



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

MAIARA FERREIRA TERRA

ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO DO
EXERCÍCIO FÍSICO NA TROMBOSE E INFLAMAÇÃO APÓS
LESÃO ARTERIAL EM CAMUNDONGOS
ATHEROSCLERÓTICOS

STUDY OF THE MECHANISMS INVOLVED ON THE
EFFECTS OF PHYSICAL EXERCISE ON THROMBOSIS AND
INFLAMMATION AFTER ARTERIAL LESION ON
ATHEROSCLEROTIC MICE

CAMPINAS

2018

MAIARA FERREIRA TERRA

**ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO DO
EXERCÍCIO FÍSICO NA TROMBOSE E INFLAMAÇÃO APÓS LESÃO
ARTERIAL EM CAMUNDONGOS ATEROSCLERÓTICOS**

**STUDY OF THE MECHANISMS INVOLVED ON THE EFFECT OF
PHYSICAL EXERCISE ON THROMBOSIS AND INFLAMMATION
AFTER ARTERIAL LESION ON ATHEROSCLEROTIC MICE**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do Título de
Mestra em Biologia Celular e Estrutural, na
área de Biologia Celular.*

*Dissertation presented to the Institute of
Biology of the University of Campinas in
partial fulfillment of the requirements for the
degree of Master in Cellular and Structural
Biology, in the area of Cell Biology.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL
CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA [PELO ALUNO / PELA ALUNA MAIARA
FERREIRA TERRA E ORIENTADA PELA PROF^a DR^a
CRISTINA PONTES VICENTE.

Orientador: Prof^a Dr^a Cristina Pontes Vicente

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

T275e Terra, Maiara Ferreira, 1994-
Estudo dos mecanismos envolvidos no efeito do exercício físico na trombose e inflamação após lesão arterial em camundongos ateroscleróticos / Maiara Ferreira Terra. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Cristina Pontes Vicente.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Trombose arterial. 2. Exercícios físicos. 3. Aterosclerose. 4. Metaloproteases. I. Vicente, Cristina Pontes, 1965-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of the mechanisms involved on the effects of physical exercises on thrombosis and inflammation after arterial lesion on atherosclerotic mice

Palavras-chave em inglês:

Arterial thrombosis

Exercise

Atherosclerosis

Metalloproteases

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Cristina Pontes Vicente [Orientador]

Joyce Maria Annichino Bizzacchi

Helena Coutinho Franco de Oliveira

Data de defesa: 07-02-2018

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 07 de Fevereiro de 2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Cristina Pontes Vicente (Orientadora)

Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira

*Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa,
que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.*

Dedico...

*À minha família
e aos meus amigos...*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por abençoar e iluminar meu caminho nessa trajetória, por me dar sabedoria e paciência para seguir em frente, por me fazer acreditar em mim mesma e estar sempre ao meu lado.

Agradeço à Profa. Dra. Cristina Pontes Vicente por ter me acolhido de braços abertos em seu laboratório, pelos ensinamentos no decorrer do trabalho, por todo apoio desde quando fiz Iniciação Científica e pela contribuição para o meu crescimento, tanto pessoal, quanto profissional.

Ao Prof. Dr. Cláudio Werneck por disponibilizar seu laboratório para experimentos e pelas contribuições no desenvolvimento do projeto.

A Profa. Dra. Maria Júlia Marques do Departamento de Anatomia por disponibilizar o uso da esteira para o desenvolvimento do protocolo de corrida dos animais.

Ao Dr. Cláudio Zoppi do Centro de Pesquisa em Obesidade e Comorbidades pelo auxílio e disponibilidade em um dos testes realizados no projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural e a todos os docentes por fazerem desse curso um dos melhores do país.

A secretária Lílíam Alves Senne Panagio por todo auxílio e eficiência nesses dois anos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

A minha família, em especial minha mãe Neuza, meu pai Dário e minha irmã Laís, por todo apoio nos momentos de dúvida, pela confiança de que eu conseguiria chegar onde cheguei, por estarem sempre por perto, por aguentar os momentos de estresse e tensão e por todo amor. Não teria conseguido sem vocês ao meu lado. Amo muito vocês!

Ao meu namorado Flávio, por me dar suporte nos momentos de estresse, ansiedade, por confiar em mim e no meu trabalho, pela parceria de sempre. Te amo!

Aos amigos de trabalho, uns que já seguiram seus caminhos, outros que permanecem: Luiz, Michel, Micheli, Andressa, Carol, Giane, Toni, Neto, Camila, Júlia e Denise, por tudo que aprendi com cada um de vocês, pelos almoços japa, pelas risadas, pelos ensinamentos de bancada, pela amizade. Um agradecimento especial à Júlia (Julinha) pela amizade sincera, por ajudar no meu crescimento profissional e pessoal, pelas jantinhas, pelos conselhos... você fez falta no último ano aqui, e ainda faz, te amo!

Um agradecimento especial à Denise. De, obrigada por me acolher na Iniciação Científica, por me ensinar grande parte das técnicas que desenvolvi durante o Mestrado, pela amizade e pelos conselhos. Sua pupila cresceu!

As minhas amigas da faculdade: Naty, Dri, May e Tháís, mesmo que distantes, contribuíram nos momentos de lazer, descanso e

risadas, pelo apoio, carinho e parceria de sempre. Amo cada uma de vocês!

A minha amiga Vitória, desde a sétima série juntas. Obrigada pela amizade, parceria, risadas, idas e vindas que só nos fortalecem. Te amo!

A minha psicóloga Fabiana, não tenho palavras para agradecer toda ajuda desde o final da faculdade. Foram momentos muito difíceis que duvidei de mim mesma, mas consegui chegar até o final graças ao seu apoio, confiança, profissionalismo e amizade. Hoje sei que posso chegar muito longe!

A minha gata Mel, e mais recentemente, ao meu gatinho Théo, por me fazerem companhia na solidão da kitnet, por me acalmar com seus ronronados, por me fazer rir com suas trapalhadas, por todo amor e carinho, não tem preço.

Enfim, aos que não citei, agradeço da mesma forma, todos que fizeram parte dessa caminhada e que contribuíram para que eu pudesse estar onde estou hoje. Muito obrigada!

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

Marthin Luther King

“Ser autor da sua história é ser capaz de liderar a si mesmo, antes de liderar o mundo de fora, é saber o que ser e onde chegar”

Augusto Cury

Resumo

As doenças cardiovasculares, dentre elas a trombose e a aterosclerose, são as principais causas de morte no mundo globalizado, atingindo principalmente países em desenvolvimento, sendo o sedentarismo e a obesidade considerados alguns dos fatores de risco na gênese dessas doenças. A prática de exercícios físicos é indicada para a prevenção de problemas cardíacos, e pode ser também indicada de maneira terapêutica em indivíduos já adoentados, estando diretamente relacionada com a melhora da função endotelial, regulação da pressão arterial, melhora de variáveis inflamatórias e redução do estresse oxidativo. A relação entre o exercício físico e a trombose arterial ainda não está totalmente estabelecida e, por isso, este trabalho visou estudar o efeito do exercício físico na trombose e no remodelamento vascular em camundongos ateroscleróticos, mimetizando indivíduos com propensão ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares. O projeto foi realizado em camundongos deficientes no receptor de LDL alimentados com dieta hiperlipídica submetidos a lesão arterial química por cloreto férrico para induzir a trombose e ao exercício físico de alta intensidade realizado antes e depois da injúria. Realizamos o teste de VO_2 máx para determinar a intensidade do exercício físico e a capacidade física dos animais após o protocolo de treinamento. Analisamos o tamanho do trombo arterial uma hora após a lesão e também a recuperação do endotélio 21 dias após esta, tempo em que ocorre a proliferação de células musculares lisas (neoíntima). Verificamos também os níveis de colesterol e triglicérides no plasma, a deposição de lipídeos na raiz da aorta e o peso corporal dos animais. Além disso, analisamos a presença de ICAM, LY6G, CD31 e CD34, marcadores celulares relacionados à adesão, superfície celular, presença de células inflamatórias e de progenitoras endoteliais (CPEs) e eNOS, além da atividade de metaloproteinases por zimografia *in situ* e em gel. Observamos que o exercício físico é capaz de aumentar a capacidade física dos animais, reduzir o peso corporal e os níveis de colesterol. Nas análises histológicas, observamos uma redução significativa na porcentagem de trombo nos animais exercitados, assim como na porcentagem de neoíntima nos grupos com exercício apenas após a lesão e também antes e após a injúria, além de uma redução na porcentagem de deposição de lipídeos na raiz da aorta nos grupos exercitados. Constatamos que a atividade física reduziu a presença do marcador de adesão celular (ICAM), assim como o de inflamação (LY6G), promovendo uma recuperação do endotélio lesionado através do aumento na marcação de células endoteliais (CD31) e recrutamento de CPEs, em uma via dependente de eNOS. Por fim, observamos um aumento na atividade das metaloproteinases na artéria carótida dos grupos exercitados, sendo que, no balanço geral, houve um aumento de MMP-2 e uma

redução de MMP-9, além de uma redução da atividade dessa enzima na raiz da aorta. Deste modo, pudemos concluir que o exercício físico é capaz de contribuir para recuperação do endotélio lesionado, tanto diminuindo o processo trombótico quanto promovendo o remodelamento arterial positivo após a lesão, através de mecanismos dependente da atividade das metaloproteinases, eNOS e CPEs.

Palavras-chave: Trombose arterial; Exercício físico; Aterosclerose; Metaloproteases.

Abstract

Cardiovascular diseases, amongst them thrombosis and atherosclerosis, are the main causes of death on globalized world, mainly on developing country. Sedentary lifestyle and obesity are considered risk factors on genesis of these diseases. Because of that, the practice of physical exercises is extremely indicated to prevent cardiac problems and can also be designated as a therapeutic treatment to improve endothelial function, regulate arterial blood pressure, ameliorate inflammatory variables and reduce oxidative stress. The relation between physical exercises and arterial thrombosis is not completely elucidated therefore, the main objective of this study, is to analyze the effects of physical exercises on thrombosis and vascular remodeling on atherosclerotic mice model, which mimics individuals with propensity to cardiovascular diseases development. We used LDL receptor deficient mice fed with high-fat diet with an arterial lesion model using ferric chloride to induce thrombosis and with physical exercise before and after injury. We performed VO₂max test to determine physical exercise intensity and animal's physical capacity after the training protocol. We analyzed thrombus formation one hour after injury and endothelium recuperation 21 days after that, when there is smooth muscle cells proliferation (neointima). We determined the plasma levels of cholesterol and triglycerides, lipid deposition on aortic sinus and body weight of animals. We also verified the presence of ICAM, LY6G, CD31 and CD34, cellular markers related to adhesion, cell surface, inflammatory, endothelial progenitor cells (EPCs) and eNOS, besides metalloproteinases activity by *in situ* and gel zymography. We observed that our physical exercises protocol was able to improve the animal physical capacity, reduce body weight and cholesterol levels. With the histological analysis, we observed a significant reduction on thrombus size on the exercised animals and after 21 days a decrease in neointima formation in groups with exercises after injury and exercises before and after injury, besides a reduction on lipid deposition on aortic sinus on exercised groups. We verified that physical activity reduced the presence of the cellular adhesion marker (ICAM) and of LY6G, an inflammatory cell marker, promoting also endothelium recuperation through an increase on endothelial cells (CD31) and EPCs recruitment, in a pathway dependent of eNOS. We also observed an increase on metalloproteinases activity on carotid artery of exercised animals, with an increase on MMP-2 and a decrease on MMP-9, besides a reduction of that activity on aortic sinus. Thus, we could conclude that physical exercises can contribute positively to endothelium recuperation, by decreasing thrombotic process and promoting positive arterial remodeling after lesion, through mechanisms dependent of metalloproteinases, eNOS and EPCs recruitment.

Key-words: Arterial thrombosis; Physical exercise; Atherosclerosis; Metalloproteases.

Lista de Figuras

Figura 1. Mortalidade por doenças cardiovasculares em ambos os sexos.....	19
Figura 2. Evolução da aterosclerose e moléculas envolvidas.....	22
Figura 3. Trombose arterial.....	25
Figura 4. Proliferação de células musculares lisas após injúria vascular.....	26
Figura 5. Esquema representativo dos grupos a serem estudados.....	30
Figura 6. Dados da dieta hiperlipídica de acordo com o fabricante.....	30
Figura 7. Esteira de exercícios.....	31
Figura 8. Teste de VO ₂ máx.....	32
Figura 9. Coração de camundongo C57Bl/6J.....	33
Figura 10. Lesão arterial por FeCl ₃	34
Figura 11. Velocidade máxima atingida no teste de VO ₂ máx.....	38
Figura 12. Distância total percorrida durante o teste de VO ₂ máx.....	39
Figura 13. Tempo de exaustão durante teste de VO ₂ máx.....	39
Figura 14. VO ₂ máx atingido no teste de VO ₂ máx.....	40
Figura 15. VO ₂ durante o protocolo do teste de VO ₂ máx.....	41
Figura 16. Peso corporal dos camundongos LDLr ^{-/-}	41
Figura 17. Níveis de colesterol total no plasma.....	42
Figura 18. Níveis de triglicérides no plasma.....	43
Figura 19. Cortes histológicos de raiz de aorta.....	44
Figura 20. Porcentagem de lipídeos na raiz da aorta.....	45
Figura 21. Cortes histológicos de artéria carótida de grupos sem lesão.....	45
Figura 22. Área média de artéria carótida nos grupos sem lesão.....	46
Figura 23. Imunohistoquímica de artéria carótida para ICAM.....	47
Figura 24. Número de células ICAM ⁺	48
Figura 25. Zimografia <i>in situ</i> da artéria carótida nos grupos sem lesão.....	48
Figura 26. Atividade da gelatinases na artéria carótida dos grupos sem lesão.....	49
Figura 27. Zimografia <i>in situ</i> da raiz da aorta nos grupos sem lesão.....	49
Figura 28. Atividade das gelatinases na raiz da aorta dos grupos sem lesão.....	50
Figura 29. Tempo de oclusão da artéria carótida.....	51
Figura 30. Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa).....	51
Figura 31. Tempo de trombina (TT).....	52
Figura 32. Cortes histológicos de artéria carótida nos grupos tempo zero.....	52
Figura 33. Porcentagem de trombo na artéria carótida nos grupos tempo zero.....	53
Figura 34. Área média de artéria carótida nos grupos tempo zero.....	53
Figura 35. Imunohistoquímica de artéria carótida para LY6G.....	55

Figura 36. Número de células LY6G+.....	56
Figura 37. Imunohistoquímica de artéria carótida para CD34.....	57
Figura 38. Número de células CD34+.....	58
Figura 39. Imunohistoquímica de artéria carótida para CD31.....	59
Figura 40. Número de células CD31+.....	60
Figura 41. Imunohistoquímica da artéria carótida para eNOS, grupos tempo zero.....	61
Figura 42. Número de células eNOS+ nos grupos tempo zero.....	62
Figura 43. Zimografia <i>in situ</i> da artéria carótida nos grupos tempo zero.....	62
Figura 44. Atividade das gelatinases da artéria carótida dos grupos tempo zero.....	63
Figura 45. Zimografia em gel para MMP-2 e MMP-9 nos grupos tempo zero.....	64
Figura 46. Análise da zimografia em gel dos grupos tempo zero.....	64
Figura 47. Cortes histológicos de artéria carótida nos grupos de 21 dias.....	65
Figura 48. Porcentagem de neointima na artéria carótida.....	66
Figura 49. Área média de artéria carótida nos grupos de 21 dias.....	66
Figura 50. Imunohistoquímica da artéria carótida para eNOS, grupos de 21 dias.....	67
Figura 51. Número de células eNOS+ nos grupos de 21 dias.....	68
Figura 52. Zimografia <i>in situ</i> da artéria carótida nos grupos de 21 dias.....	69
Figura 53. Atividade das gelatinases na artéria carótida dos grupos de 21 dias.....	70
Figura 54. Atividade das gelatinases na artéria carótida em diferentes grupos.....	70
Figura 55. Zimografia em gel para MMP-2 e MMP-9 nos grupos de 21 dias.....	71
Figura 56. Análise da zimografia em gel dos grupos de 21 dias.....	71
Figura 57. Análise combinada da zimografia em gel.....	72
Figura 58. Esquema dos resultados.....	90
Figura 59. Conclusão do projeto.....	91

Lista de Abreviaturas

OMS: Organização Mundial da Saúde

WHO: World Health Organization

eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial

EROs: Espécies reativas de oxigênio

MnSOD: Superóxido desmutase dependente de manganês

CPEs: Células Progenitoras Endoteliais

MMPs: Metaloproteinases

VCAM-1: Molécula de adesão celular vascular-1

ICAM-1: Molécula de adesão intracelular-1

ApoE^{-/-}: Camundongo knockout para apolipoproteína E

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

LDLr^{-/-}: Camundongo knockout para lipoproteína de baixa densidade

VLDL: Lipoproteína de densidade muito baixa

PPAR- γ : Receptor de proliferação peroxissomal tipo γ

CD31: Cluster de diferenciação 31

CD34: Cluster de diferenciação 34

TF: Fator tecidual

TIMPs: Inibidor tecidual de metaloproteinases

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

TTPA: Tempo de tromboplastina parcial ativada

TT: Tempo de trombina

FeCl₃: Cloreto férrico

HE: Hematoxilina-Eosina

LY6G: Complexo linfócito antígeno 6

BADGE: Éter bisfenol-A-diglicidil (antagonista PPAR)

L-NAME: Éster N-Nitro-L-Arginina metil

NO: Óxido nítrico

ACSM: Colégio Americano da Medicina do Esporte

AMPK: Proteína cinase ativada por AMP

HFD: High-fat diet

Sumário

Resumo.....	10
Abstract.....	12
Lista de Figuras.....	14
Lista de Abreviaturas.....	16
INTRODUÇÃO.....	19
Doenças cardiovasculares.....	19
Exercício físico.....	19
Aterosclerose.....	21
Exercício físico e aterosclerose.....	23
Trombose.....	24
Metaloproteinases (MMPs)	27
OBJETIVO GERAL.....	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
MATERIAL E MÉTODOS.....	29
Animais.....	29
Dieta hiperlipídica.....	30
Protocolo de exercício físico.....	31
Teste VO ₂ máx.....	32
Quantificação dos níveis de colesterol e triglicérides.....	32
Análise da deposição de lipídeos na raiz da aorta.....	33
Leão arterial.....	34
Análise da formação de trombo e neointima arterial.....	34
Tempo de coagulação- TTPA e TT.....	35
Análise da presença de LY6G, ICAM, CD34, CD31 e eNOS por imunohistoquímica.....	35
Zimografia <i>in situ</i>	36
Zimografia em gel.....	37
Análise estatística.....	37
RESULTADOS.....	37
DISCUSSÃO.....	72
RESUMO DOS RESULTADOS.....	87
CONCLUSÃO.....	88
BIBLIOGRAFIA.....	92
ANEXOS.....	98

INTRODUÇÃO

Doenças cardiovasculares

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo, sendo que em 2015, estima-se que 17,7 milhões de pessoas morreram devido a essas doenças, o que equivale a 31% de todas as mortes em nível global. Mais de três quartos dessas mortes ocorre em países de baixa e média renda, como mostra o gráfico abaixo (Figura 1) obtido do site da OMS (WHO, 2012).

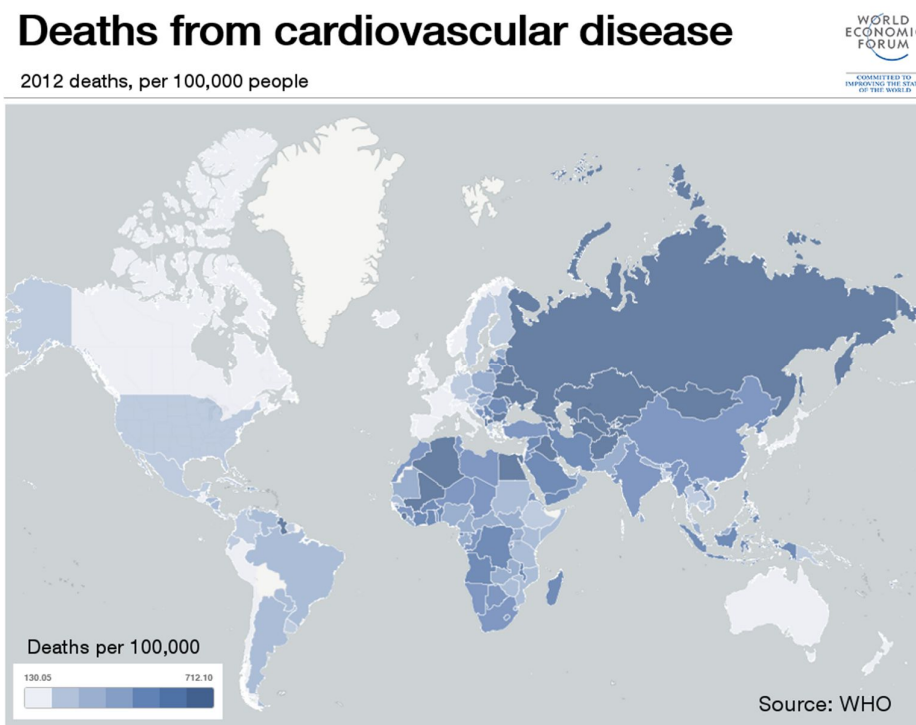


Figura 1. Mortalidade por doenças cardiovasculares em ambos os sexos (WHO, 2012).

Ainda segundo a OMS, inúmeros fatores de risco estão relacionados com a alta incidência dessas doenças, como tabagismo, sedentarismo, obesidade, uso excessivo de álcool, fator genético, entre outros. Como recomendação, enfatiza-se a prática de atividade física para a redução da ocorrência das doenças cardiovasculares, assim como dietas mais saudáveis e políticas de saúde que motivem as pessoas a adotarem e manterem comportamentos benéficos.

Exercício físico

O sedentarismo é um dos fatores de risco para mortes no mundo, sendo que mais de 80% dos adolescentes é fisicamente inativo e 1 em cada 4 adultos não é ativo o suficiente,

segundo a OMS. A intensidade de atividade física recomendada depende da idade e varia entre as pessoas, porém para a saúde cardiorrespiratória, deve ser feita em turnos de pelo menos 10 minutos de duração cada. Essa intensidade pode ser determinada de várias formas e é tradicionalmente prescrita através da porcentagem de consumo máximo de oxigênio (%VO₂máx) ou frequência cardíaca máxima (HRmáx), separando-se entre baixa, moderada e alta intensidades [1].

Quando realizado de forma regular, o exercício físico está diretamente relacionado com a redução na incidência de doenças cardiovasculares, principalmente por melhorar a função endotelial, a capacidade física em pacientes com doenças crônicas do coração e doenças arteriais [2]. Além disso, está associado com melhoras na pressão arterial, diminuição da expressão de moléculas inflamatórias e redução do estresse oxidativo, principalmente por aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, como óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), superóxido desmutase [2], MnSOD (superóxido desmutase dependente de manganês), glutathiona peroxidase e catalase [3].

