. *N Engl J Med*. 2004; 347: 1483-92.
- Kwiterovich PO Jr. The Antiatherogenic Role of High-Density Lipoprotein Cholesterol. *Am J Cardiol* 1998; 5: 13Q-21Q.
- Leaf DA. The Effect of Physical Exercise on Reverse Cholesterol Transport. *Metabolism* 2003; 52: 950-7.
- Lee, IM, Hsieh CC, Paffenbarger RS Jr. Exercise intensity and longevity in men. The Harvard Alumni Study. *JAMA* 1995; 273: 1179-84.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AI, Randall RJ Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.

Masson D, Staels B, Gautier T, Desrumaux C, Athias A, Le Guern N, Schneider M, Zak Z, Dumont L, Deckert V, Tall A, Jiang XC, Lagrost L. Cholesteryl ester transfer protein modulates the effect of liver X receptor agonists on cholesterol transport and excretion in the mouse. *J Lipid Res.* 2004; 45: 543-50.

Meilhac O, Ramachandran S, Chiang K, Santanam N, Parthasarathy S. Role of arterial wall antioxidant defense in beneficial effects of exercise on atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 1681-88.

Mukhamedova N, Escher G, D'Souza W, Tchoua U, Grant A, Krozowski Z, Bukrinsky M, Sviridov D. Enhancing apolipoprotein A-I-dependent cholesterol efflux elevates cholesterol export from macrophages *in vivo*. *J Lipid Res.* 2008; 49: 2312–22.

Mukherjee M, Shetty KR. Variations in high-density lipoprotein cholesterol in relation to physical activity and Taq 1B polymorphism of the cholesteryl estertransfer protein gene. *Clin Genet.* 2004; 65: 412-8.

Napoli C, Williams-Ignarro S, Nigris F, Lerman LO, D'Armiento FP, Crimi E, Byrns RE, Casamassimi A, Lanza A, Gombos F, Sica V. Physical training and metabolic supplementation reduce spontaneous atherosclerotic plaque rupture and prolong survival in hypercholesterolemic mice. *PNAS.* 2006;13: 10479-84.

Nissen SE, Tardif JC, Nicholls SJ, Revkin JH, Shear CL, Duggan WT, Ruzyllo W, Bachinsky WB, Lasala GP, Tuzcu EM; ILLUSTRATE Investigators. Effect of torcetrapib on the progression of coronary atherosclerosis. *N Eng J Med* 2007; 356: 1304–16 .

- Olchawa B, Kingwell BA, Hoang A, Schneider L, Miyazaki O, Nestel P, Sviridov D. Physical Fitness and Reverse Cholesterol Transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 1087-91.
- Oscari LB, Essig DA, Palmer WK. Lipase regulation of muscle triglyceride hydrolysis. *J Appl Physiol.* 1990; 69: 1571-7.
- Out R, Hoekstra M, Habets K, Meurs I, de Waard V, Hildebrand RB, Wang Y, Chimini G, Kuiper J, Van Berkel TJ, Van Eck M. Combined deletion of macrophage ABCA1 and ABCG1 leads to massive lipid accumulation in tissue macrophages and distinct atherosclerosis at relatively low plasma cholesterol levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28: 258-64.
- Out R; Hoekstra M; Meurs I; de Vos P; Kuiper J; Van Eck M; Van Berkel TJC. Total Body ABCG1 Expression Protects Against Early Atherosclerotic Lesion Development in Mice *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 594 - 600.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29(9): e45.
- Pennings M, Meurs I, Ye D, Out R, Hoekstra M, Van Berkel TJC., Van Eck M Regulation of cholesterol homeostasis in macrophages and consequences for atherosclerotic lesion development, *FEBS Lett* 2006; 580: 5588 – 96.
- Ramachandran S, Penumetcha M, Merchant NK, Santanam N, Rong R, Parthasarathy S. Exercise reduces preexisting atherosclerotic lesions in LDL receptor Knockout mice. *Atherosclerosis* 2004; 178: 33–8.