Ainda, a atividade física praticada de forma regular parece estar relacionada com o atraso no acúmulo de danos promovidos por espécies reativas de oxigênio (EROs), como acúmulo de íons hidrogênio e geração de espécies reativas de nitrogênio, ao melhorar a proteção antioxidante do miocárdio através de um aumento das enzimas citadas acima [3].

Os mecanismos moleculares envolvidos nos benefícios da prática do exercício físico têm sido muito estudados, sendo que já foram demonstrados efeitos positivos no metabolismo da glicose, na função do músculo esquelético, força muscular, estabilidade óssea, coordenação motora, bem-estar fisiológico e em funções de outros órgãos, como o coração. Dentre as funções cardíacas, vale ressaltar que, principalmente em corações de atletas, o exercício físico causa hipertrofia do ventrículo esquerdo, que ocorre como um mecanismo de adaptação do coração devido ao aumento em sua atividade ou sobrecarga funcional [4].

Existe também uma resposta vasomotora ao exercício físico que está diretamente relacionada ao estresse mecânico devido ao fluxo sanguíneo, levando a uma vasodilatação e aumento na mobilização de células progenitoras endoteliais (CPEs) para regeneração do endotélio vascular em decorrência de uma sinalização celular dependente de eNOS e óxido nítrico. Nesse caso, células endoteliais devem atuar como sensores mecânicos que transformam esse estresse em sinais bioquímicos, em conjunto com a atuação de proteínas de adesão celular e plaquetas [3].

Ainda, a atividade física afeta as concentrações de diversas citocinas, hormônios e fatores de crescimento, também atuando sobre o balanço energético do organismo, e esses fatores estão diretamente relacionados em acelerar a morte celular ou prolongar a sobrevivência da célula, dependendo da duração e intensidade desse exercício [5].

Aterosclerose

Aterosclerose é uma doença inflamatória crônica que atinge principalmente a parede das artérias de médio e grande calibre [6], estando relacionada com uma disfunção cardiovascular e sendo uma das primeiras causas de morte em países desenvolvidos. Ela pode se iniciar devido a uma ativação endotelial causada por estresse oxidativo associada com fatores de risco, como predisposição genética, diabetes mellitus, hipertensão, fumo, idade, obesidade e síndromes metabólicas. Com isso, há a formação de lesões e placas no endotélio vascular, com células sanguíneas, lipídios e proteínas com acúmulo de cálcio, resultando na expansão vascular e bloqueio do fluxo sanguíneo local, podendo levar a uma ruptura da parede do vaso, causando infarto e ataque cardíaco [7].

A etapa inicial da aterosclerose ocorre quando partículas de LDL penetram na camada íntima do vaso sanguíneo e, se os níveis de LDL estiverem elevados, estes se acumulam, lesionando o endotélio local. Essas partículas se tornam pró-inflamatórias pela ação de enzimas que as oxidam e, com isso, há ativação de uma resposta do sistema inflamatório nessa camada íntima [8]. Essa resposta se inicia quando o endotélio se torna ativado e secreta moléculas de adesão, em um estágio de adesão transiente, como P- e E-selectinas endoteliais, que se ligam a carboidratos presentes na superfície dos leucócitos, atraindo estas células para o local da lesão. Além disso, há a interação de uma integrina específica do leucócito com VCAM-1 endotelial e ambas interações permitem que as células “rolem” sobre a parede do vaso para o estágio subsequente, que é rápido e aumenta a força de adesão dos leucócitos ao endotélio (via liberação de quimioatraentes e expressão de integrinas, como ICAM-1 e VCAM-1) [8, 9].

A aderência de leucócitos ao endotélio em sítios específicos na parede arterial leva ao processo subsequente de migração dessas células para o espaço subendotelial, onde alguns monócitos captam lipídios e tornam-se células espumosas. Nessa camada, há o acúmulo também de linfócitos, mas sem granulócitos e esse recrutamento celular, via expressão de moléculas de adesão, persiste enquanto houver a condição de hipercolesterolemia (Figura 2) [10]. Ainda, células musculares lisas presentes na camada média desse vaso sanguíneo secretam

citocinas e quimioatraentes que recrutam mais monócitos, linfócitos e neutrófilos para o local da lesão com o objetivo de resolução do processo inflamatório (Figura 2) [8, 10].

Todos esses eventos inflamatórios levam à migração dessas células musculares lisas para a camada íntima, formando uma capa fibrosa nas placas ateroscleróticas, além produzirem enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases (MMPs), que são responsáveis pela degradação da matriz extracelular local e instabilidade dessas lesões [9]. Quando em estágio avançado, as placas ateroscleróticas podem romper, levando à exposição das camadas subendoteliais, ativação de plaquetas e a formação de trombo [8, 11] (Figura 2).

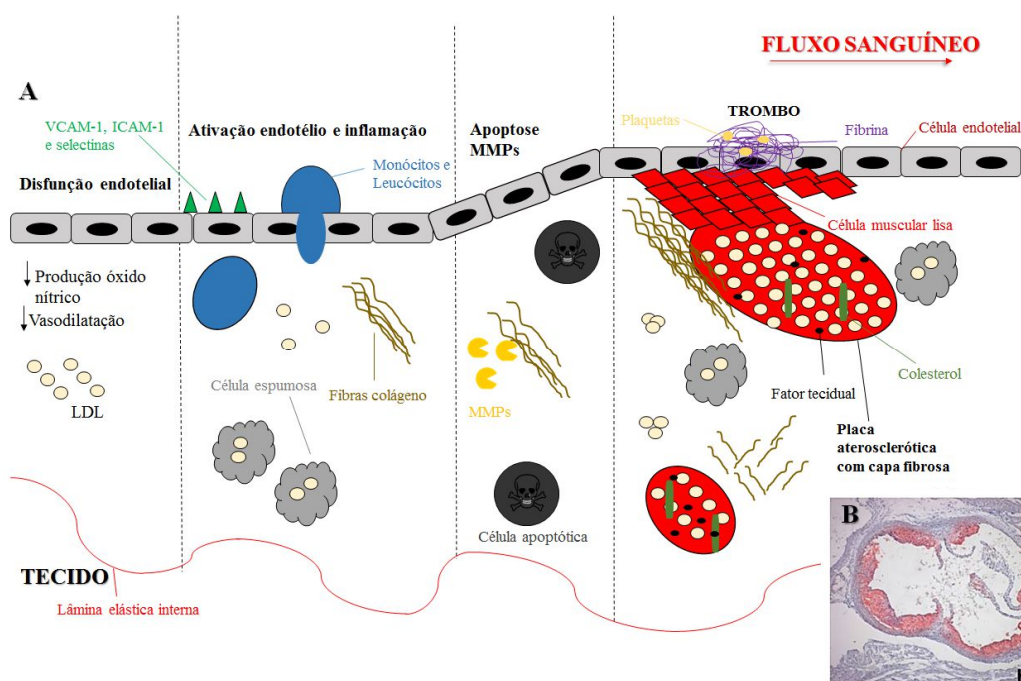


Figura 2. (A) Evolução da aterosclerose e moléculas envolvidas (adaptado de Herranz, F. *et al*, 2014 [9]). (B) Corte histológico de raiz de aorta de camundongo LDLr^{-/-}, com coloração Oil Red O para identificação de lipídeos, sendo em vermelho as placas ateroscleróticas (Frodermann, V. *et al*, 2015 [12]).

A aterosclerose é uma doença silenciosa, podendo levar décadas para manifestar os primeiros sintomas [13], sendo que alguns dos principais tratamentos utilizados para a revascularização do local obstruído por ela são a revascularização e a angioplastia [14].

Estudos demonstraram que fatores genéticos e ambientais, sozinhos ou em combinação, tem papéis importantes na etiologia da aterosclerose, sendo que diversos fatores de risco também devem ser considerados. Para os estudos em laboratório dois modelos principais têm sido utilizados no estudo dessa doença que são: os camundongos deficientes na apolipoproteína E (apoE^{-/-}) ou deficientes no receptor da molécula de LDL (LDLr^{-/-}) [15, 16].

Os camundongos ApoE^{-/-} desenvolvem uma hipercolesterolemia mais severa, alimentados ou não com dieta hiperlipídica, enquanto que os LDLr^{-/-} desenvolvem de forma mais lenta a doença quando alimentados com dieta normal e, com dieta hiperlipídica, a aterosclerose torna-se mais visível [17].

Nesse trabalho, foi escolhido o modelo LDLr^{-/-}, desenvolvido em 1993 por Ishibashi *et al.* Estes animais apresentam anormalidades nas lipoproteínas transportadoras de colesterol, com aumento nos níveis de LDL e VLDL, o que leva a um nível de aproximadamente 250mg/dl de colesterol no sangue sob dieta balanceada, não desenvolvendo a aterosclerose. Por isso, quando submetidos a uma alimentação rica em gordura por 18-20 semanas, o nível de colesterol pode chegar a 1500mg/dl com a formação de grandes lesões ateroscleróticas [18]. Buscamos atingir o nível de colesterol de duas a três vezes maior que o nível normal, já que em trabalhos realizados anteriormente no laboratório, camundongos com níveis muito elevados de colesterol tendem a morrer durante a cirurgia, não sendo possível a continuidade do experimento.

Assim, pode-se dizer que a patogênese da aterosclerose é complexa, poligênica e multifatorial e processos relacionados à inflamação, hiperglicemia, elevada pressão arterial e/ou alteração da coagulação/fibrinólise afetam o desenvolvimento dessa doença [19]. Em humanos, estudos relataram que, independente da origem étnica, indivíduos que tem uma alimentação rica em gordura, principalmente a saturada, tem elevados níveis de colesterol e maior incidência de aterosclerose coronariana, quando comparado àqueles que têm dieta com menos gordura [20].

Exercício físico e aterosclerose

Diversos estudos têm reportado a eficácia da prática de atividade física na melhora da aterosclerose, dentre eles Meilhac, O., *et al.* mostraram que o exercício físico é capaz de reduzir o colesterol total do sangue em 15% e, também, reduzir a progressão dessa doença em 40% em animais LDLr^{-/-} alimentados com uma dieta rica em gordura e submetidos a exercício agudo (1 semana) e crônico (6 semanas). Além disso, esse estudo mostrou que a atividade física aumenta a expressão da proteína eNOS (óxido nítrico sintase endotelial), indicando a ativação de uma defesa antioxidante na aorta do camundongo, principalmente após o exercício crônico [21].

A determinação do efeito do exercício físico na aterosclerose depende do grau de desenvolvimento doença, da intensidade da atividade e do tipo de lesão observada. Quanto à intensidade, tem sido mostrado que a atividade moderada é mais efetiva na redução e controle das placas de ateroma, seja por corrida em esteira [22], corrida voluntária [23] ou natação [24]. Porém, um estudo utilizando camundongos LDLr^{-/-} submetidos ao exercício de baixa e moderada intensidades, determinadas através do teste de VO₂máx, obteve um efeito positivo também na atividade física em menor intensidade, com resultados similares aos encontrados com exercício moderado [25].

Além disso, cada estágio dessa doença tem uma resposta diferente ao exercício. Em nosso laboratório, pudemos observar que, em camundongos com altos níveis de colesterol e grande presença de placas de ateroma, a eficácia do exercício físico é reduzida (Godoy, 2016 em fase final de preparação). Ainda, Ajjola *et al.* mostraram que camundongos com lesões avançadas submetidos ao exercício aeróbico não obtêm resultados positivos quanto à aterosclerose, enquanto que em camundongos com lesões em estágios iniciais a atividade física mostrou-se benéfica. Isso sugere que o exercício físico reduz a progressão da aterosclerose, mas não reverte lesões em estágio avançado [26].

Estudos mais recentes têm mostrado o efeito do exercício físico moderado tanto na prevenção, quanto no tratamento da aterosclerose, promovendo uma alteração nas características das placas ateroscleróticas, passando para um fenótipo mais estável devido a uma maior deposição de colágeno [27, 28] e também uma redução nos níveis de lipídios no caso do exercício profilático [28]. Os mecanismos envolvidos nesses processos vem sendo estudados, e já foi verificada a inibição da via de sinalização CD40, responsável pelo processo inflamatório [29] e também a participação do receptor peroxissomal de proliferação do tipo gamma (PPAR- γ), característico de tecido adiposo [30].

Trombose

A trombose se caracteriza pela formação de um coágulo em um vaso sanguíneo e este pode causar obstrução total ou parcial do fluxo sanguíneo, podendo acometer veias e artérias. Quando em veias, a trombose ocorre principalmente por estagnação do fluxo, sem ocorrer necessariamente dano no endotélio [31] e pode ser desencadeada por fatores como a idade avançada, em que há um aumento de fatores de coagulação sanguínea no plasma [32], traumas, cirurgia, longo tempo de imobilização, câncer e gravidez [33]. A trombose arterial é iniciada após a lesão do endotélio, sendo o trombo constituído principalmente de plaquetas, que

após a lesão são rapidamente recrutadas para o local interagindo com o colágeno e o fator de Von Willebrand, além da trombina e fibrina, formando uma rede para promover a cicatrização do vaso [34]. Nas doenças cardiovasculares, a trombose pode ser desencadeada pela ruptura de placas ateroscleróticas [35, 36], hipertensão arterial, hipercolesterolemia, lesão direta ao endotélio, entre outros [37].

Em uma injúria na parede vascular ocorre o extravasamento do sangue da circulação e se iniciam eventos na parede do vaso e no sangue para o restabelecimento da homeostase do sistema vascular. Plaquetas circulantes são recrutadas para o local, onde se tornam o componente principal na formação do trombo (Figura 3), ativando a cascata de coagulação sanguínea através da via extrínseca, que é iniciada pelo recrutamento de fator tecidual, promovendo posteriormente a geração de trombina e fibrina, sendo esta responsável pela estabilidade do trombo através da formação de uma rede de fibrina. Esses eventos ocorrem simultaneamente e, em condições normais, mecanismos regulatórios controlam a formação do trombo temporal e espacialmente. Porém, em condições patológicas, quantidades excessivas de trombina iniciam a trombose [38].

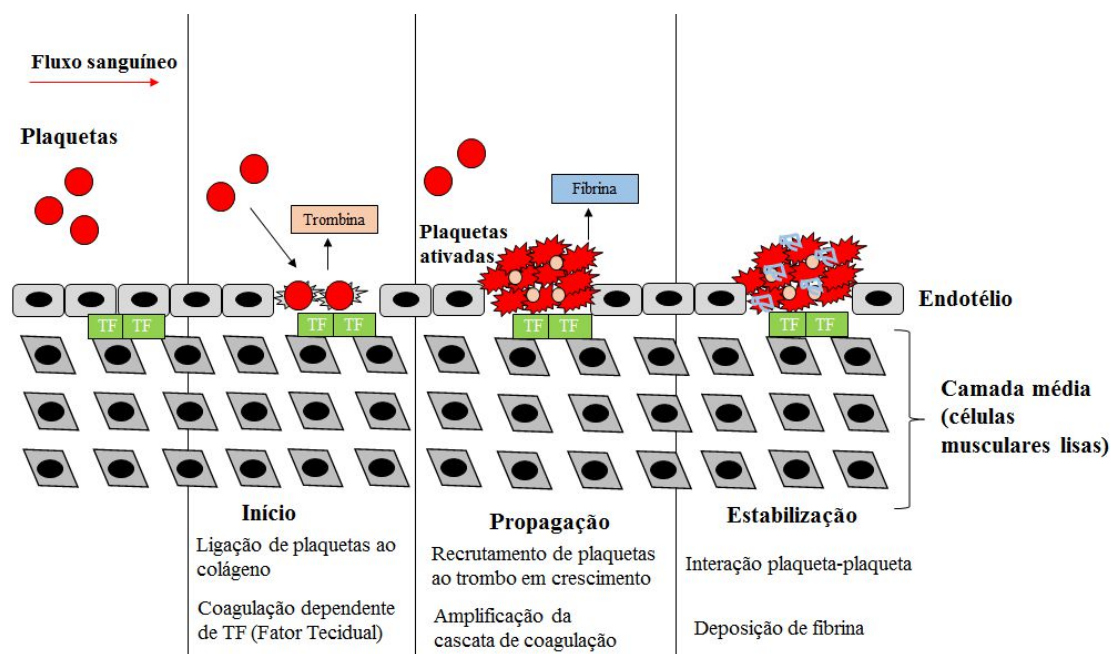


Figura 3. Trombose arterial. A lesão endotelial leva à exposição do fator tecidual (TF), ativando plaquetas que migram para o local e levam à formação do trombo, com participação de trombina e fibrina (Adaptado de Mackman, N. *et al*, 2007 [39]).

Em particular, a perda de células endoteliais devido a uma injúria vascular leva à migração e proliferação de células musculares lisas com grande quantidade de MMPs,

resultando na formação de neointima (Figura 4) e levando a um processo inflamatório que envolve a expressão de fatores de crescimento e citocinas. Para tanto, a prevenção da formação dessa camada de células musculares é de extrema importância no processo de reendotelização e reparo do endotélio [40].

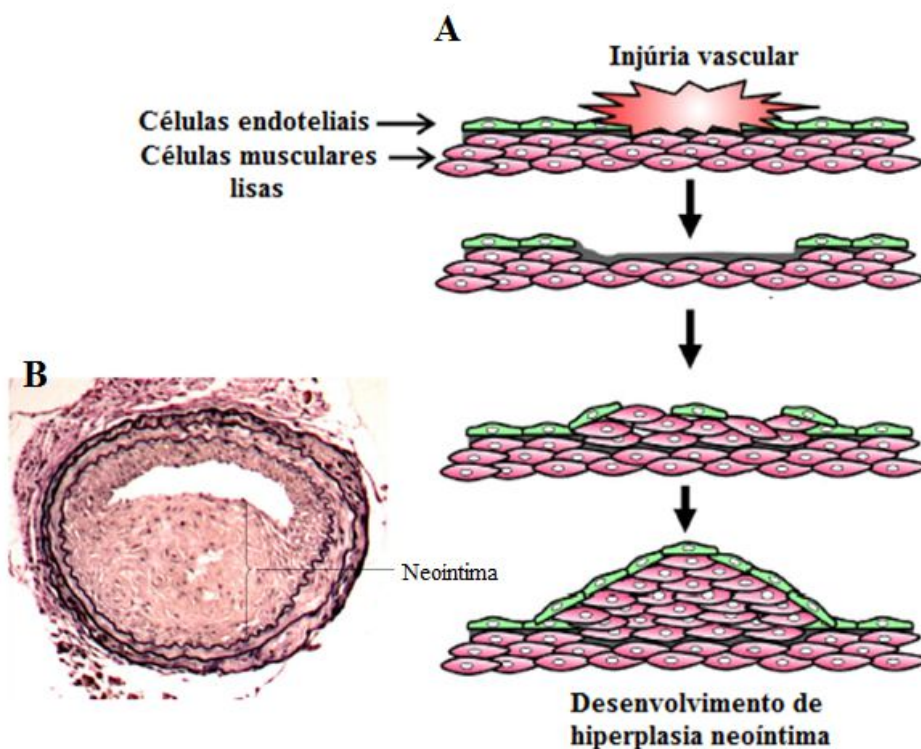


Figura 4. (A) Proliferação de células musculares lisas após injúria vascular, com a formação da neointima (Adaptado de Ashino *et al*, 2016 [41]). (B) Neointima em vaso sanguíneo de camundongo (Vicente *et al*, 2007 [42]).

Diversos modelos de indução de trombose já foram estabelecidos, seja por injúria química com cloreto férrico, injúria elétrica ou mecânica ou por obstrução do fluxo sanguíneo com auxílio de constrição física [43-47]. Estes provocam uma injúria no endotélio de tal forma que ativam a cascata de coagulação, ocasionando a trombose.

Para que haja o restabelecimento normal do fluxo sanguíneo, no caso de uma obstrução provocada por trombose, um dos tratamentos mais utilizados associa-se à intervenção coronária percutânea, que consiste na dilatação mecânica via implante de uma endoprótese vascular ou “stents” no local onde ocorreu a interrupção do fluxo sanguíneo normal. Porém, esse procedimento endovascular promove uma lesão que produz trombina e estimula a ativação

plaquetária, a formação de trombos, a adesão de células inflamatórias e, em um período de três meses (em seres humanos), pode haver a formação da camada neointima, que levam à oclusão do lúmen do vaso em um processo denominado restenose em cerca de 30% dos pacientes [48].

Em literatura, não foram encontrados trabalhos que relacionem a trombose com a prática de exercício físico, porém resultados preliminares realizados em nosso laboratório utilizando camundongos LDLr^{-/-}, submetidos a lesão arterial por sonda metálica e exercício físico posteriormente por 7 ou 14 dias, mostraram que houve uma redução da área do trombo em aproximadamente 59% e de 95% na área de neointima no grupo exercitado (Godoy 2017, em fase final de preparação). Além disso, sabe-se que a atividade física é capaz de aumentar a quantidade de CPEs circulantes [2], o que pode auxiliar no reparo do endotélio lesionado devido à trombose.

Metaloproteinases (MMPs)

As metaloproteinases, ou metaloproteases, da matriz extracelular (MMPs) constituem uma família de enzimas proteolíticas que são reguladas por sinais liberados nesse meio e sendo secretadas por células do músculo liso, células endoteliais, monócitos e macrófagos. São capazes de degradar componentes da matriz, como colágeno, elastina, fibronectina e proteoglicanos, atuando principalmente no remodelamento vascular e na instabilidade de placas ateroscleróticas [49].

As MMPs são uma família de 25 membros estrutural e funcionalmente relacionados, sendo classificados em 5 grupos de acordo com sua estrutura primária e substrato específico. As principais MMPs são as collagenases (MMP-1, -8 e -13) e gelatinases (MMP-2 e -9) [50]. Elas são inibidas pelas TIMPs (reguladores teciduais de metaloproteinases), regulando sua atividade e, quando ocorre um desequilíbrio entre essas moléculas, pode haver um aumento na atuação das metaloproteinases, degradando excessivamente a matriz extracelular, levando a alterações que podem desencadear doenças [49].

Estudos já mostraram um aumento na expressão e atividade de MMPs durante o desenvolvimento e crescimento de placas ateroscleróticas, assim como durante a formação de neointima e migração de células musculares lisas após lesão arterial em modelo experimental. Ainda, redução dessa migração com a inibição dessas enzimas proteolíticas *in vitro*, sendo que as principais MMPs atuantes nessa situação são a 2 e 9 [51].

Pesquisas recentes têm estudado também o efeito do exercício físico na regulação das metaloproteinases, pois já se sabe que essa atividade tem efeitos benéficos na obesidade e doenças cardiovasculares, situações nas quais as MMPs estão presentes. A resposta delas ao exercício depende diretamente da duração e intensidade do mesmo, sendo que o exercício de resistência de longa duração (5-12 semanas) aumenta as MMP-2 e -9, enquanto que o exercício agudo diminui essas enzimas. Por outro lado, no exercício aeróbico, sabe-se que quando de longa duração (mais que 12 semanas), reduz a expressão de MMP-2 e -9, mas quando agudo aumenta essa atividade [52].

Já foi visto que ocorre uma redução na atividade da MMP-9 em lesões ateroscleróticas em animais exercitados, enquanto que MMP-2 mantém-se semelhante ao controle, e que em animais ApoE^{-/-} ocorre um aumento das TIMPs [53, 54].

Pouco se sabe a respeito da relação entre a trombose, exercício físico e as metaloproteinases, porém já se observou que após a formação do trombo, ocorre a proliferação de células musculares lisas, nas quais já foi visto ativação e aumento da atividade de MMP-2 e -9, sendo que a inibição dessas enzimas leva à redução da migração e da proliferação dessas células [54]. Diante disso, resolvemos analisar também a atividade dessas MMPs no trombo e na neointima em animais ateroscleróticos exercitados e sedentários.

OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do exercício físico na trombose e inflamação em camundongos ateroscleróticos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudar os efeitos do exercício físico antes e após a lesão arterial em artéria carótida na formação do trombo e na aterosclerose na raiz da aorta, com relação a:

- a) Extensão da lesão arterial e produção de trombo e neointima por histoquímica.
- b) Presença de CD34, CD31, ICAM, LY6G e eNOS nos vasos lesionados por imunohistoquímica.
- c) Deposição de lipídeos na raiz da aorta por histoquímica e perfil de lipídeos (triglicerídeos e colesterol) por colorimetria.
- d) Tempo de coagulação *ex vivo*- TTPA e TT por espectrometria
- e) Atividade de metaloproteinases (MMPs) por zimografia *in situ* e em gel.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos ateroscleróticos LDLr^{-/-} (B6.129S7Ldlrtm1Her/J) machos de 6 semanas de idade adquiridos no CEMIB/UNICAMP, pesando aproximadamente 22g (6 animais por grupo). Os animais foram mantidos em Biotério, sendo 4 por gaiola, a 22°C com ciclos claro/escuro de 12 horas e livre acesso à água e comida. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal/UNICAMP, protocolo número 4144-1.

Os animais foram divididos nos grupos (Figura 5):

- 1) Dieta normal e não exercitado
- 2) Dieta hiperlipídica (HFD) e não exercitado
- 3) Dieta hiperlipídica (HFD) e exercitado
- 4) Dieta hiperlipídica (HFD) + não exercitado + trombose
- 5) Dieta hiperlipídica (HFD) + exercitado + trombose
- 6) Dieta hiperlipídica (HFD) + não exercitado + trombose + 21 dias
- 7) Dieta hiperlipídica (HFD) + não exercitado + trombose + recuperação de 1 dia + exercitado 21 dias
- 8) Dieta hiperlipídica (HFD) + exercitado + trombose + 21 dias
- 9) Dieta hiperlipídica (HFD) + exercitado + trombose + recuperação de 1 dia + exercitado 21 dias

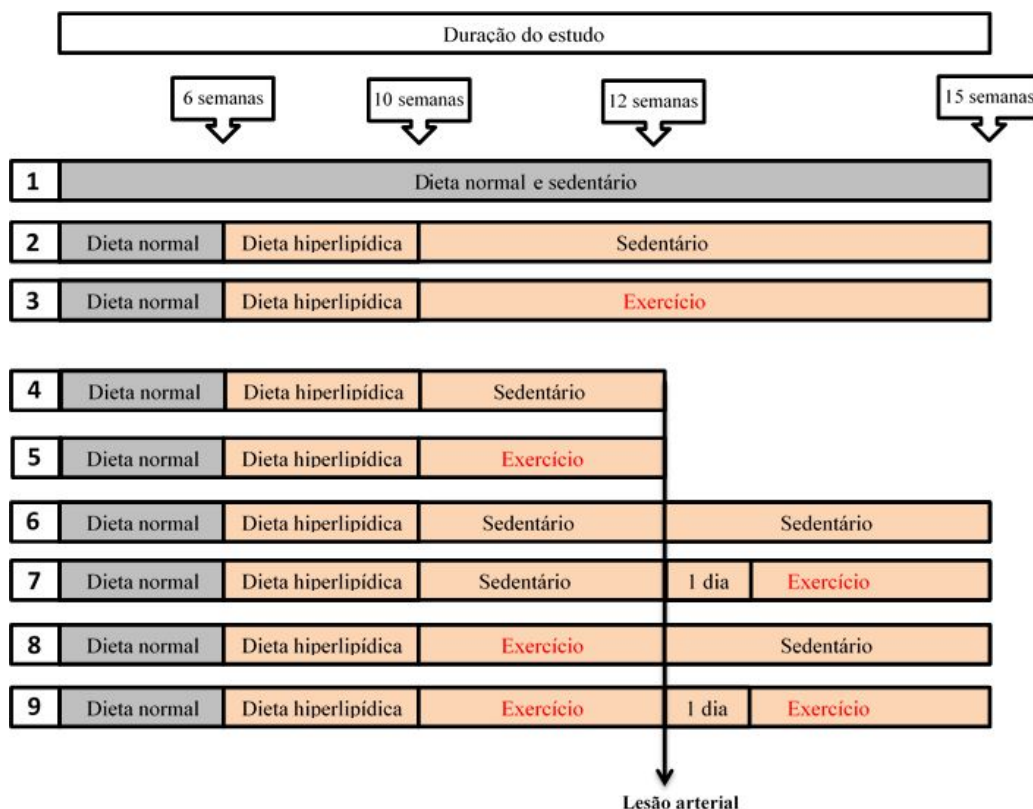


Figura 5. Esquema representativo dos grupos estudados.

Dieta hiperlipídica

Os animais foram alimentados com dieta hiperlipídica (high fat diet- HFD), produzida em nosso laboratório, a partir de 6 semanas de idade (Figura 6) [55].

Componentes	Porcentagem (%)	Quantidade em gramas para 1kg
Amido de milho	20,87	208,7
Amido dextrinizado	10	100
Caseína	14	140
Sacarose	10	100
Óleo de soja	4	40
Celulose	5	50
Mix mineral AIN93G	3,5	35
Mix vitaminas AIN93G	1	10
L-cistina	0,18	1,8
Cloreto de colina (inositol)	0,25	2,5
Banha	31,2	312
Colesterol	0,21	2,1

Figura 6. Dados da dieta hiperlipídica (HFD) produzida em nosso laboratório de acordo com a literatura [55], composta por 18% de proteína, 35% de gordura total, 45% de carboidratos e 0,2% de colesterol.

Essa dieta com colesterol leva à formação de placas de gordura na parede dos vasos dos camundongos LDLr^{-/-}, que na ausência dessa alimentação não desenvolvem, ou

desenvolvem em pequena quantidade, a aterosclerose [56]. Essa situação mimetiza um dos fatores de risco envolvido nessa doença cardiovascular a que grande parte da população está exposta nos dias de hoje. A dieta inicial por 4 semanas buscou elevar o colesterol e triglicérides em 2 a 3 vezes os níveis iniciais levando a uma aterosclerose moderada, como já observado em experimentos anteriores em nosso laboratório.

Protocolo de exercício físico

Os animais foram submetidos ao exercício 5 dias por semana, 14 dias antes da cirurgia de lesão arterial e 1 dia após a lesão por mais 21 dias em alguns grupos, em esteira (Figura 7), sem inclinação, a uma velocidade de 12m/min por 30 minutos [57]. O protocolo de exercício tem esta duração, porque os camundongos, quando alimentados com a dieta hiperlipídica, tornam-se mais debilitados e 21 dias após a lesão é o tempo em que se observa a artéria completamente ocluída devido à neointima.

Resultados preliminares em nosso laboratório utilizando camundongos selvagens C57Bl/6J submetidos ao exercício físico 3 semanas antes da lesão arterial obtiveram uma redução significativa do trombo e, por isso, determinou-se 2 semanas antes da lesão para que, em conjunto com as 3 semanas após a lesão, ficasse um período de exercício e de alimentação no qual os animais ainda estão saudáveis.



Figura 7. Esteira de exercícios. Localizada no Departamento de Anatomia, Instituto de Biologia, UNICAMP, sob responsabilidade da Profa. Maria Júlia Marques.

A alimentação hiperlipídica, em conjunto com a prática de exercícios físicos é realizada a fim de mimetizar a influência dessa atividade em indivíduos propensos ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Teste de VO₂máx

O teste de VO₂máx é feito com o objetivo de determinar a intensidade do exercício físico, uma importante ferramenta na prescrição médica dessa atividade, sendo que uma alteração nesse valor indica adaptação do organismo ao protocolo utilizado. Esse teste é realizado para medir a capacidade máxima de um organismo em captar, transportar e utilizar o oxigênio, envolvendo três grandes sistemas: respiratório (captação do O₂), cardiovascular (transporte de O₂) e muscular (utilização do O₂, que é maior durante o exercício físico). O teste foi adaptado [58] e realizado antes do início do protocolo de exercício físico (no último dia da semana se aclimatação), durante e após o término do protocolo, utilizando equipamentos disponibilizados pelo Departamento de Fisiologia da UNICAMP, sob orientação do Dr. Claudio Zoppi. O VO₂máx foi medido utilizando uma esteira metabólica associada a equipamento de análise de gás (Oxylet system; Panlab/Harvard Apparatus, Barcelona, Spain) e o teste foi feito com uma inclinação de 25°. Inicia-se com um período de 4 minutos para medição do ar ambiente, seguido por 1 minuto à 5cm/s, 2 minutos à 10cm/s e a velocidade é aumentada 3cm/s a cada 2 minutos, até a exaustão (momento em que o camundongo não é capaz de ficar fora da grade de choque). A captação de oxigênio é gravada a cada 1 segundo com auxílio do software Metabolism (Panlab/Harvard Apparatus) acoplado ao medidor de gás (Figura 8).

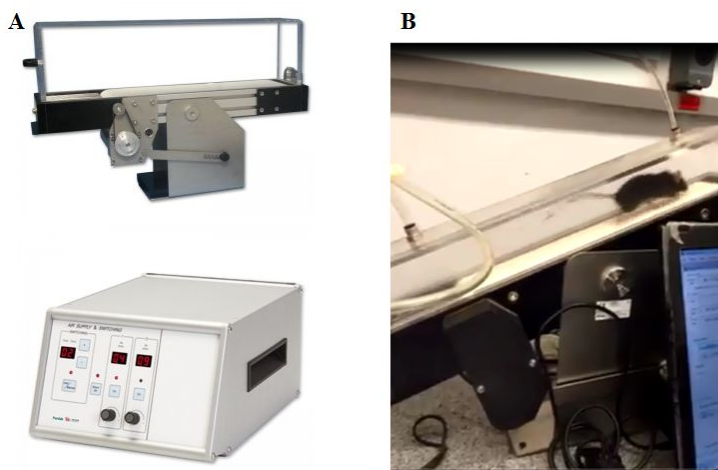


Figura 8. Teste de VO₂máx. (A) Esteira metabólica associada a um equipamento de análise de gás, ambos da Oxylet system- Panlab. (B) Foto durante o teste em esteira com inclinação de 25°.

Quantificação nos níveis de triglicerídeos e colesterol total

Para medir os níveis de colesterol total e triglicerídeos, utilizou-se o soro obtido do sangue dos camundongos, coletado da veia cava no dia do sacrifício, com 12 ou 15 semanas de

idade dependendo do grupo. Estes foram dosados através do método enzimático em Espectrofotômetro. Utilizando-se os kits LaborLab Liquid Stable para colesterol e triglicerídeos (LaborLab – SP/Brasil). Os testes foram realizados em camundongos com 15 semanas de idade, sendo sedentário alimentado com dieta normal, sedentário alimentado com dieta hiperlipídica (HFD) e HFD exercitado 5 semanas, além de sedentário C57Bl/6J HFD. Para os testes utilizou-se cubetas, sendo uma delas B (branco- sem amostra), outra P (padrão do Kit), e para as amostras feitas em duplicata. Em cada cubeta foi adicionado 1 ml do reativo de trabalho (reagente A), na cubeta P adicionou-se 10 µl do padrão, nas amostras adicionou-se 10 µl do soro, e o branco continha apenas o reagente de trabalho. Incubou-se por 5 min em banho maria à 37°C e em seguida foram lidas no Espectrofotômetro a 505nm, sendo o aparelho zerado com o branco. Utilizou-se um n=5 animais por grupo.

Análise da deposição de lipídeos na raiz da aorta

Com a dieta hiperlipídica, espera-se observar a presença de lipídeos e/ou placas de lipídeos na parede ou lúmen da raiz da artéria aorta [16]. Para isso, esta região foi retirada e emblocada em OCT para a preparação de cortes congelados transversais (Figura 9), sendo cortados ao longo de todo seu comprimento, com 5 cortes de 8µm por lâmina, totalizando de 8-10 lâminas por bloco, por se tratar de uma região pequena. Para análise da deposição de lipídeos, foi utilizada a técnica Oil Red, na qual identificam-se essas moléculas em vermelho. As imagens foram adquiridas com a câmera Olympus Optical U-ULH e analisadas em computador. A quantidade de lipídeos foi medida utilizando-se o programa ImageJ® 1.42q, utilizando-se um $n \geq 3$ animais.

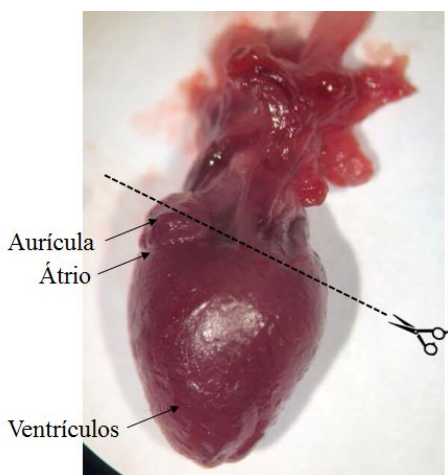


Figura 9. Coração de camundongo C57Bl/6J mostrando a região a ser retirada e emblocada para cortes da raiz da artéria aorta (acima da linha pontilhada).

Lesão arterial

Camundongos pesando $25\text{g} \pm 2$ com 12 semanas de idade foram anestesiados com 16 mg/kg de xilazina e 100 mg/kg de ketamina. Posteriormente, foi feita uma incisão na média cervical do lado direito, a fim de expor a artéria carótida comum. A artéria carótida comum direita foi isolada e após o isolamento, um papel de filtro cortado com 1mm^2 , previamente embebido por uma hora em uma solução de FeCl_3 na concentração de 15%, seco em estufa a 37°C e preparado diariamente, foi colocado sobre o segmento da artéria por 2 minutos. Mediuse o fluxo sanguíneo após a lesão utilizando uma sonda de ultrassom (Figura 10).

Os íons férricos possuem a capacidade de difundir-se pela lâmina basal antes de penetrar o lúmen arterial por uma via de sinalização endocítica/exocítica [59]. O dano tecidual iniciado pela oxidação química mediada pelo ferro predispõe à área lesionada a adesão e agregação plaquetária, seguida pela ativação da coagulação e deposição de fibrina [42]. Os camundongos foram colocados para recuperação ou sacrificados no mesmo dia, submetidos ou não ao exercício pós-lesão trombótica arterial.

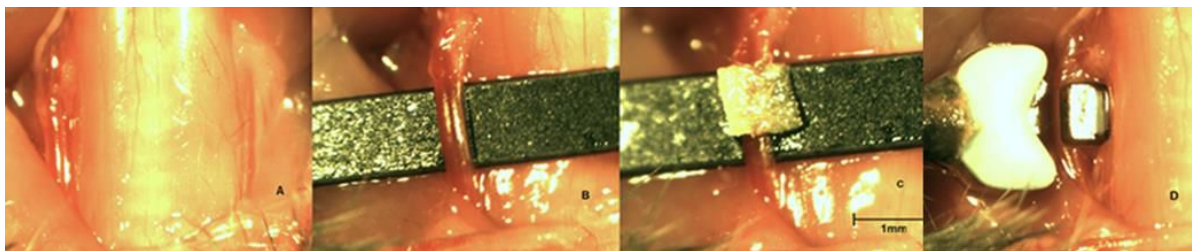


Figura 10. Lesão trombótica arterial por FeCl_3 . É feita uma incisão média cervical (A), a artéria carótida é isolada (B) e um papel de filtro embebido por cloreto férrico é colocado em sua superfície para promover a lesão (C). Uma sonda metálica é utilizada para medir o fluxo sanguíneo (D).

Análise da formação de trombo e neointima arterial

Para a análise do trombo arterial, os vasos lesionados foram coletados 1 hora após a lesão (tempo zero) e para a análise da neointima 21 dias após a lesão. Dados experimentais em nosso laboratório demonstraram formação de neointima de cerca de 50% 14 dias após a lesão em animais selvagens [60]. Os vasos foram retirados e emblocados em OCT, para a preparação de cortes congelados. As artérias carótidas foram seccionadas ao longo de todo seu comprimento, com 5 cortes de $8\mu\text{m}$ de espessura a cada 100 de modo a se obter 5 cortes por lâmina, totalizando 20 lâminas por vaso. Para análise da formação de trombo e neointima arterial utilizou-se a técnica de coloração de Hematoxilina-Eosina (HE). As lâminas foram

montadas com Cytoseal 60 (Richard Allan Scientific) e examinadas em microscópio Olympus BX60, equipado com lentes objetivas de 4x, 10x e 40x. As imagens foram adquiridas com a câmera Olympus Optical U-ULH e analisadas em computador. A quantidade do lúmen dos vasos lesionados ocupada por trombo/neoíntima foi medida utilizando-se o programa ImageJ® 1.42q, assim como a extensão da lesão arterial. Esta área foi calculada pela subtração da área do lúmen ocupada por trombo/neoíntima da área total do lúmen do vaso delimitada lâmina elástica interna. A área média foi calculada pela subtração da área entre a elástica interna e a lâmina elástica externa do vaso. As análises foram feitas 1 hora (tempo zero) e 21 dias após a lesão arterial. Utilizou-se um n=6 por grupo.

Tempo de coagulação- TTPA e TT

Os testes do tempo de coagulação foram realizados nos grupos lesionados para indução da trombose e sacrificados uma hora após a lesão, ou seja, nos grupos de tempo zero.

O Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) auxilia na avaliação da via intrínseca e via comum que envolvem os fatores de coagulação I, II, V, VIII, IX, X, XI e XII. O TTPa envolve a medição da quantidade de tempo que leva para um coágulo se formar em uma amostra de plasma que recebeu adição de cálcio e de tromboplastina parcial. É medido no plasma tratado com citrato de sódio 3,8% e as amostras foram avaliadas em triplicata. O ensaio foi realizado da seguinte maneira: 50µL de amostras foram pré-aquecidas à 37°C durante 2 minutos em um bloco térmico, adicionou-se 50µL de reagente de TTPA clot ao tubo e incubou-se por 2 minutos à 37°C. Em seguida, foi adicionado 50µL de cloreto de cálcio (CaCl₂ pré-aquecido à 37°C) e então mediu-se o tempo no coagulômetro CLOTimer (Clot, S.P, Brasil).

O Tempo de Trombina (TT) mede o tempo de coagulação após adição de trombina ao plasma. Avalia a última etapa da cascata da coagulação, que é a conversão do fibrinogênio em fibrina. Foi dosado em plasma citratado (1 parte de citrato de sódio 3,8%: 9 partes de sangue venoso) e a análise foi feita utilizando-se o kit 'test thrombin reagent' (Siemens Healthcare Diagnostics – Marburg – Alemanha).

Análise da presença de LY6G, ICAM, CD34, CD31 e eNOS por imunohistoquímica

Analisamos as carótidas lesionadas dos grupos de tempo zero por imunohistoquímica, com os vasos obtidos como descrito anteriormente. As lâminas foram descongeladas e fixadas em acetona por 20 minutos dentro da geladeira. Após esse tempo, foram lavadas 1 vez com solução de PBS 1x e posteriormente incubadas com PBS/BSA 1%

(1g de BSA para 100ml de PBS 1x) por 1 hora e 30 minutos a temperatura ambiente. Os cortes foram lavados 2 vezes com PBS 1x e circulados com caneta hidrofóbica para que o anticorpo fosse depositado somente sobre cada corte. Incubamos com anticorpo primário diluídos em PBS/BSA 1% (LY6G- 1:80, ICAM- 1:80, CD34- 1:100, CD31- 1:80 e eNOS- 1:100) por 2 horas ou overnight a temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas 2 vezes com PBS 1x e incubadas com anticorpo secundário específico diluído 1:250 por 40 minutos a temperatura ambiente e protegido da luz. Após o tempo, lavamos com 2 vezes com PBS 1 x e contra coramos com DAPI 0,5ug/ml diluído em metanol, por 15 minutos e protegido da luz em temperatura ambiente. Por fim, os cortes foram lavados 3 vezes com PBS 1 x e 2 vezes com água destilada e as lâminas foram montadas com meio de montagem. Estas foram examinadas em microscópio de fluorescência (Observer Z.1, Zeiss, Oberkochen, Germany) utilizando Axio Vision 4.8 Software e foi feita a contagem de células marcadas utilizando o programa ImageJ® 1.42q, com n=5 animais e 3 cortes por lâmina analisada.

Utilizamos a marcação com anticorpos LY6G para a presença de células inflamatórias (é um glicosilfosfatidilinositol expresso por células derivadas de células mielóides, sendo expresso por monócitos na medula óssea, em granulócitos e neutrófilos), ICAM para análise da capacidade de aderência das células inflamatórias, CD34 para células progenitoras endoteliais, CD31 para células endoteliais e eNOS para enzima óxido nítrico sintase endotelial, sendo um marcador de qualidade da célula. Avaliamos eNOS também nos grupos de 21 dias com neointima.

Zimografia *in situ*

Os cortes de artéria carótida e da raiz da aorta de 8 µm armazenados no biofreezer foram descongelados e incubados 5 minutos em tampão gelatinase 1x (Tris 0,5M, NaCl 1,5M, CaCl₂ 50mM em pH7,6) e depois em uma solução de 1 mg/ml de DQ-gelatina (Invitrogen-Eugene, Oregon, USA) marcada com fluoresceína em tampão para a detecção da atividade de gelatinases durante 3 horas em câmara úmida escura, a 37°C. Os cortes foram lavados 3x com PBS 1x, as lâminas foram montadas e examinadas em microscópio de fluorescência (Observer Z.1, Zeiss, Oberkochen, Germany) utilizando Axio Vision 4.8 Software. A atividade proteolítica foi detectada por um aumento da intensidade de fluorescência devido à atividade gelatinolítica, e a intensidade de fluorescência nos diferentes cortes foi quantificada no programa Image J® 1.42q (densidade integrada), subtraindo-se a intensidade de fluorescência

da lâmina Branco, ou seja, somente com tampão gelatinase, obtendo-se o que se chama de densidade integrada normalizada.