- Ranalletta M, Wang N, Han S, Yvan-Charvet L, Welch C, Tall AR. Decreased atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice transplanted with Abcg1^{-/-} bone marrow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26: 2308-15.
- Ribeiro IC, Iborra RT, Neves MQ, Lottenberg SA, Charf AM, Nunes VS, Negrão CE, Nakandakare ER, Quintão EC, Passarelli M HDL atheroprotection by aerobic exercise training in type 2 diabetes mellitus. *Med Sci Sports Exerc.* 2008; 40: 779-86.
- Rotllan N, Calpe-Berdiel L, Guillaumet-Adkins A, Süren-Castillo S, Blanco-Vaca F, Escolà-Gil JC. CETP activity variation in mice does not affect two major HDL antiatherogenic properties: macrophage-specific reverse cholesterol transport and LDL antioxidant protection. *Atherosclerosis.* 2008; 196: 505-13.
- Ruaño G, Seip RL, Windemuth A, Zöllner S, Tsongalis GJ, Ordovas J, Otvos J, Bilbie C, Miles M, Zoeller R, Visich P, Gordon P, Angelopoulos TJ, Pescatello L, Moyna N, Thompson PD. Apolipoprotein A1 genotype affects the change in high density lipoprotein cholesterol subfractions with exercise training. *Atherosclerosis.* 2006; 185 :65-9.
- Sasaki J, Tanabe Y, Tanaka H, Saku K, Shindo M, Arakawa K. Elevated levels of HDL – cholesterol and Apo A-1 in national class Japanese male marathon runners. *Atherosclerosis.* 1988; 70: 175 – 7.
- Shepard RJ e Balady GJ. Exercise as cardiovascular therapy. *Circulation* 1999; 99: 963-72.

- Shimada K, Kishimoto C, Okabe T, Hattori M, Murayama T, Yokode M, Kita T. Exercise Training Reduces Severity of Atherosclerosis in Apolipoprotein E Knockout Mice via Nitric Oxide. *Circ J* 2007; 12: 1147 - 1151.
- Sorlí JV, Corella D, Francés F, Ramírez JB, González JI, Guillén M, Portolés O. The effect of the APOE polymorphism on HDL-C concentrations depends on the cholesterol ester transfer protein gene variation in a Southern European population. *Clin Chim Acta*. 2006; 366: 196-203.
- Stefekova J, Poledne J, Hubacek JA. ATP –Binding Cassette Transporters in Human Metabolism and Diseases. *Physiol Res*. 2004; 53: 235-43.
- Stravitz RT, Vlahcevic ZR, Russell TL, Heizer ML, Avadhani NG, Hylemon PB. Regulation of sterol 27-hydroxylase and an alternative pathway of bile acidbiosynthesis in primary cultures of rat hepatocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1996; 57: 337-47.
- SuperKo HR. Exercise and Lipoprotein Metabolism. *Journal of Cardiovascular Risk* 1995; 2: 310-5
- Sutherland WH, Stapely SA, Robertson MC, Nye ER. Plasma cholesterol ester transfer protein and distribution of cell cholesterol among plasma lipoproteins in vitro in distance runners and sedentary men. *Clin Physiol*. 1993; 13: 143 – 51.
- Sviridov D, Kingwell B, Hoang A, Dart A, Nestel P. Single session exercise stimulates formation of pre beta 1-HDL in leg muscle. *J Lipid Res*. 2003; 4: 522-6.
- Tailleux A, Duriez P, Fruchart JC, Clavey V. Apolipoprotein A-II, HDL metabolism and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2002; 164: 1-13.