Zimografia em gel

Para extração da proteína a ser analisada, trabalhamos com um pool de 3-5 artérias carótidas para cada grupo. As artérias foram coletadas 1 hora e 21 dias após a lesão trombótica arterial, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas à -80°C até a extração proteica. A extração foi realizada com utilizando um tampão de extração contendo Tris 50mM, NaCl 0,2M e CaCl_2 10mM, na proporção de 100 uL de tampão para cada 30 mg de tecido e adicionou-se coquetel anti-protease (Protease Inhibitor Cocktail – Sigma – Cat. No. P8340) na proporção de 10 uL de coquetel para cada 1 mL de tampão. As amostras foram colocadas em gelo por 2 horas para a extração das proteínas. Após esse tempo, foram centrifugadas por 20 minutos a 4°C a 8000rpm; o sobrenadante foi coletado e ressuspendeu-se o precipitado em 1/3 do volume do tampão de extração. As amostras foram aquecidas por 5 minutos a 60°C e centrifugadas novamente para coleta do sobrenadante. Os extratos de proteína são misturados e quantificados de acordo com o método de Bradford (1976). Utilizou-se de 20-40 μg de proteína em cada poço para cada grupo de animal analisado. O gel de poliacrilamida de 10% contendo 1 % de gelatina foi desenvolvido em 4°C e após o final da eletroforese, o gel foi lavado com 2,5% de Triton X-100 e incubado durante 21 horas numa solução de Tris-HCL 50mM (pH7,4) NaCl 0.1M e azida sódica 0,03% em 37°C . O gel foi corado com Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma) por 1 hora. Depois disso, o gel foi descorado com uma solução contendo etanol 30% e ácido acético 10% para observação das bandas negativas das proteínas, correspondendo à atividade das enzimas. As bandas em imagem negativa foram quantificadas através da densitometria usando o software ImageJ 1.42q.

Análise estatística

Os grupos foram analisados utilizando-se $n \geq 3$ animais. A significância estatística foi determinada através do teste t e teste Mann-Whitman U. Valores de p menores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos, sendo que $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$.

RESULTADOS

Para melhor entendimento, os resultados foram divididos de acordo com a presença ou ausência da lesão arterial para indução da trombose, com o intuito de analisar a influência dessa lesão nos diferentes parâmetros estudados.

1. GRUPOS SEM LESÃO

1.a) Teste VO₂máx

No teste de VO₂máx são dados os valores de VO₂, velocidade máxima, distância total percorrida ao final do teste e tempo de exaustão e foram comparados os grupos sedentários e exercitados (2 ou 5 semanas de exercício).

A primeira análise refere-se à comparação entre os diferentes grupos com relação à velocidade máxima atingida ao final do teste. Houve um aumento significativo de 17,65% ($p=0,0108$) no grupo exercitado 2 semanas quando se comparou ao de mesma idade (12 semanas). Ainda, houve uma redução de 22% ($p=0,0195$) dessa velocidade no grupo sedentário de 15 semanas quando comparado ao de 12 semanas, e o exercício físico por 5 semanas também foi capaz de aumentar significativamente em 62,26% ($p=0,0022$) a velocidade máxima quando comparado ao grupo de mesma idade (15 semanas). Não se obteve diferença significativa entre os grupos exercitados (Figura 11).

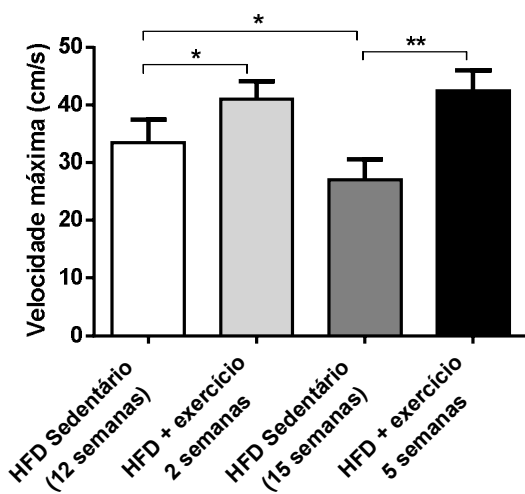


Figura 11. Velocidade máxima atingida no teste de VO₂máx de camundongos LDLr^{-/-} nos grupos HFD sedentário 12 e 15 semanas e HFD exercitado 2 e 5 semanas, $n=6$ em cada grupo (HFD- dieta hiperlipídica, * $p<0,05$, ** $p<0,01$).

Os mesmos resultados foram observados com relação à distância total percorrida pelos camundongos no decorrer do teste, com aumento significativo de 51,39% no grupo exercitado 2 semanas comparado ao de mesma idade ($p=0,0065$) e de 178% no grupo exercitado 5 semanas em relação aos animais de mesma idade ($p=0,0022$). Houve também uma redução de 37,17% ($p=0,0108$) quando se comparou os grupos sedentários (Figura 12).

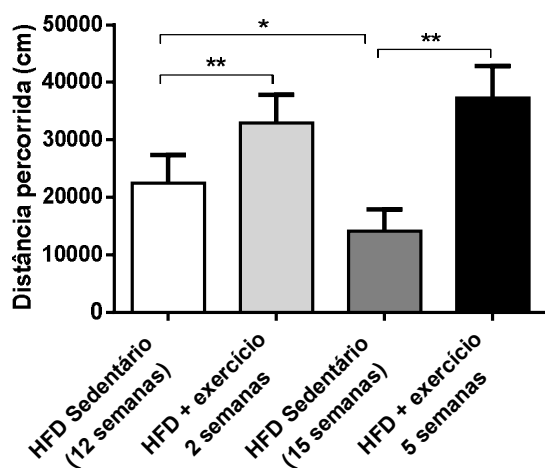


Figura 12. Distância total percorrida durante o teste de VO_2 máx pelos camundongos LDLr^{-/-} nos grupos HFD sedentário 12 e 15 semanas e HFD exercitado 2 e 5 semanas, n=6 em cada grupo (HFD- dieta hiperlipídica, *p<0,05, **p<0,01).

No que se refere ao tempo de exaustão, ou seja, o tempo total do teste a partir do qual o camundongo não conseguia mais prosseguir, observou-se um aumento significativo de 24,06% (p=0,0043) e 67,75% (p=0,0022), respectivamente, nesse valor nos grupos exercitados 2 e 5 semanas quando comparado aos grupos de mesma idade. Além disso, uma redução de 21,84% (p=0,0108) no tempo nos animais sedentários de 15 semanas comparando aos de 12 semanas (Figura 13).

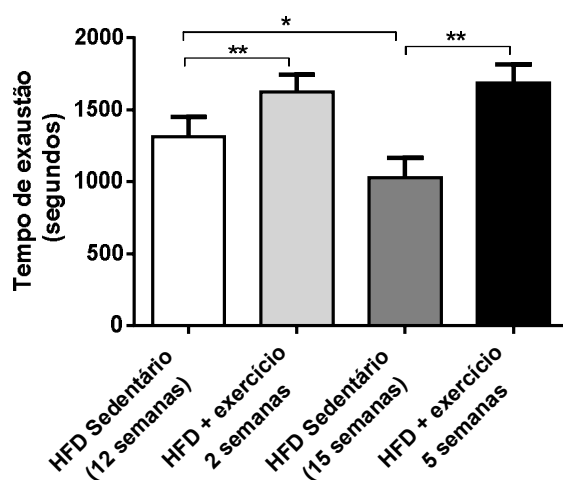


Figura 13. Tempo de exaustão atingido pelos camundongos LDLr^{-/-} grupos HFD sedentário 12 e 15 semanas e HFD exercitado 2 e 5 semanas, n=6 por grupo (HFD- dieta hiperlipídica, *p<0,05, **p<0,01).

Com relação aos valores de VO_2 máx atingido durante o teste, observou-se que o exercício físico de 2 semanas não foi capaz de aumentar esse número com relação ao grupo de mesma idade ($p=0,3874$), mas com o protocolo de treinamento de 5 semanas foi observado um aumento de 26,96% ($p=0,026$), indicando que esse protocolo de maior duração pode ter proporcionado uma adaptação do corpo ao treinamento físico (um aumento no débito cardíaco). Contudo, houve uma redução significativa de 9,4% ($p=0,0411$) nesse parâmetro no grupo sedentário de 15 semanas quando comparado ao de 12 semanas (Figura 14), indicando que o prolongamento da dieta piora a condição física dos animais.

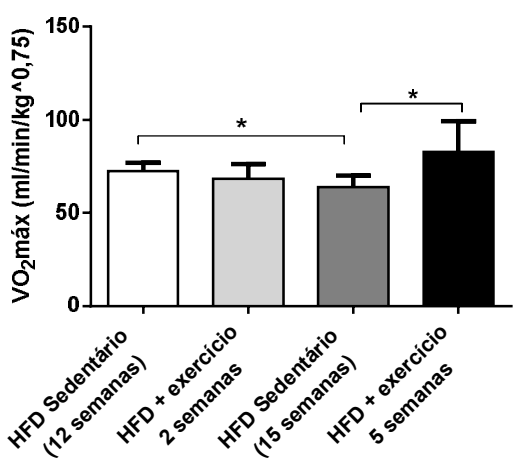


Figura 14. VO_2 máx atingido pelos camundongos $LDLr^{-/-}$ nos grupos HFD sedentário 12 e 15 semanas e HFD exercitado 2 e 5 semanas, $n=6$ por grupo (HFD- dieta hiperlipídica, $*p<0,05$).

Alguns trabalhos determinam a intensidade do protocolo de exercício físico através dos valores de VO_2 máx, sendo este considerado como moderado quando atinge-se de 60-75% do VO_2 max e valores superiores a este são considerados de alta intensidade [61, 62]. No caso do treinamento utilizado nesse trabalho, observou-se que se trata de um protocolo de alta intensidade, visto que na velocidade estabelecida (12m/min ou 20cm/s), os animais atingem valores de VO_2 superiores a 75% do VO_2 máx, chegando até a 85%, porém sem diferença estatística (Figura 15).

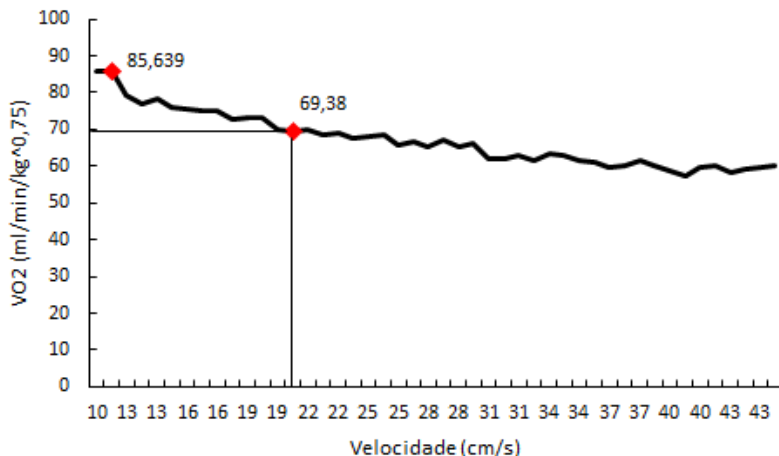


Figura 15. VO₂ durante o protocolo do teste de VO₂máx no grupo exercitado 5 semanas, sendo os pontos destacados o VO₂máx médio atingido e o VO₂ médio atingido na velocidade estabelecida no protocolo de treinamento, respectivamente.

1.b) Peso corporal

Os animais foram pesados antes do início da dieta hiperlipídica e após o término desta e, nos grupos exercitados, foram pesados antes e após o protocolo de treinamento, com o propósito de verificar se a atividade física é capaz de reduzir o peso corporal quando comparado ao grupo de mesma idade. O exercício por 2 semanas não reduziu o peso corporal de forma significativa ($p=0,2436$), porém essa medida aumentou significativamente em 18,8% nos animais de 12 para 15 semanas ($p=0,0286$). Além disso, a atividade física por 5 semanas reduziu significativamente em 31,9% ($p=0,0061$) o peso dos animais quando comparado ao grupo de mesma idade (Figura 16).

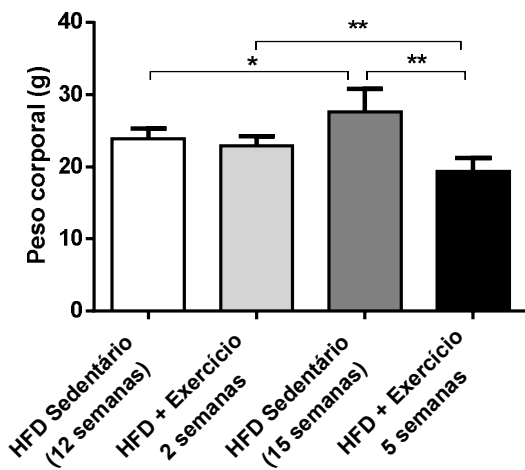


Figura 16. Peso corporal dos camundongos LDLr^{-/-} nos grupos sedentário e exercitado 2 semanas, ambos com 12 semanas e grupos sedentário e exercitado 5 semanas, ambos com 15 semanas, n=6 por grupo (HFD- dieta hiperlipídica, *p<0,05, **p<0,01).

1.c) Perfil lipídico – níveis de colesterol e triglicerídeos

Na análise do perfil de lipídeos dos camundongos LDLr^{-/-}, observou-se um aumento significativo nos níveis de colesterol total e triglicerídeos no grupo alimentado com dieta hiperlipídica quando se compara o grupo alimentado com dieta normal, sendo esse aumento de 159,7% (p=0,0022) e 111,2% (p=0,0022), respectivamente. No grupo exercitado por 5 semanas, houve uma redução nesses níveis, porém de forma significativa somente no colesterol (19,8%- p=0,026). Por fim, comparamos esses valores com os animais selvagens, utilizando-os como referência para evidenciar as características do modelo de estudo da aterosclerose. Observamos que os valores de colesterol total e triglicerídeos são significativamente menores em relação aos animais LDLr^{-/-} alimentado e não alimentado (Figuras 17 e 18), indicando que a dieta hiperlipídica somente não é capaz de aumentar esses níveis, existe a influência do fator genético.

Os valores obtidos do grupo alimentado com dieta normal estão de acordo com a literatura [21], entretanto diferem com relação aos animais LDLr^{-/-} HFD, variando de acordo com outros estudos e estas variações podem estar relacionadas ao tempo de alimentação ou a fonte da dieta fornecida [21, 22], sendo que nossa dieta foi produzida manualmente para a realização desse trabalho. Apesar disso, os resultados vistos no perfil de lipídeos mostraram que a dieta foi capaz de promover o aumento do colesterol total e triglicerídeos.

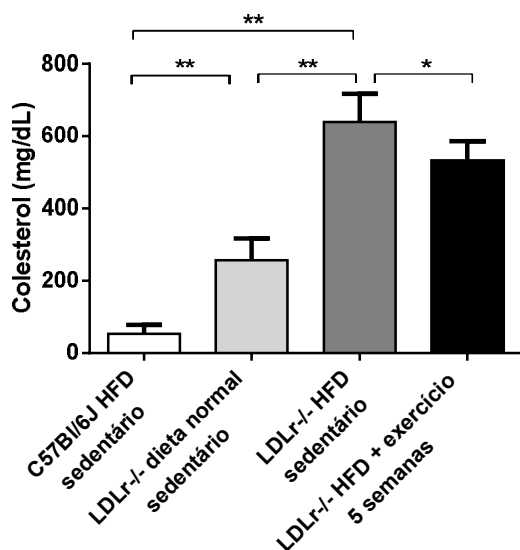


Figura 17. Níveis de colesterol total ao plasma de camundongos dos grupos C57Bl/6J sedentário com HFD, LDLr-/- sedentário com dieta normal, com HFD e HFD + exercício 5 semanas, n=6 por grupo (HFD- dieta hiperlipídica, *p<0,05, **p<0,01).

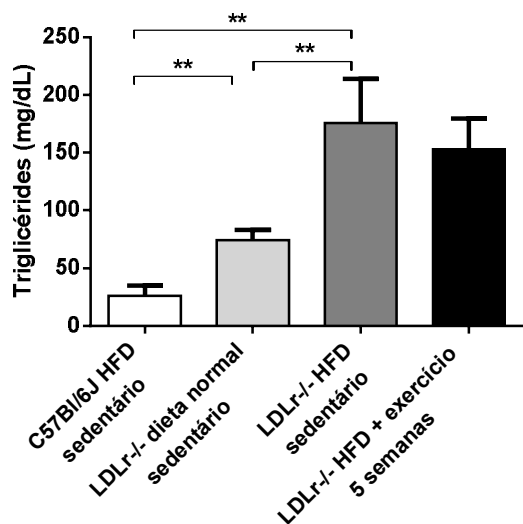


Figura 18. Níveis de triglicerídeos no plasma de camundongos dos grupos C57Bl/6J com HFD, LDLr-/- com dieta normal, com HFD e HFD + exercício 5 semanas, n=6 por grupo (HFD- dieta hiperlipídica, **p<0,01).

1.d) Análise da deposição de lipídeos na raiz da aorta

Analizamos a deposição de lipídeos na raiz da aorta através da coloração Oil Red O nos diferentes grupos, com o objetivo de verificar a influência do exercício físico na aterosclerose (Figura 19).

Calculou-se a porcentagem desses lipídeos presentes na túnica média da raiz da aorta e observamos um aumento significativo no grupo LDLr-/- sedentário HFD quando comparado ao selvagem HFD e ao LDLr-/- com dieta normal, ambos sedentários (10 e 5 vezes, respectivamente), indicando a importância da dieta e da genética no desenvolvimento das placas ateroscleróticas. Além disso, observou-se uma redução significativa nessa deposição de lipídeos de 49,6% (p=0,0159) no grupo exercitado 2 semanas e de 43,2% (p=0,0079) nos animais exercitados 5 semanas, mas não houve diferença entre os grupos exercitados (p=0,2857) (Figura 20).

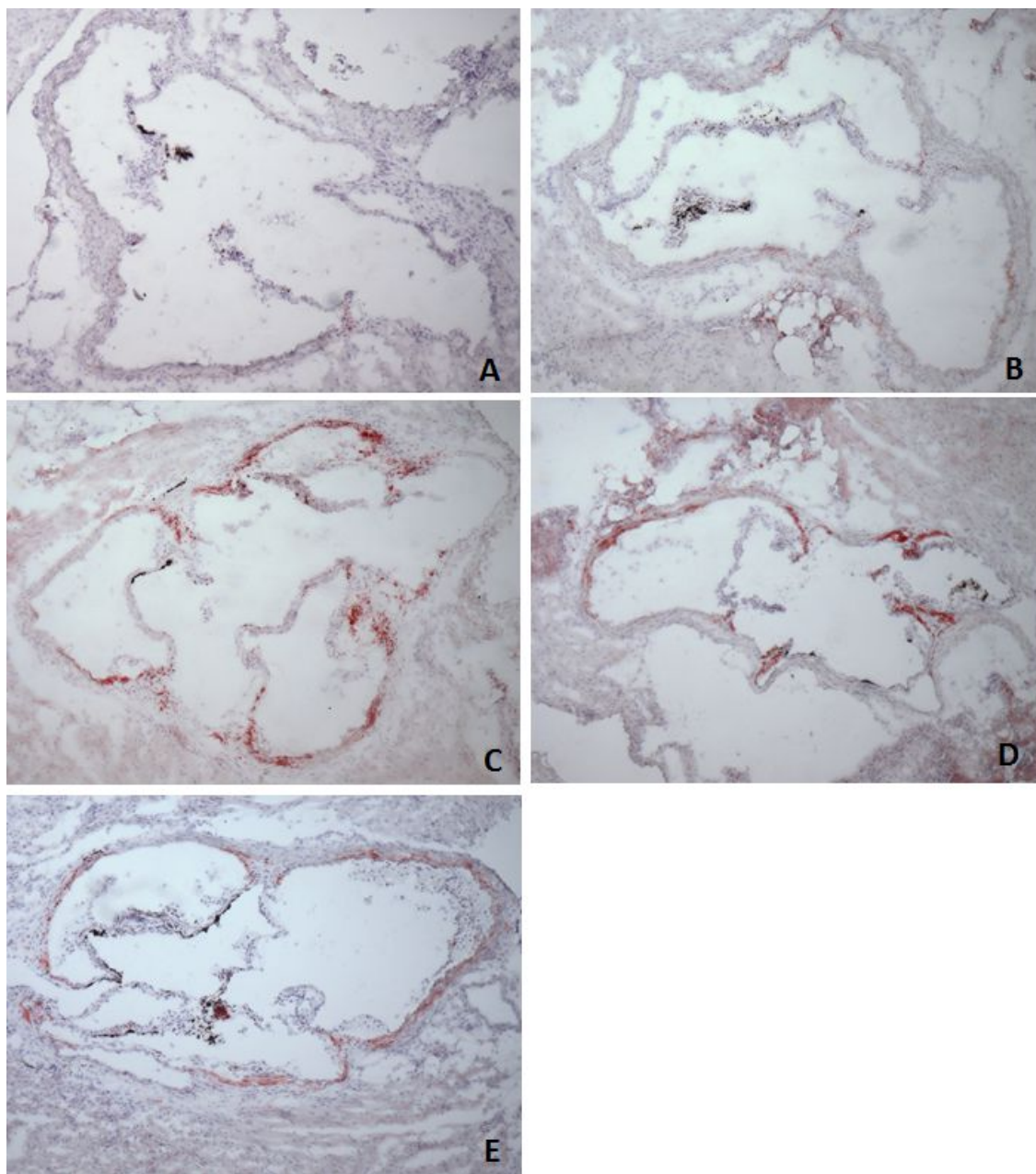


Figura 19. Cortes histológicos de raiz de aorta corados com Oil Red O (A- C57Bl/6J HFD sedentário: n=3, B- LDLr-/- sedentário com dieta normal: n=3, C- LDLr-/- sedentário HFD: n=5, D- LDLr-/- HFD exercitado 2 semanas: n=5 e E- LDLr-/- HFD e exercitado 5 semanas: n=5).

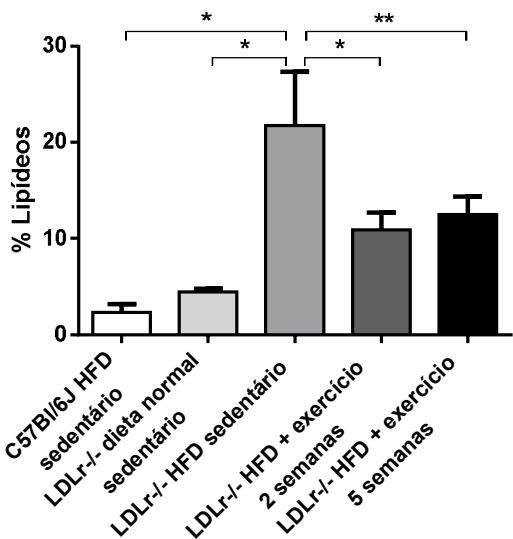


Figura 20. Porcentagem de lipídeos na raiz da aorta nos diferentes grupos, $n \geq 3$ por grupo (HFD- dieta hiperlipídica, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

1.e) Análise histológica da artéria carótida

Foi realizada a coloração Hematoxilina-Eosina da artéria carótida e analisou-se os grupos alimentados com dieta normal, HFD sedentário e HFD exercitado 5 semanas. Calculou-se somente a área da camada média (diferença entre a área delimitada pela lâmina elástica externa e a área delimitada pela lâmina elástica interna) dos vasos sanguíneos, para verificar se haveria aumento ou redução dessa camada devido ao exercício físico, porém essa diferença não foi observada, sendo $p = 0,6753$ entre os grupos sedentários com dieta normal e HFD, $p = 0,3874$ entre os grupos sedentário com dieta normal e HFD exercitado 5 semanas e $p = 0,474$ entre os grupos HFD sedentário e exercitado 5 semanas (Figuras 21 e 21).

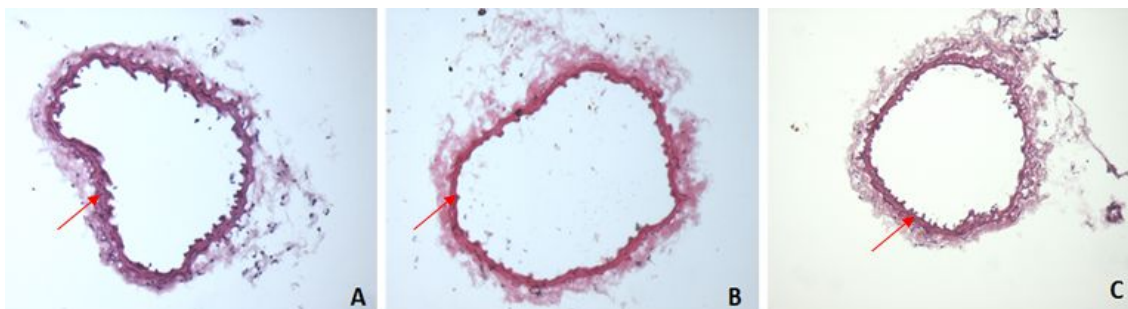


Figura 21. Cortes histológicos de artéria carótida de grupos sem lesão corados com Hematoxilina-Eosina (A- sedentário com dieta normal, B- HFD sedentário e C- HFD exercitado 5 semanas), $n = 6$ por grupo, setas vermelhas indicam a camada média do vaso.

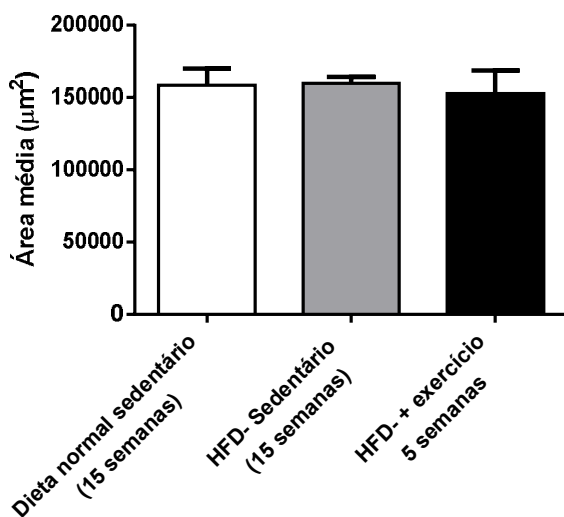


Figura 22. Área média da artéria carótida comparando grupos sedentário e exercitado 5 semanas, ambos com 15 semanas, n=6 por grupo.

1.f) Detecção da presença do marcador ICAM por imunohistoquímica

A técnica de imunohistoquímica foi realizada em cortes congelados e previamente fixados antes do início do protocolo. Foi feita marcação para ICAM comparando os grupos com 15 semanas de idade, sendo eles: sedentário com dieta normal, HFD sedentário e HFD exercitado 5 semanas, com o objetivo de analisar a inflamação nos vasos (Figura 23).

Nesse caso, observou-se um aumento de 48,6% ($p=0,0079$) no grupo HFD quando comparado aos animais sedentários alimentados com dieta normal e, também, uma redução de 40,9% ($p=0,0159$) nessa marcação no grupo HFD exercitado comparando ao com dieta hiperlipídica sedentário (Figura 24).

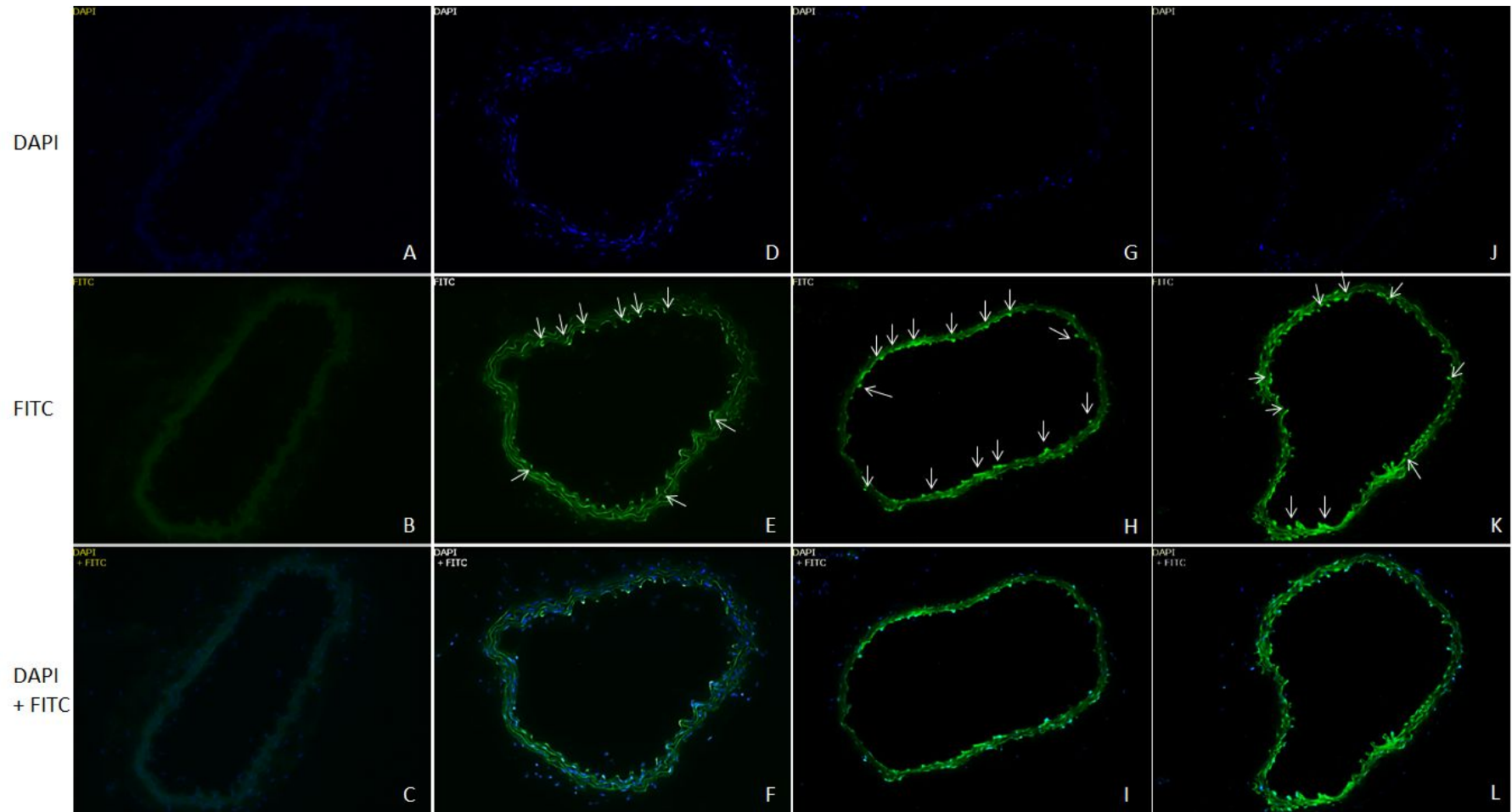


Figura 23. Artéria carótida de camundongos LDLr^{-/-} marcada pela técnica de imunohistoquímica para ICAM. (A-C) Branco, (D-F) Dieta normal sedentário, (G-I) HFD sedentário e (J-L) HFD exercitado 5 semanas. Setas brancas indicam células marcadas.

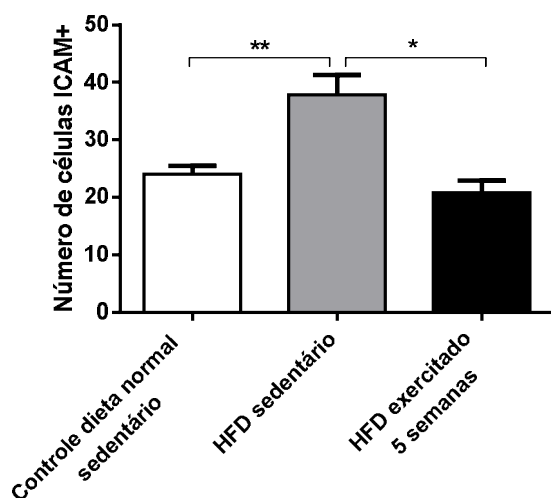


Figura 24. Número de células ICAM+ de camundongos LDLr^{-/-} comparando os grupos alimentados com dieta normal, HFD sedentário e HFD exercitado 5 semanas, n=5, 3 cortes por lâmina (HFD- dieta hiperlipídica, *p<0,05, **p<0,01).

1.g) Zimografia *in situ*

A zimografia *in situ* foi realizada com o objetivo de analisar a atividade das gelatinases, nesse caso MMP-2 e 9, nos diferentes grupos. Analisamos essa atividade nos grupos HFD sedentário e exercitado 5 semanas, para que pudéssemos saber a expressão basal dessas enzimas e o efeito do exercício somente, visto que não se tem a respeito em literatura (Figura 25).

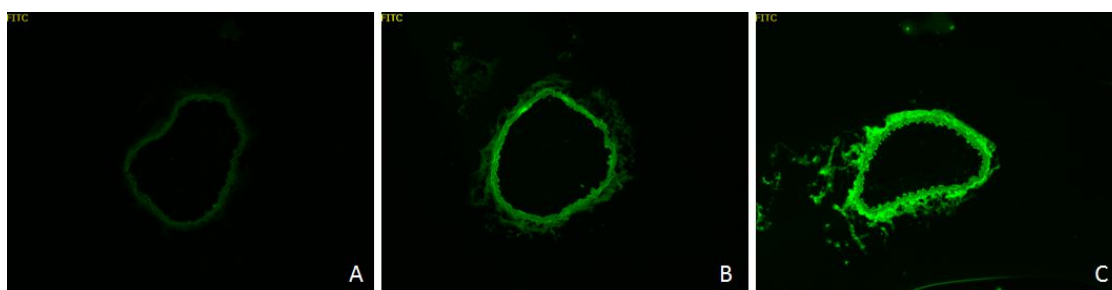


Figura 25. Zimografia *in situ* da artéria carótida nos grupos sedentário (B) e exercitado 5 semanas (C), n= 4, 3 cortes por lâmina (A- Branco).

Nesse caso, a análise estatística mostrou um aumento de 278% (p=0,0286) na atividade das gelatinases devido ao exercício físico (Figura 26).

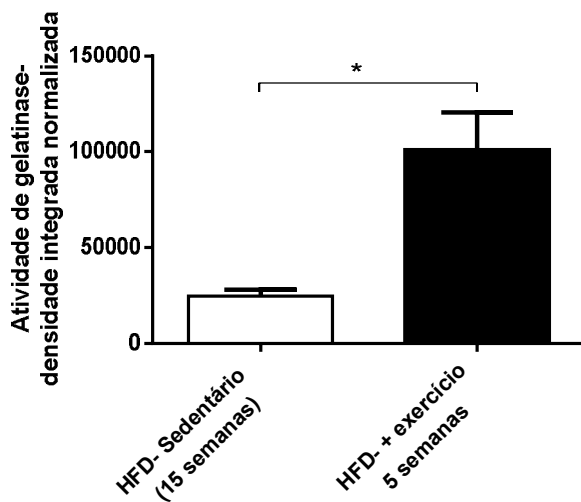


Figura 26. Atividade das gelatinases na artéria carótida dos grupos sem lesão sedentário e exercitado 5 semanas, n=4, 3 cortes por lâmina (HFD- dieta hiperlipídica, * $p < 0,05$).

O ensaio de zimografia também foi feito na raiz da aorta, com o propósito de analisar o efeito do exercício físico na aterosclerose. Nesse caso, observou-se uma redução significativa na atividade das gelatinases no grupo sem lesão exercitado 5 semanas com relação ao sedentário, sendo esta redução de 52%, com $p = 0,0079$ (Figuras 27 e 28).

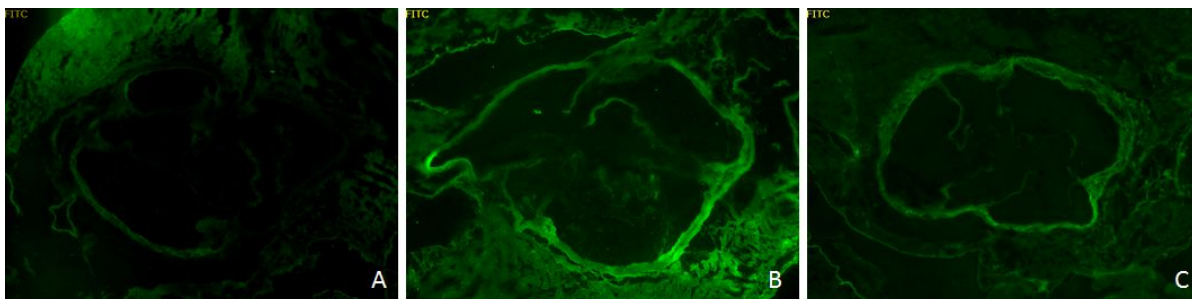


Figura 27. Zimografia *in situ* na raiz da aorta (A- Branco) nos grupos sedentário (B) e exercitado 5 semanas (C), n=5, 3 cortes por lâmina.

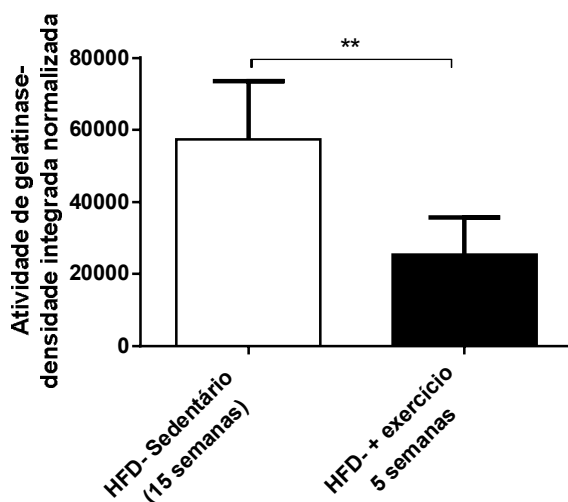


Figura 28. Atividade das gelatinases na raiz da aorta dos grupos sem lesão sedentário e exercitado 5 semanas, n=5, 3 cortes por lâmina (HFD- dieta hiperlipídica, **p<0,01).

A partir deste ponto, as análises foram realizadas nos grupos lesionados, ou seja, nos animais em que foi feita a lesão com cloreto férrico para indução da trombose, com o objetivo de avaliar o efeito do exercício físico em animais com aterosclerose e trombóticos. Lembrando que nesse caso, houve uma subdivisão em grupos tempo zero, para análise do trombo uma hora após a lesão, e tempo de 21 dias, para o estudo da neoíntima (migração e proliferação de células musculares lisas).

2. GRUPOS LESIONADOS TEMPO ZERO

2.a) Tempo de trombose

Imediatamente após a lesão trombótica, foi utilizada uma sonda de ultrassom para medir o fluxo sanguíneo na artéria carótida e estes animais foram sacrificados uma hora após a lesão, tempo no qual o trombo já está formado e estável. No grupo sedentário, o tempo médio de oclusão da artéria foi de 4,93 minutos, enquanto que nos animais exercitados 2 semanas esse tempo foi de 10,25 minutos, observando-se um aumento significativo de 107,9% ($p=0,0025$) nesse valor (Figura 29).

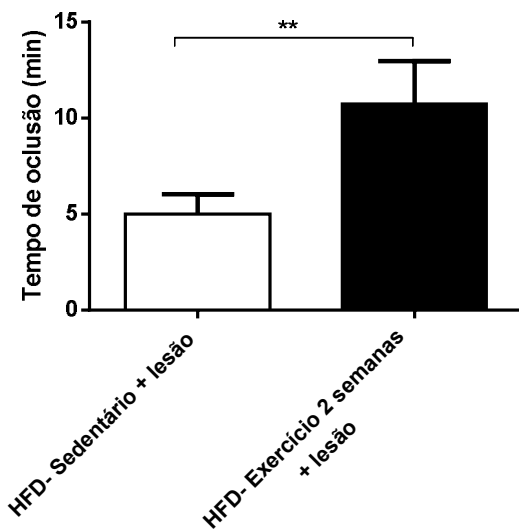


Figura 29. Tempo para oclusão da artéria carótida de camundongos LDLr^{-/-} lesionados sedentários e exercitados 2 semanas, n=7 por grupo (HFD- dieta hiperlipídica, **p<0,01).

2.b) Tempo de coagulação *ex vivo*- TTPa e TT

Quanto ao tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa), que analisa a via intrínseca da cascata de coagulação, não foi observada alteração significativa ($p=0,8983$) nesse valor entre os grupos lesionados tempo zero sedentário e exercitado antes da lesão trombótica (Figura 30).

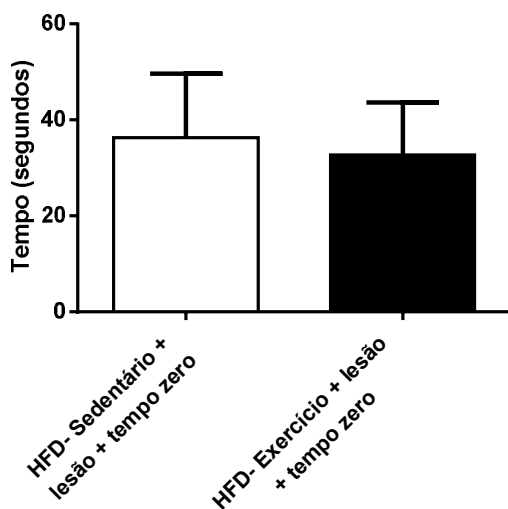


Figura 30. Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) entre grupos lesionados tempo zero sedentário e exercitado 2 semanas, n=6.

Já com relação ao tempo de Trombina (TT), o qual analisa a última etapa da cascata de cascata de coagulação, que consiste na conversão de fibrinogênio em fibrina, observamos uma redução de 65,56% ($p=0,0022$) no tempo nos animais exercitados antes da lesão trombótica quando comparado ao grupo sedentário (Figura 31).

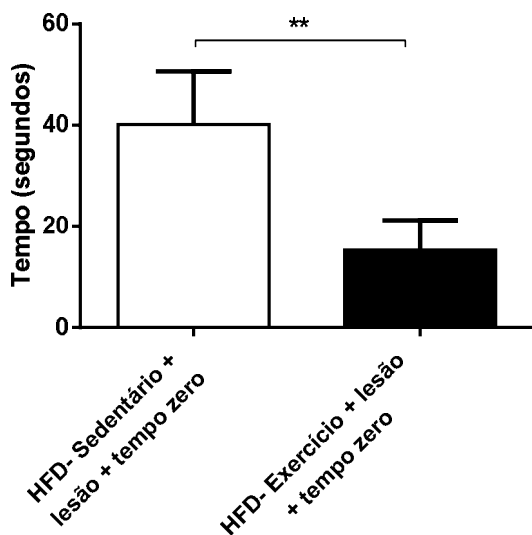


Figura 31. Tempo de trombina (TT) entre grupos lesionados tempo zero sedentário e exercitado 2 semanas, $n=6$ (HFD- dieta hiperlipídica, $*p<0,05$, $**p<0,01$).

2.c) Análise da formação de trombo arterial

Foram analisados os grupos lesionados tempo zero, ou seja, sacrificados uma hora após a lesão arterial, sedentários ou exercitados 2 semanas antes da mesma, para análise do trombo arterial. Na histologia, observa-se redução no tamanho da área do trombo no grupo exercitado (Figura 32).

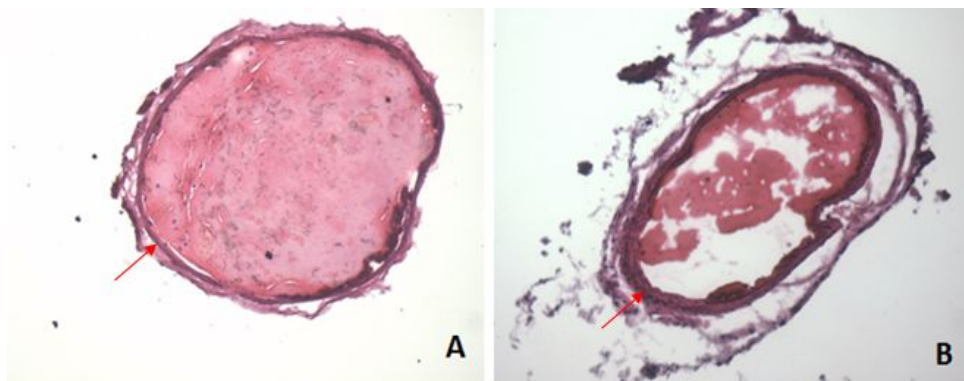


Figura 32. Cortes histológicos de artéria carótida corados com Hematoxilina-Eosina (A- Lesão + tempo zero e B- Exercício + lesão + tempo zero), $n=6$ por grupo, setas vermelhas indicam a camada média do vaso.

Na análise estatística entre esses grupos, houve uma redução significativa de 28,1% ($p=0,0022$) na área de trombo nos animais exercitados (Figura 33). A área média também foi medida nesse caso e não se observou diferença significativa ($p=0,4394$) entre esses dois grupos (Figura 34).

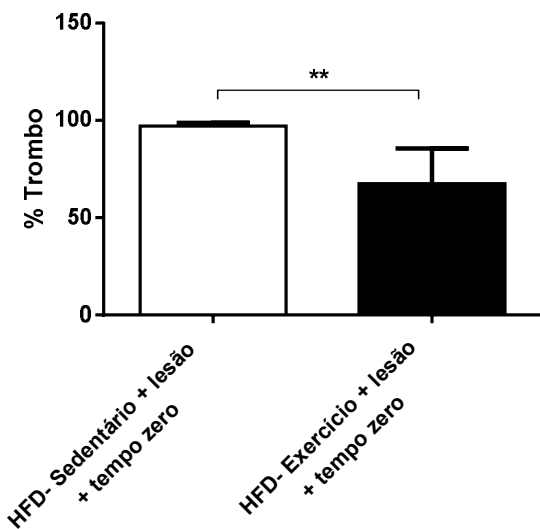


Figura 33. Porcentagem de trombo na artéria carótida dos grupos lesionados sedentário tempo zero e exercitado 2 semanas tempo zero, $n=6$ por grupo (HFD- dieta hiperlipídica, $*p<0,05$, $**p<0,01$).