- Tanigawa H, Billheimer JT, Tohyama J, Zhang Y, Rothblat G, Rader DJ. Expression of cholesteryl ester transfer protein in mice promotes macrophage reverse cholesterol transport. *Circulation*. 2007;116:1267-73.
- Tchoua U, D'Souza W, Mukhamedova N, Blum D, Niesor E, Mizrahi J, Maugeais C, Sviridov D. The effect of cholesteryl ester transfer protein overexpression and inhibition on reverse cholesterol transport. *Cardiovasc Res*. 2008; 77: 732-9.
- Temel RE, Tang W, Ma Y, Rudel LL, Willingham MC, Ioannou YA, Davies JP, Nilsson LM, Yu L. Hepatic Niemann-Pick C1-like 1 regulates biliary cholesterol concentration and is a target of ezetimibe. *J Clin Invest*. 2007; 117: 1968-78.
- Temel RE, Trigatti B, DeMattos RB, Azhar S, Krieger M, Williams DL. Scavenger receptor class B, type I (SR-BI) is the major route for the delivery of high density lipoprotein cholesterol to the steroidogenic pathway in cultured mouse adrenocortical cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94: 13600-5.
- Thompson PD, Buchner D, Piña IL, Balady GJ, Williams MA, Marcus MH, Berra K, Blair SN, Costa F, Franklin B, Fletcher GF, Gordon NF, Pate RR, Rodriguez BL, Yancey AK, Wenger NK. Exercise and Physical Activity in the Prevention and Treatment of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23: 42 – 9.
- van der Velde AE, Groen AK. Shifting gears: liver SR-BI drives reverse cholesterol transport in macrophages. *J Clin Invest*. 2005 ;115:2699-701.

- Wang MD, Franklin V, Marcel YL. *In vivo* reverse cholesterol transport from macrophages lacking ABCA1 expression is impaired. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 1837– 42.
- Wang X, Collins HL, Ranalletta M, Fuki IV, Billheimer JT, Rothblat GH, Tall AR, Rader DJ. Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest*. 2007; 117: 2216-24.
- Wei C, Penumetcha M, Santanam N, Liu GY, Garelnabi M, Parthasarathy S. Exercise might favor reverse cholesterol transport and lipoprotein clearance: Potential mechanism for its anti – atherosclerotic effects. *Biochim et Biophys Acta*. 2005; 1723: 124 - 7.
- Wellington CL, Brunham LR, Zhou S, Singaraja RR, Visscher H, GelferA, Ross C, James E, Liu G, Huber MT, Yang YZ, Parks RJ, Groen A,Fruchart-Najib J, Hayden MR. Alterations of plasma lipids in mice viaadenoviral-mediated hepatic overexpression of human ABCA1. *J Lipid Res*. 2003; 44: 1470 – 80.
- Williams DL, Connelly MA, Temel RE, Swarnakar S, Phillips MC, de la Llera-Moya M, Rothblat GH Scavenger receptor BI and cholesterol trafficking. *Curr Opin Lipidol*. 1999; 10: 329-39.
- Williams PT, Krauss RM, Wood PD, Lindgren FT, Giotas C, Vranizan KML Lipoprotein subfractions of runners and sedentary men. *Metabolism*. 1986; 35: 45-52
- Wilund KR, Feeney LA, Tomayko EJ, Chuns HR, Kim K. Endurance training reduces gallstone development in mice. *J Appl Physiol*. 2008; 104: 761-5.

Wu JE, Basso F, Shamburek RD, Amar MJA, Vaisman B, Szakacs G, Joyce C, Tansey T, Freeman L, Paigen BJ, Thomas F, Brewer Jr HB, Santamarina-Fojo S. Hepatic ABCG5 and ABCG8 overexpression increases hepatobiliary sterol transport but does not alter aortic atherosclerosis in transgenic mice *JCB* 2004; 28: 22913-25.

Zhang W, Yancey PG, Su YR, Babaev VR, Zhang Y, Fazio S, Linton MF. Inactivation of macrophage scavenger receptor class B type I promotes atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2003; 108: 2258-63.

Zhang Y, Da Silva JR, Reilly M, Billheimer JT, Rothblat GH, Rader DJ. Hepatic expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a positive regulator of macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest*. 2005; 115: 2870-4.

Zhang Y, Zanotti I, Reilly MP, Glick JM, Rothblat GH, Rader DJ. Overexpression of Apolipoprotein A-1 Promotes Reverse Transport of Cholesterol from Macrophages to Feces in vivo. *Circulation*. 2003; 108: 661-3.

Zhou H, Li Z, Silver DL, Jiang XC. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) expression enhances HDL cholesteryl ester liver delivery, which is independent of scavenger receptor BI, LDL receptor related protein and possibly LDL receptor. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1761: 1482-8.