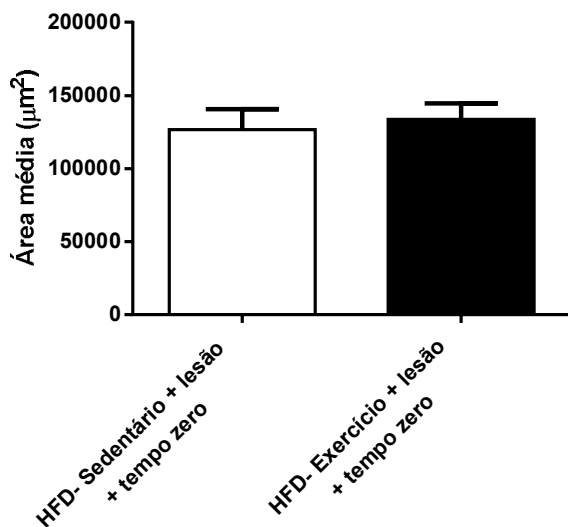


Figura 34. Área média da artéria carótida comparando grupos lesionados sedentário tempo zero e exercitado 2 semanas tempo zero, $n=6$ por grupo (HFD- dieta hiperlipídica).

2.d) Detecção da presença dos marcadores LY6G, CD34, CD31 e eNOS por imunohistoquímica

Foram selecionados os cortes com maior área de trombo para essas análises. Na marcação para LY6G (Figura 35), para detectar a presença ou não de células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos, e a influência do exercício físico, observados uma redução de 37,1% ($p=0,0317$) no número de células positivas para LY6G no grupo exercitado tempo zero quando comparado ao grupo sedentário (Figura 36).

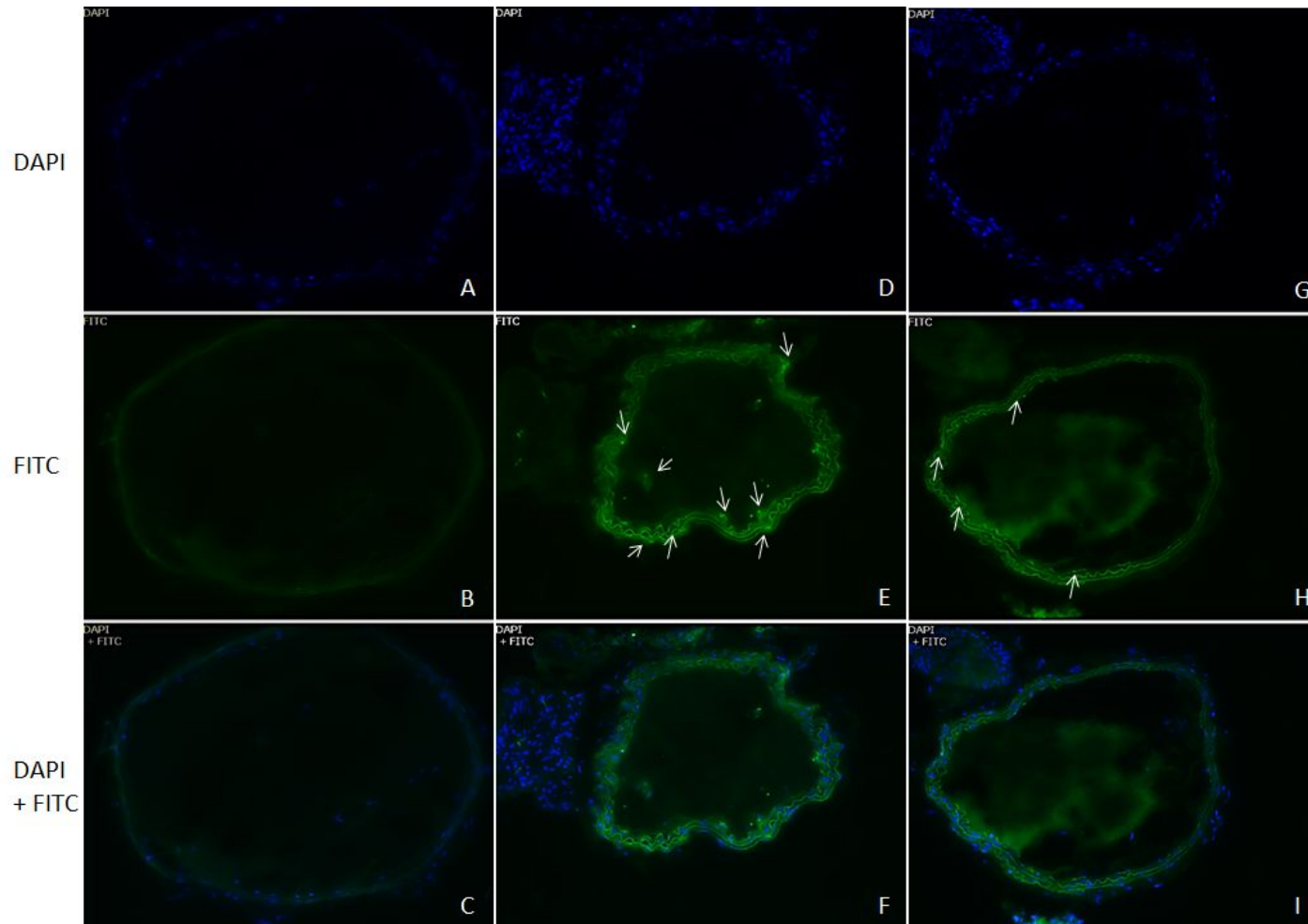


Figura 35. Artéria carótida de camundongos LDLr^{-/-} marcada pela técnica de imunohistoquímica para LY6G. (A-C) Branco, (D-F) Sedentário + lesão + tempo zero e (G-I) Exercício + lesão + tempo zero. Setas brancas indicam células marcadas.

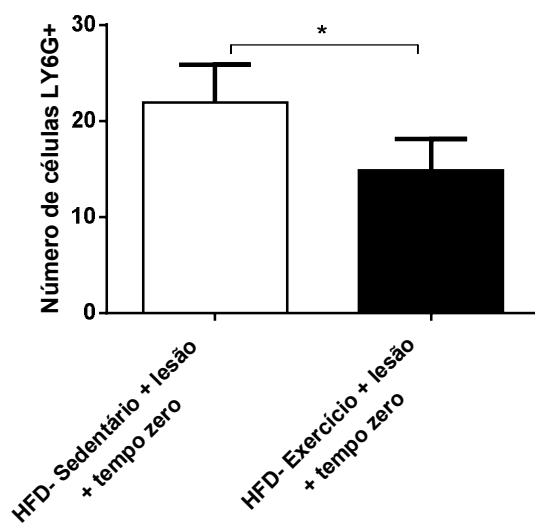


Gráfico 36. Número de células LY6G+ de camundongos LDLr-/- comparando os grupos lesionados sedentário tempo zero e exercitado 2 semanas tempo zero, n=5, 3 cortes por lâmina (HFD- dieta hiperlipídica, *p<0,05).

Na marcação para células progenitoras endoteliais, utilizamos o CD34 (Figura 37), observando um aumento de 111,4% (p=0,0079) no grupo exercitado com lesão no tempo zero quando comparado ao grupo sedentário no mesmo tempo (Figura 38).

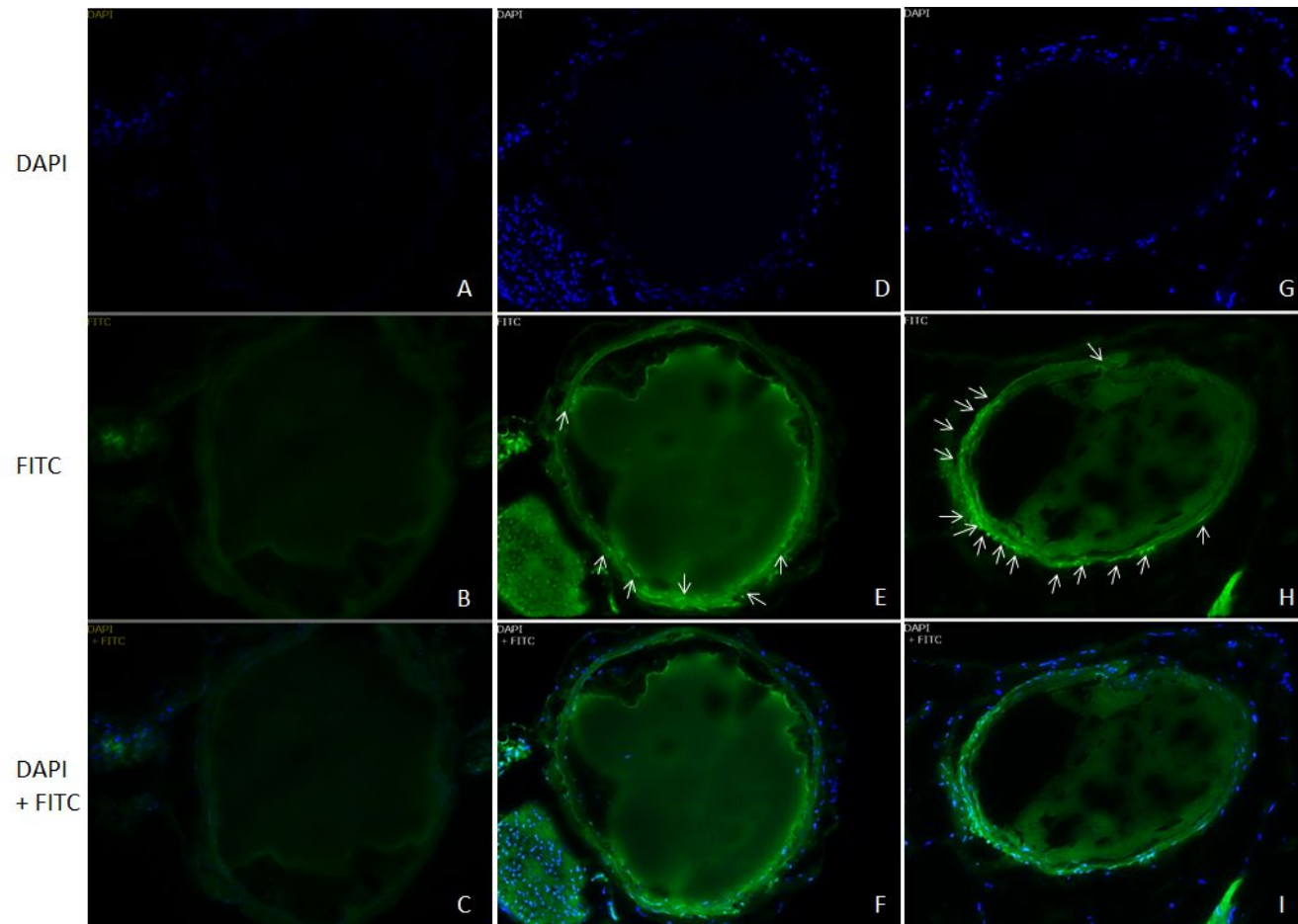


Figura 37. Artéria carótida de camundongos LDLr^{-/-} marcada pela técnica de imunohistoquímica para CD34. (A-C) Branco, (D-F) Sedentário + lesão + tempo zero e (G-I) Exercício + lesão + tempo zero. Setas brancas indicam células marcadas.

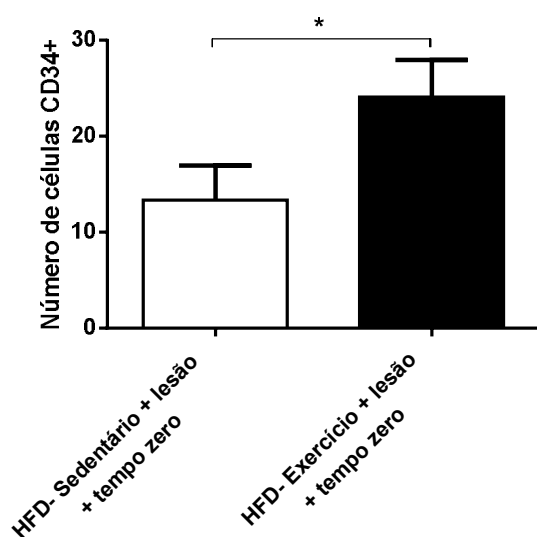


Figura 38. Número de células CD34+ de camundongos LDLr-/- comparando os grupos lesionados sedentário tempo zero e exercitado 2 semanas tempo zero, n=5, 3 cortes por lâmina (HFD- dieta hiperlipídica, *p<0,05).

A molécula CD31 também foi marcada com o objetivo de identificar células endoteliais, comparando os grupos lesionados (sedentário e exercitado) tempo zero com o HFD sem lesão, a fim de verificar se o exercício físico é capaz de recuperar as células do endotélio com lesão (Figura 39). Nesse caso, observou-se uma redução de 67,74% (p=0,0079) nos grupos lesionados sedentário e de 45,16% (p=0,0079) nos animais exercitados quando comparado ao sem lesão, enquanto que houve um aumento significativo de 70% (p=0,0079) no grupo exercitado comparando ao sedentário lesionado, indicando que foi possível uma recuperação do endotélio com o exercício físico (Figura 40).

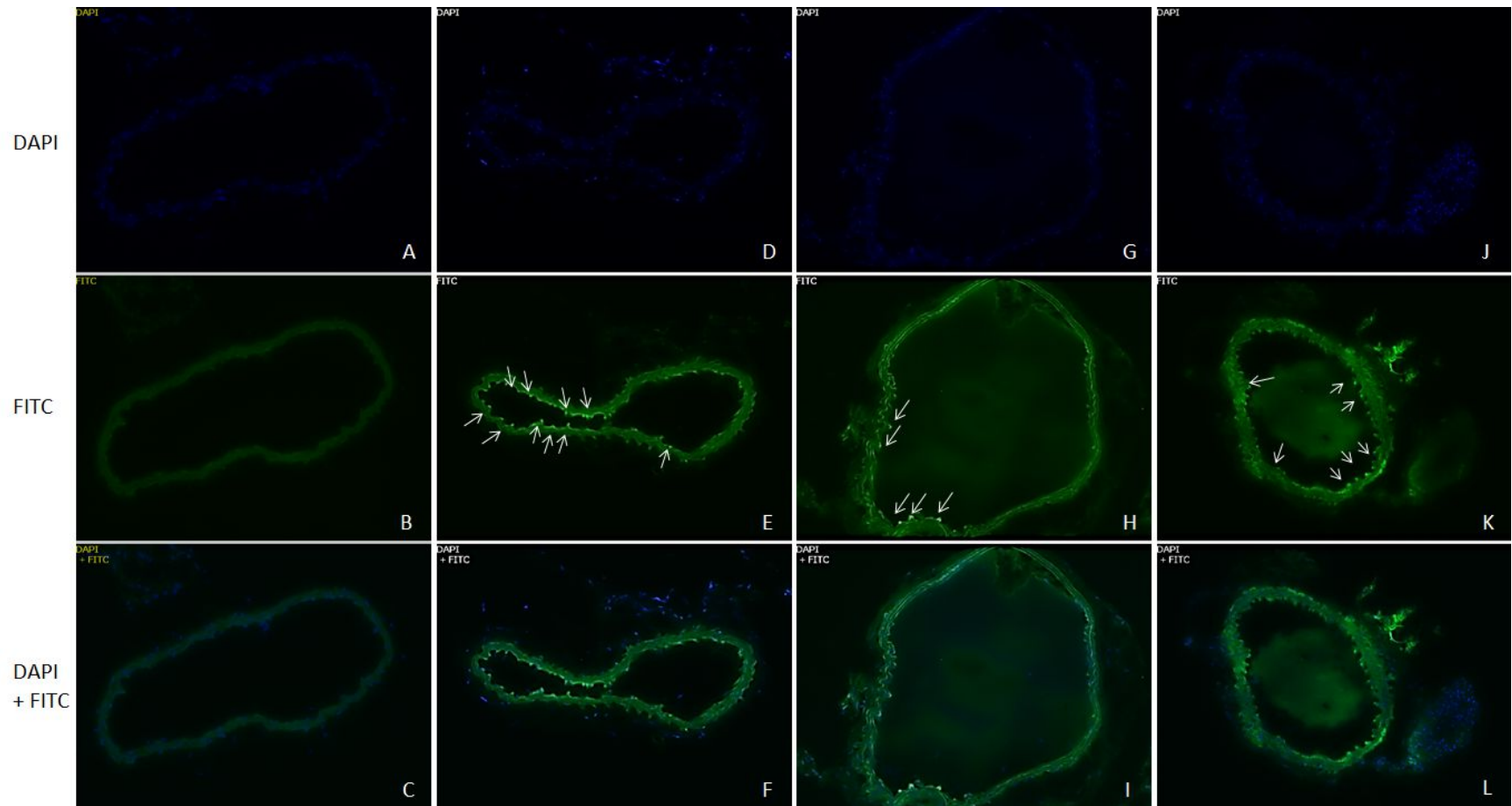


Figura 39. Artéria carótida de camundongos LDLr^{-/-} marcada pela técnica de imunohistoquímica para CD31. (A-C) Branco, (D-F) HFD sedentário sem lesão, (G-I) Sedentário + lesão + tempo zero e (J-L) Exercício + lesão + tempo zero. Setas brancas indicam células marcadas.

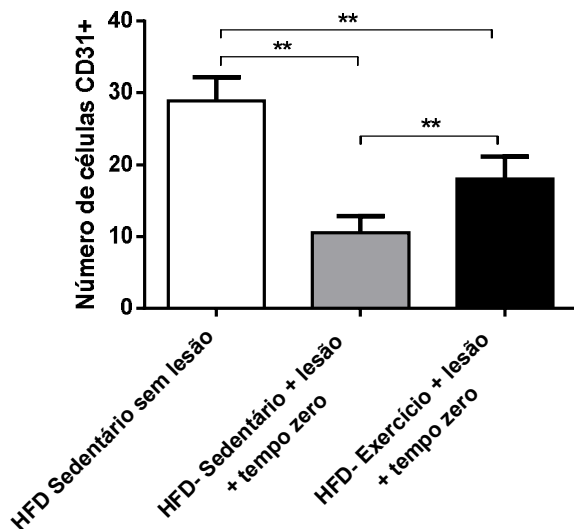


Figura 40. Número de células CD31+ de camundongos LDLr^{-/-} comparando os grupos HFD sedentário sem lesão, lesionado sedentário tempo zero e lesionado exercitado 2 semanas tempo zero, n=5, 3 cortes por lâmina (HFD- dieta hiperlipídica, **p<0,01).

Por fim, foi feita a marcação para a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), verificando a quantidade basal de células marcadas no grupo HFD sem lesão trombótica e também nos grupos lesionados. Observamos uma redução significativa de 65% ($p=0,0079$) na marcação nos animais lesionados sedentários e de 43,8% ($p=0,0079$) nos animais lesionados exercitados, em relação ao grupo não lesionado. Além disso, um aumento significativo de 64,1% ($p=0,0079$) no número de células marcadas positivamente devido ao exercício físico, indicando uma recuperação da presença dessa enzima. (Figuras 41 e 42). Observamos também células marcadas na camada adventícia ao redor da artéria carótida, porém estas não foram contadas devido às diferenças nas áreas dessa camada.

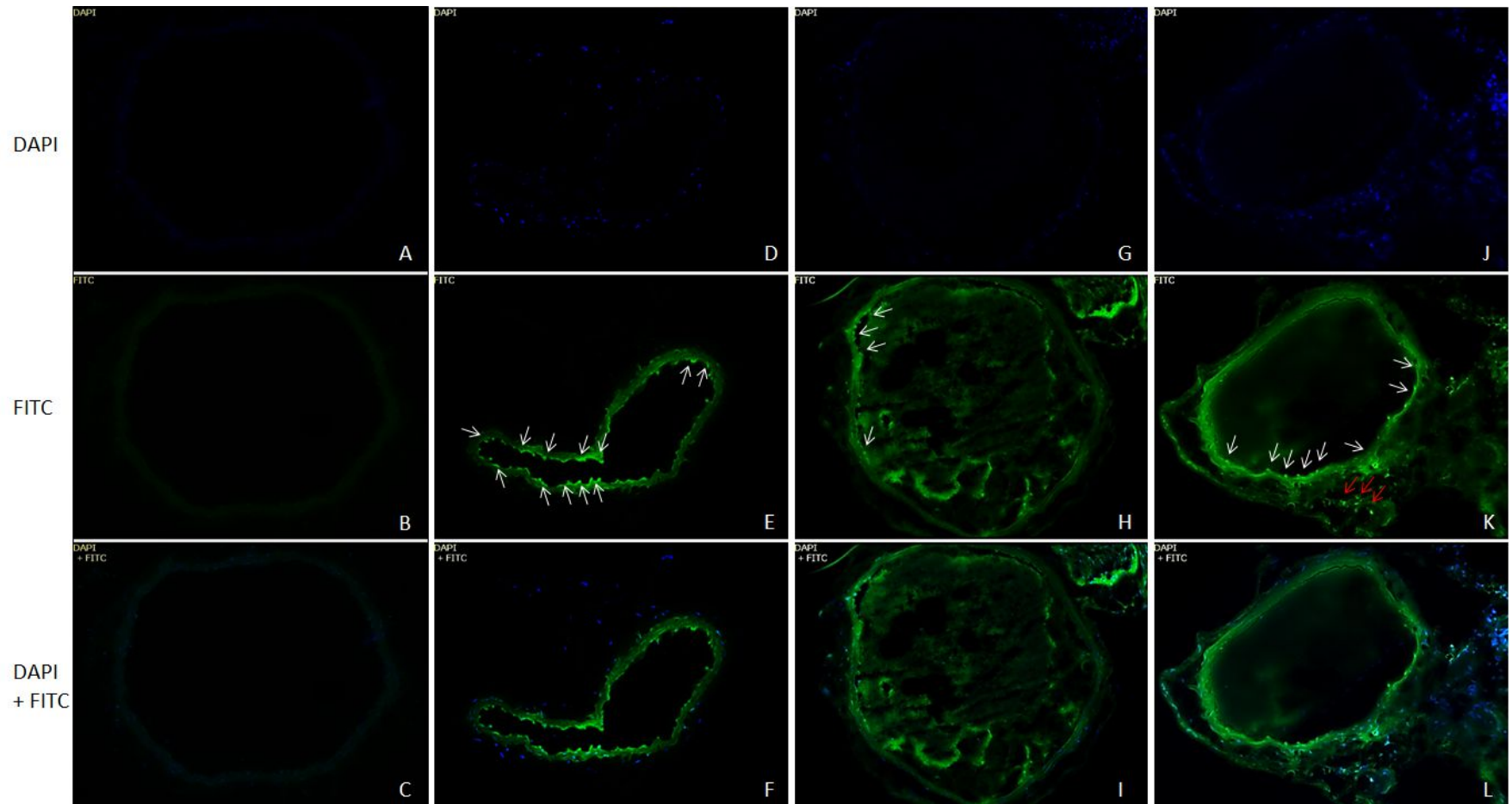


Figura 41. Artéria carótida de camundongos LDLr^{-/-} marcada pela técnica de imunohistoquímica para eNOS. (A-C) Branco, (D-F) HFD sedentário sem lesão, (G-I) Sedentário + lesão tempo zero e (J-L) Exercício + lesão + tempo zero. Setas brancas indicam células marcadas na artéria carótida e setas vermelhas indicam células marcadas na camada adventícia.

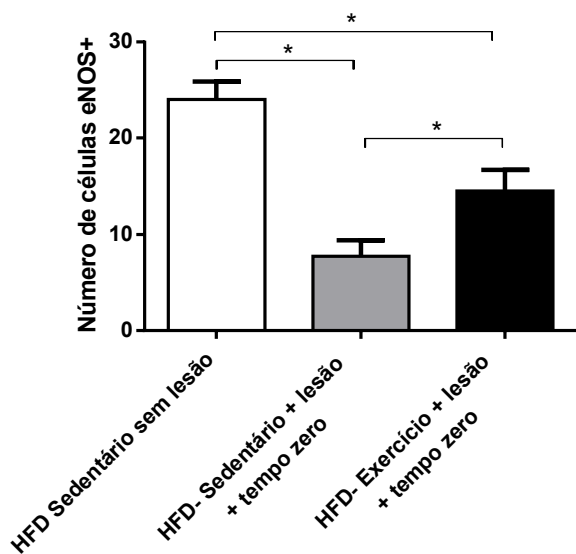


Figura 42. Número de células eNOS⁺ de camundongos LDLr^{-/-} comparando os grupos HFD sedentário sem lesão, lesionado sedentário tempo zero e lesionado exercitado 2 semanas tempo zero, n=5, 3 cortes por lâmina (HFD- dieta hiperlipídica, *p<0,05).

2.e) Zimografia *in situ*

A análise dos dados mostrou um aumento de 228,2% (p=0,0079) na atividade das gelatinases nos animais exercitados quando comparado ao grupo lesionado sedentário (Figuras 43 e 44).

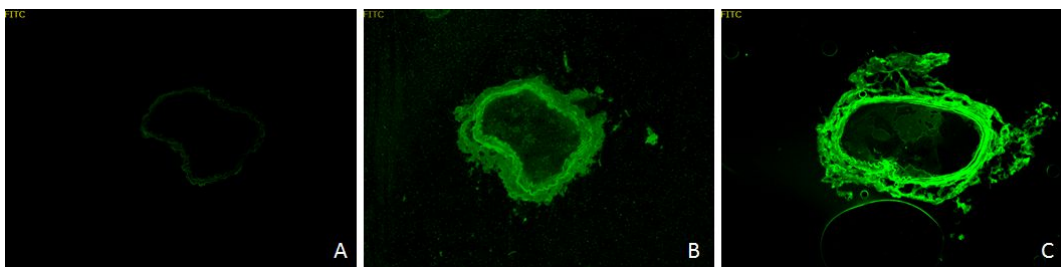


Figura 43. Zimografia *in situ* da artéria carótida nos grupos lesionados sedentário tempo zero (B) e exercitado 2 semanas tempo zero (C), n=5, 3 cortes por lâmina (A- Branco).

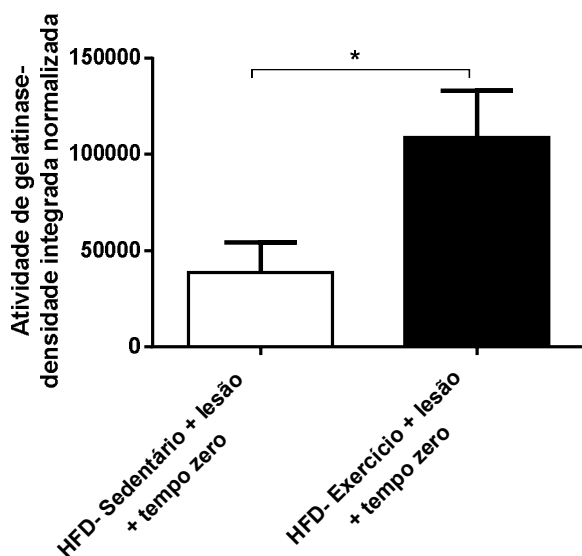


Figura 44. Atividade das gelatinases na artéria carótida dos grupos lesionados sedentário tempo zero e exercitado 2 semanas tempo zero, n=5, 3 cortes por lâmina (HFD- dieta hiperlipídica, *p<0,05).

2.f) Zimografia em gel

A análise das atividades das enzimas MMP-2 e MMP-9 em gel de acrilamida foi realizada com um pool de carótidas (n=3-5) para cada grupo, analisando separadamente os grupos tempo zero com trombo e os grupos com neoíntima, sendo assim um ensaio qualitativo por meio da densitometria das bandas. Com essa técnica, é possível identificar as seguintes gelatinases: MMP-2 latente ou pro-MMP-2 (72kDa), MMP-2 ativa (66kDa), MMP-9 latente ou pro-MMP-9 (92kDa) e MMP-9 ativa (83kDa), além de outras metaloproteinases como a MMP-8 (bandas mais claras entre a 2 e a 9) [63, 64].

No caso dos grupos de tempo zero, o valor medido para a intensidade da banda de G4 foi de 15534,84 e para G5 de 22343,07, sendo este 1,44 vezes maior no que se refere à MMP-2. Quanto à MMP-9, o valor obtido para G4 foi de 36322,9 e para G5 foi de 25194,65, sendo este 1,44 vezes menor (Figuras 45 e 46).

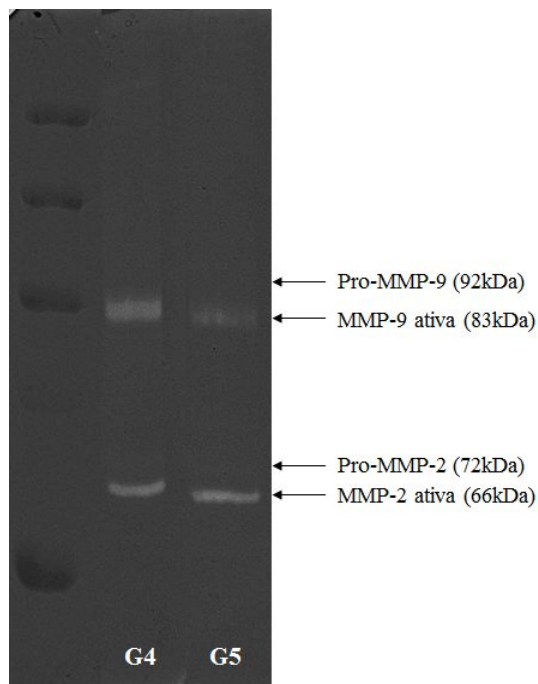


Figura 45. Zimografia em gel para MMP-2 e MMP-9 de artéria carótida dos grupos tempo zero (G4- Lesionado sedentário tempo zero e G5- Lesionado exercitado 2 semanas tempo zero), n=1 (pool de 3-5 carótidas).

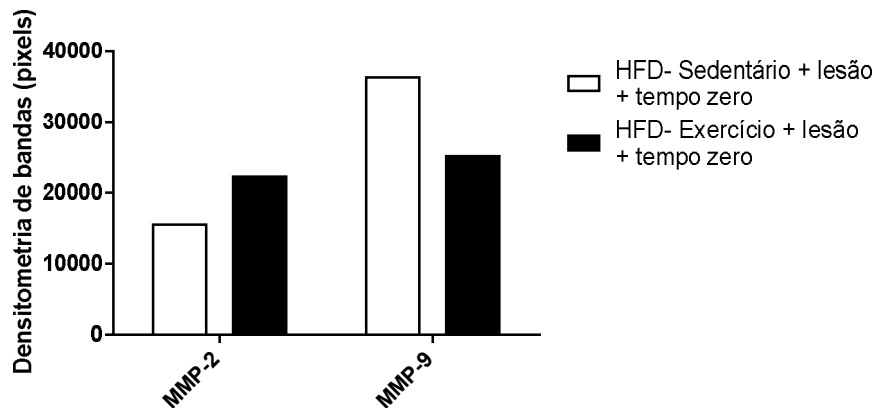


Figura 46. Análise da zimografia em gel por densitometria de bandas no programa ImageJ, em pixels, para MMP-2 e MMP-9 nos grupos tempo zero.

3. GRUPOS LESIONADOS TEMPO DE 21 DIAS

3.a) Análise da formação de neoíntima arterial

A neoíntima é resultado da proliferação de células musculares lisas provenientes da camada média do vaso e da circulação, devido a uma restenose provocada pela lesão arterial. Resultados obtidos previamente em nosso laboratório mostraram que 21 dias após a lesão, o

vaso sanguíneo é ocluído completamente devido à neointima [42, 60]. Diante disso, analisamos também as artérias carótidas 21 dias após a cirurgia para indução da trombose para observar o efeito do exercício físico na proliferação dessas células musculares lisas (Figura 47).

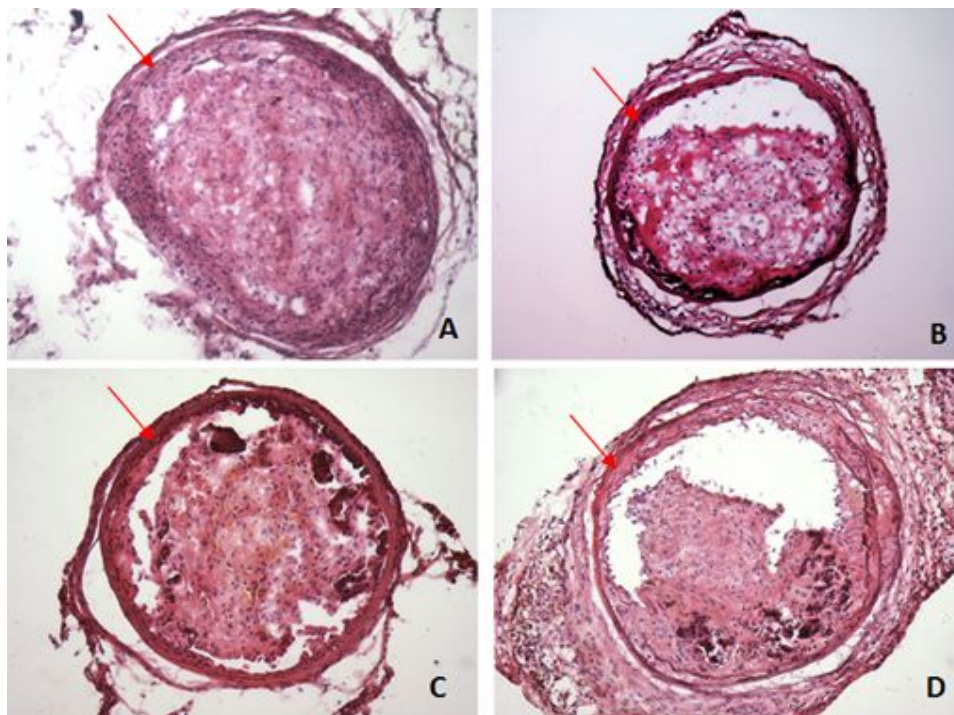


Figura 47. Cortes histológicos de artéria carótida corados com Hematoxilina-Eosina (A- Sedentário com lesão + 21 dias, B- Lesão + exercício 21 dias, C- Exercício + lesão + 21 dias e D- Exercício + lesão + exercício 21 dias), n=6 por grupo, setas vermelhas indicam a camada média do vaso.

Na análise estatística entre esses grupos, observamos uma redução significativa de 9,2% ($p=0,0411$) da área de neointima no grupo exercitado apenas após a lesão arterial e de 24,6% ($p=0,0152$) nos animais com exercício antes e após a lesão, quando comparado ao grupo sedentário de 21 dias após a injúria (Figura 48). Além disso, o grupo com exercício antes e após a lesão também diferiu significativamente dos grupos exercitados somente antes da lesão ($p=0,0087$) e do exercitado somente após a lesão ($p=0,026$). O grupo exercitado somente antes da lesão não diferiu significativamente dos animais sedentários ($p=0,3874$). Não foi observada diferença significativa na área média entre os diferentes grupos (Figura 49).

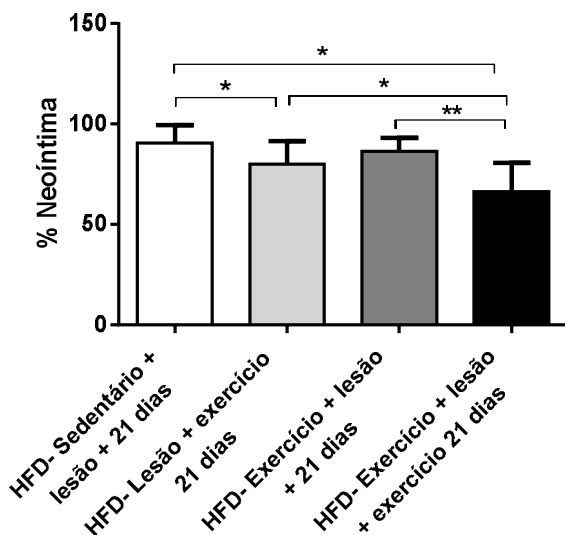


Figura 48. Porcentagem de neointima na artéria carótida nos grupos de 21 dias com 15 semanas de idade, sedentários ou exercitados antes, após e antes e após a lesão, n=6 por grupo (HFD- dieta hiperlipídica, *p<0,05, **p<0,01).

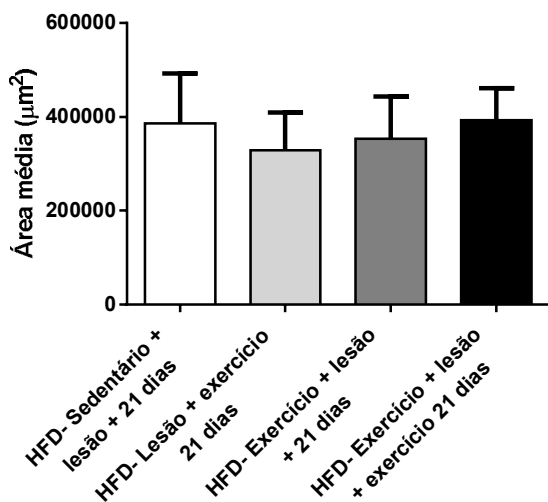


Figura 49. Área média da artéria carótida nos grupos de 21 dias com 15 semanas de idade, sedentários ou exercitados antes, após e antes e após a lesão, n=6 por grupo (HFD- dieta hiperlipídica).

3.b) Detecção da presença do marcador eNOS por imunohistoquímica

Já nos grupos de 21 dias, com neointima, observamos uma redução significativa no número de células marcadas nos grupos sedentário (67,12%), exercitado 21 dias após a lesão (42,46%) e exercitado 2 semanas antes da lesão (57,54%) quando comparado ao grupo HFD sem lesão (p=0,0079). Ao compararmos os grupos lesionados exercitados com os animais sedentários, verificamos um aumento significativo na marcação para eNOS em todos eles, seja

antes, após ou antes e após a lesão arterial, sendo que nos animais exercitados antes e após, esse aumento levou à uma recuperação da atividade da enzima de tal forma que não diferiu significativamente ($p=0,0952$) do grupo sem lesão (Figuras 50 e 51).

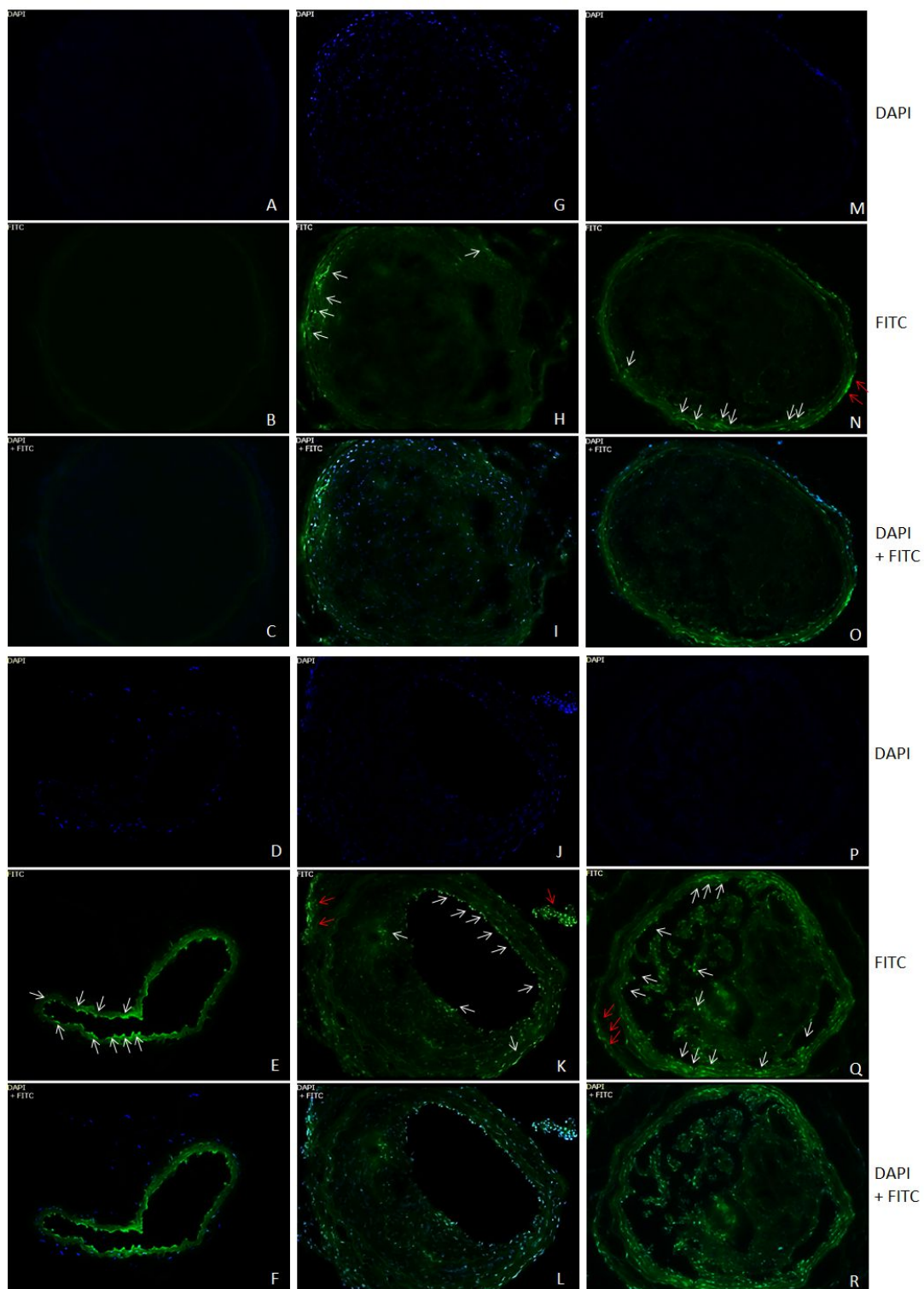


Figura 50. Artéria carótida de camundongos LDLr^{-/-} marcada pela técnica de imunohistoquímica para eNOS. (A-C) Branco, (D-F) HFD sedentário sem lesão, (G-I) Sedentário com lesão + 21 dias, (J-L) Lesão + Exercício 21 dias, (M-O) Exercício + lesão + 21 dias e (P-R) Exercício + lesão + exercício 21 dias. Setas brancas indicam células marcadas na artéria carótida e setas vermelhas indicam células marcadas na camada adventícia.

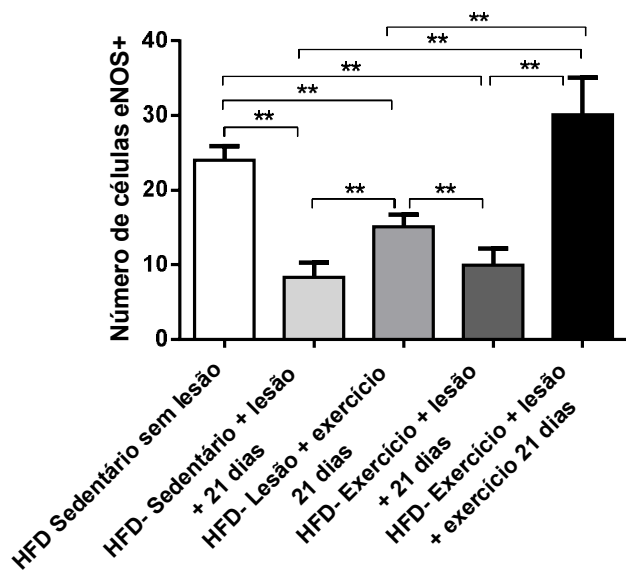


Figura 51. Número de células eNOS⁺ de camundongos LDLr^{-/-} comparando os grupos HFD sedentário sem lesão e grupos de 21 dias, n=5, 3 cortes por lâmina (HFD- dieta hiperlipídica, **p<0,01).

3.c) Zimografia *in situ*

No caso dos grupos de 21 dias com neointima, observou-se um aumento significativo na atividade das gelatinases no grupo com exercício pós lesão trombótica (94,9%-p=0,0159) e com exercício antes e após a lesão (101,5%- p=0,0079) com relação aos animais sedentários. Além disso, houve um aumento também significativo dessa atividade nesses mesmos grupos com relação ao grupo exercitado somente antes da lesão arterial, sendo este aumento de 56,8% (p=0,0159) no grupo com exercício após a injúria e de 62,2% (p=0,0079) no exercitado antes e após. (Figuras 52 e 53).

Não se observou diferença significativa entre o grupo de 21 dias sedentário e com exercício somente antes da lesão (p=0,8016), assim como entre o grupo com exercício após a lesão e exercitado antes e após esta (p=0,4127). Ainda, nota-se que a atividade das gelatinases é maior quanto menor a área de neointima, ocorrendo predominantemente nas lâminas elásticas da artéria carótida.

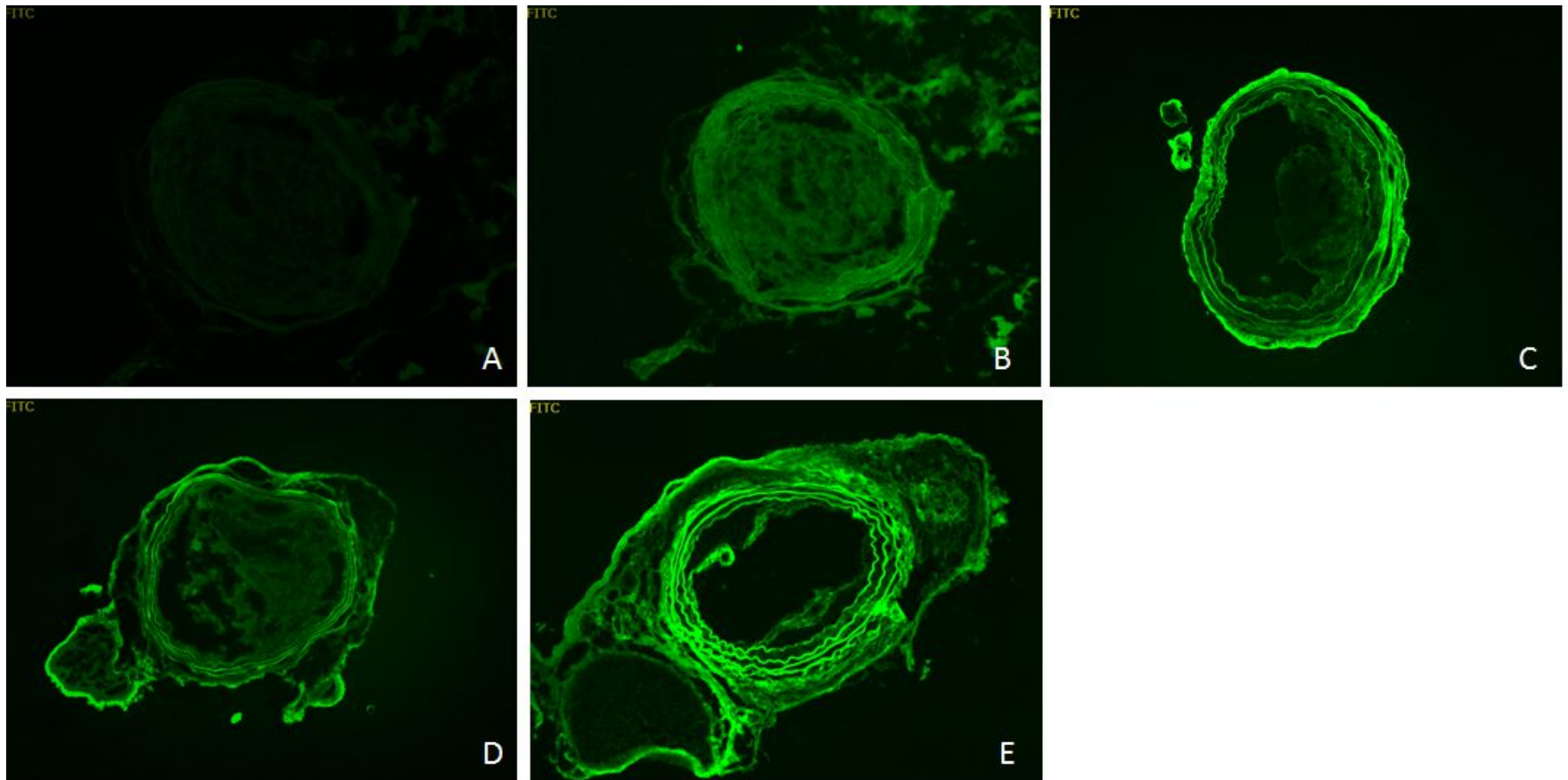


Figura 52. Zimografia *in situ* da artéria carótida nos grupos de 21 dias (A- Branco, B- Sedentário + lesão + 21 dias, C- Lesão + exercício 21 dias, D- Exercício + lesão + 21 dias e E- Exercício + lesão + exercício 21 dias), n=5, 3 cortes por lâmina.

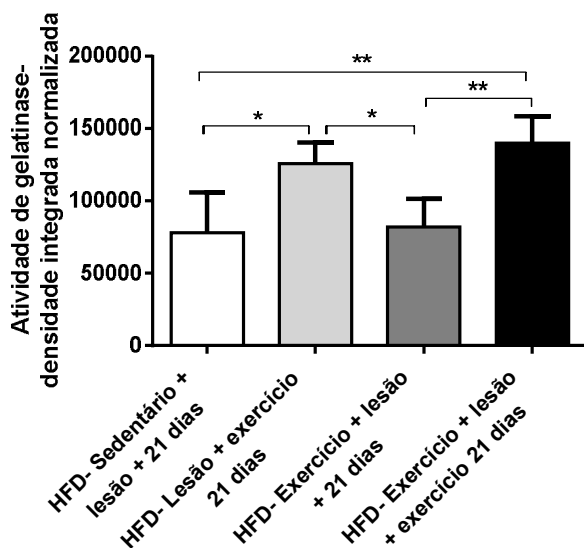


Figura 53. Atividade das gelatinases na artéria carótida dos grupos de 21 dias, n=5, 3 cortes por lâmina (HFD- dieta hiperlipídica, *p<0,05, **p<0,01).

Reunindo os dados obtidos com os grupos HFD sem lesão, lesionados tempo zero e 21 dias, todos sedentários, observou-se que a atividade das MMPs aumenta significativamente somente no grupo com neointima, tanto com relação ao grupo sem lesão trombótica (151,2%-p=0,0159), quanto ao grupo tempo zero (106,6%- p=0,0317) (Figura 54), o que já era esperado devido ao que já se tem em literatura [65, 66].

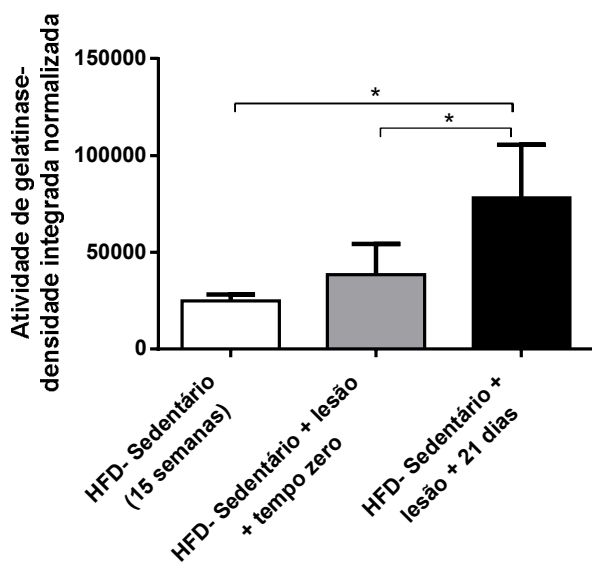


Figura 54. Atividade das gelatinases na artéria carótida nos grupos sem lesão sedentário e lesionados tempo zero e 21 dias, n=5, 3 cortes por lâmina (HFD- dieta hiperlipídica, *p<0,05).

3.d) Zimografia em gel

Quanto aos grupos de 21 dias, ou seja, com neointima, os valores obtidos para a intensidade de bandas para MMP-2 foram semelhantes entre si, variando apenas de 36825,48 para 47251,49. Já para MMP9, observamos um aumento de 1,72 e 1,86 vezes nos grupos exercitados somente após a lesão e exercitados antes e após a lesão, respectivamente (Figuras 55 e 56).

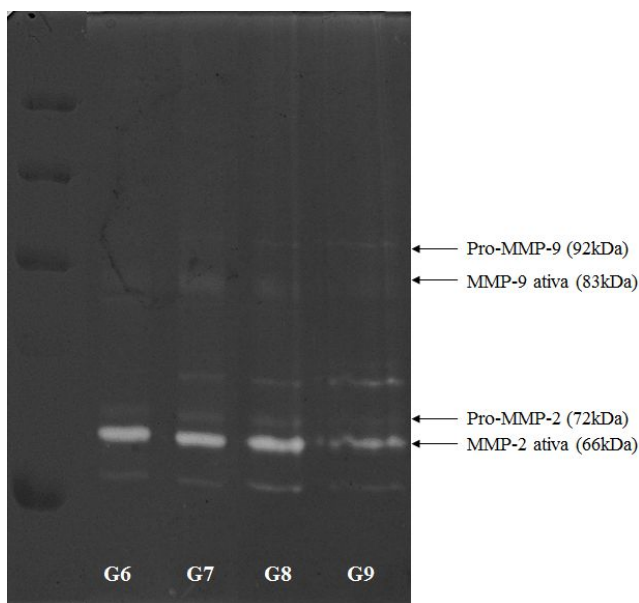


Figura 55. Zimografia em gel para MMP-2 e MMP-9 de artéria carótida dos grupos de 21 dias (G6- Sedentário + lesão + 21 dias, G7- Lesão + exercício 21 dias, G8- Exercício + lesão + 21 dias e G9- Exercício + lesão + exercício 21 dias), n=1 (pool de 3-5 carótidas).

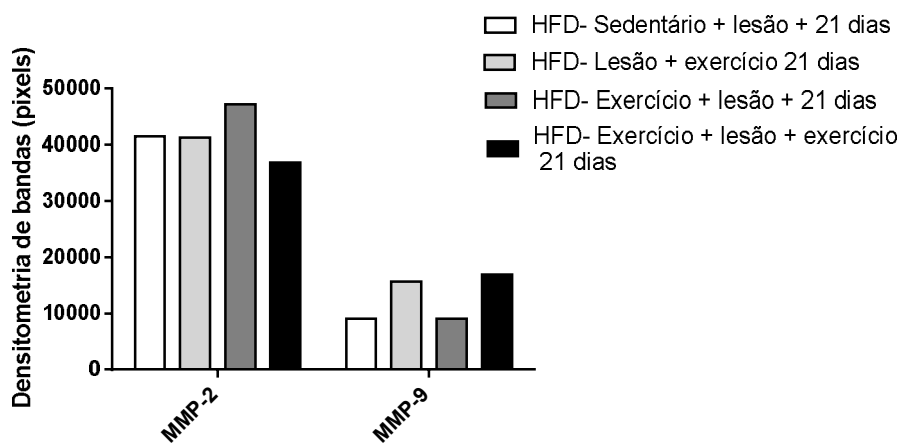


Figura 56. Análise da zimografia em gel por densitometria de bandas no programa ImageJ, em pixels, para MMP-2 e MMP-9 nos grupos de 21 dias.

Combinando os resultados dos grupos lesionados tempo zero e de 21 dias, pudemos observar que, no geral, houve um aumento de MMP-2 e uma redução da MMP-9, corroborando com o que já existe em literatura a respeito devido a função de cada uma dessas enzimas no remodelamento vascular e formação de neoíntima (Figura 57).

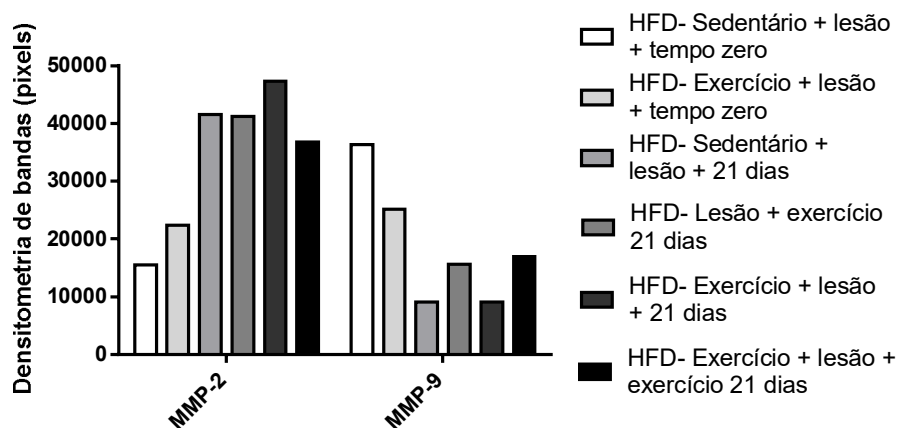


Figura 57. Análise combinada da zimografia em gel dos grupos lesionados tempo zero e 21 dias, por densitometria de bandas no programa ImageJ para MMP-2 e MMP-9.

DISCUSSÃO

A prática de exercício físico de forma regular é extremamente recomendada, sendo que sua intensidade varia de acordo com idade e estilo de vida, possuindo diversos efeitos benéficos à saúde, como perda de peso, melhora da pressão arterial, além de efeitos cardioprotetores na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares. Essas doenças, segundo a OMS, são a principal causa de morte no mundo e acometem uma grande parcela da população, estando relacionada a diversos fatores de risco, como tabagismo, diabetes mellitus, sedentarismo, má alimentação, entre outros.

Este trabalho buscou verificar a importância do exercício físico na trombose e inflamação em camundongos ateroscleróticos alimentados com dieta hiperlipídica, mimetizando indivíduos com mal hábitos alimentares com maior propensão ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Foram avaliadas diversas moléculas e fatores que poderiam ser influenciados nesse processo, a fim de tentar identificar os mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos dessa atividade, já descritos em literatura. Para tanto, foi utilizado um protocolo de exercício antes da lesão arterial para indução da trombose, como prevenção da mesma, e/ou após a lesão, como tratamento dessa doença.

Tratando-se de exercício físico, é importante identificar a intensidade do protocolo utilizado, a fim de comparação com outros estudos e, para isso, foi realizado o teste do VO_2 máx em que, além dos valores de VO_2 , são obtidos a velocidade máxima, distância total percorrida durante o procedimento e tempo de exaustão, sendo possível a partir disso analisar a capacidade física dos animais. Quanto aos 3 últimos parâmetros, o protocolo utilizado de 2 e 5 semanas foi capaz de aumentá-los significativamente quando comparou-se com os respectivos grupos de mesma idade, indicando que houve uma melhora na capacidade física dos camundongos, o que já foi visto em outros trabalhos [67], mesmo com a ingestão de uma dieta hiperlipídica, que é prejudicial à saúde. Porém, ocorreu uma redução significativa nesses valores no grupo HFD sedentário de 15 semanas quando comparado ao de 12 semanas, o que pode estar relacionado ao peso corporal dos animais devido à dieta [68], entre outros fatores.

Com relação aos valores de VO_2 máx no teste, o protocolo de exercício físico de 2 semanas não alterou significativamente esses números, porém com o de 5 semanas observou-se um aumento no VO_2 máx, o que indicaria uma adaptação à atividade realizada, além de uma melhora na capacidade aeróbica dos camundongos. Vale ressaltar que fatores como envelhecimento, qualidade de vida [69] e peso corporal dos animais [68] podem influenciar nesses valores.

Alterações nos valores de VO_2 máx (capacidade aeróbica) dependem de inúmeros fatores, como intensidade do exercício, frequência das sessões e a duração de cada uma delas. Estudos já mostraram que a intensidade do exercício que tem obtido melhores resultados equivale a 90-100% de VO_2 máx, sendo que com valores a partir de 50% já se observam benefícios, no entanto, valores maiores que 100% são menos efetivos por causarem fadiga e reduzirem o volume de treinamento. Ainda, treinos com duração superiores à 35 minutos tem um efeito maior no VO_2 máx do que por tempo menor [70].

Já se sabe também que exercício físico de intensidade moderada tem inúmeros benefícios cardioprotetores, porém exercícios intensos/vigorosos (se realizados de forma cautelosa e sob orientação) tem gerado mais vantagens, principalmente por melhorar a capacidade física e reduzir os riscos de doenças cardíacas [71].

Nesse trabalho, os nossos resultados mostraram que utilizamos um protocolo de exercício físico de alta intensidade, ou seja, na velocidade estabelecida (12m/min) os camundongos atingiram valores de VO_2 superiores a 75% do VO_2 máx, chegando até a 85%,

sendo que considera-se como intensidade moderada de 60-75% do VO_2 máx e valores superiores como intensidade elevada [61, 62].

Porém, de acordo com o Colégio Americano da Medicina do Esporte (ACSM), o melhor método para determinar o tipo e a intensidade do exercício físico são as porcentagens de VO_2R (diferença entre VO_2 máx e VO_2 de repouso) e HRR (frequência cardíaca máxima), sendo que esses valores se equivalem quando comparados, enquanto que o valor de VO_2 máx não se equivale a esses. A % VO_2R ou %HRR é utilizada para determinar o exercício físico como leve, moderado, intenso, de resistência, entre outros e, através disso, analisar se esse exercício é capaz de aumentar o valor de VO_2 máx, o que indicaria uma adaptação do organismo [72].

Sabendo-se disso, fomos verificar se esse protocolo estaria atuando de forma benéfica nos camundongos. Já se sabe que o exercício físico auxilia na manutenção e/ou redução do peso corporal, o que é observado no nosso dia-a-dia, seja pela academia, corrida, natação e em modelos animais também [73, 74]. Então, analisamos esse parâmetro e observamos que o protocolo de exercício físico de duas semanas não foi suficiente para diminuir significativamente o peso corporal dos animais ateroscleróticos, mas esse valor reduziu significativamente com o exercício de 5 semanas quando comparado ao grupo de mesma idade. Como esperado, obteve-se um aumento significativo nos animais sedentários de 15 semanas, quando comparado aos de 12 semanas, devido ao maior tempo de alimentação. A partir disso, pode-se dizer que a prática de exercício físico é capaz de manter ou reduzir o peso corporal dos animais, dependendo da sua duração e da intensidade, enquanto que quando sedentários esse valor aumenta.

Quando se trata do perfil de lipídeos (colesterol total e triglicerídeos) desses animais, observamos um aumento significativo nos valores de ambos nos animais alimentados com dieta hiperlipídica quando comparado ao grupo alimentado com dieta normal. No total, os animais foram alimentados com a dieta por 9 semanas (da 6^a à 15^a semana). Esse aumento ocorre porque esses camundongos não conseguem metabolizar moléculas de lipoproteínas de baixa densidade e, quando expostos a uma dieta rica em lipídios, tem os níveis de triglicerídeos e colesterol aumentados, mas com uma dieta normal estes animais não apresentam alterações nestes níveis. Esse fato já é descrito em literatura, sendo que o outro modelo animal de aterosclerose (ApoE^{-/-}) desenvolve a doença espontaneamente e tem níveis elevados de lipídeos mesmo alimentado com dieta normal [17].

Os valores obtidos nesse trabalho para o colesterol total dos animais LDLr-/- alimentados com dieta normal equivalem ao que foi visto em outros artigos, ou seja, na faixa de $274,45 \pm 10,96$ mg/dL [21] em literatura para uma média de 249,6 mg/dL nesse estudo. No entanto, para o grupo de animais LDLr-/- HFD, houve uma divergência quanto a outros trabalhos, sendo que observamos uma média de valores de 648,2 mg/dL e em literatura de 1503,12 até $1846,11 \pm 116$ mg/dL [21, 22]. Quanto aos valores de triglicérides, a média de valores do grupo HFD foi 160,4 mg/dL, semelhante ao que foi encontrado em outro estudo, na faixa de $141,25 \pm 18,21$ mg/dL. Vale enfatizar que o colesterol presente na dieta é de extrema importância para que haja um aumento no perfil de lipídeos e a presença de placas ateroscleróticas na raiz da artéria aorta, visto que a aterosclerose se desenvolve de forma mais lenta na ausência desse componente na dieta [56].

Observamos também uma redução significativa nos níveis de colesterol no grupo HFD exercitado 5 semanas, enquanto que de triglicerídeos essa redução não foi significativa. Em literatura, alguns trabalhos mostram que, tanto com camundongos LDLr-/-, quanto ApoE-/-, apesar de uma redução da área das placas ateroscleróticas, existem contradições quanto aos níveis de lipídeos nos animais exercitados, principalmente devido ao protocolo utilizado em cada um deles. Isso nos leva a crer que esses dois fatores (exercício e perfil de lipídeos) devem ser independentes e ainda busca-se entender o mecanismo envolvido nesse processo [22, 25, 75, 76].

Em um trabalho realizado com camundongos LDLr-/-, submetidos a exercício físico em esteira por 6 ou 12 semanas a 15min/min durante 30 minutos e 5 vezes por semana, ou por 8 dias consecutivos na mesma velocidade e tempo, observou-se uma redução de 15% do colesterol total dos animais e 40% das lesões ateroscleróticas na artéria aorta. A ausência da via do receptor do LDL nesses animais leva a crer que outros processos possam estar envolvidos e sugere-se que haja um aumento na atividade da mieloperoxidase plasmática. Já foi demonstrado *in vitro* que essa enzima atua oxidando moléculas de LDL e, durante o exercício físico, ocorre uma indução ao estresse oxidativo que poderia promover a oxidação dessas moléculas circulantes e consequente remoção/liberação delas pelo fígado [21].

Para fim de comparação, também foi medido o colesterol total e triglicerídeos de animais selvagens C57Bl/6J alimentados com dieta hiperlipídica para analisar se nesses camundongos haveria um aumento nesses níveis devido a dieta, já que em literatura existe uma divergência quanto a esse fato. Alguns estudos mostram que esses camundongos podem ser

utilizados também como modelos para aterosclerose, já que tem esse perfil de lipídeos alterado quando comparado aos animais alimentados com dieta normal [77]. Porém, outros relatam que não há diferença significativa nesses valores com dieta hiperlipídica ou normal, apesar da presença de lesões ateroscleróticas na artéria aorta [78]. Os resultados obtidos corroboram com estes últimos, em que os níveis de colesterol total e triglicerídeos foram significativamente menores em relação aos camundongos LDLr^{-/-} HFD e, por isso, foi utilizado somente como referência para evidenciar as características do modelo de estudo da aterosclerose.

Ainda com relação à aterosclerose, sabe-se que essa doença se caracteriza pela deposição de lipídeos nos vasos sanguíneos, podendo formar placas de gordura dependendo do estágio da doença. A fim de analisar essas placas e o efeito do exercício físico sobre elas, foi feita uma análise histológica da raiz da artéria aorta dos camundongos LDLr^{-/-} e também dos C57Bl/6J, sendo que houve um aumento significativo na área dessas lesões no grupo LDLr^{-/-} HFD quando comparado ao C57Bl/6J HFD e também ao LDLr^{-/-} alimentado com dieta normal, indicando a importância da dieta e do fator genético no desenvolvimento da aterosclerose. Além disso, observou-se uma redução significativa nessa deposição de lipídeos nos animais HFD exercitados 2 semanas e 5 semanas, mas não houve diferença entre estes grupos exercitados.

Esses resultados podem ser justificados a partir de trabalhos já publicados mostrando que em camundongos jovens (6-8 semanas), as placas ateroscleróticas são mais observadas no sinus aórtico (acima da valva aórtica) e a distribuição e tamanho dessas lesões aumenta com o decorrer da idade dos animais, sendo que em animais idosos (acima de 18 semanas) é possível visualizar placas no decorrer de toda artéria aorta, assim como na artéria carótida e ilíaca [16, 17].

Com relação ao exercício físico na redução da aterosclerose, outros estudos também mostram que essa atividade é capaz de diminuir significativamente o tamanho dessas lesões, sendo que nesses casos os animais foram alimentados por um período mais prolongado (16 semanas a 3 meses) e foram realizados em camundongos ApoE^{-/-}, que tendem a desenvolver a doença em estágios mais avançados [30, 53]. Em outro trabalho não foi verificada uma redução das placas ateroscleróticas em camundongos ApoE^{-/-} alimentados por 4 meses e meio [79], indicando que o tipo e a duração da atividade física também podem influenciar nesse processo, assim como o estágio de desenvolvimento das lesões [26].

No intuito de entender melhor essa doença, pesquisadores estão em busca dos mecanismos envolvidos na estabilização ou na redução das placas ateroscleróticas devido ao

exercício físico. Em um trabalho realizado com camundongos LDLr^{-/-}, utilizou-se atividade aeróbica por 4 semanas e verificou-se que existe um efeito protetor ao prevenir uma disfunção endotelial através de uma maior disponibilidade de óxido nítrico (NO) e aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase na aorta dos animais [80].

A participação do óxido nítrico através da expressão de eNOS também foi vista em outro estudo, no qual os camundongos ApoE^{-/-} foram submetidos à natação 5 vezes por semana por 8 semanas e em um grupo foram suplementados com L-NAME, um inibidor da enzima óxido nítrico sintase. O efeito benéfico dessa atividade em diminuir a extensão das placas ateroscleróticas não foi observado nos animais com L-NAME, indicando o envolvimento do NO nesse processo [81]. Outro trabalho obteve que o exercício físico aeróbico aumentou a expressão da proteína adiponectina, que é um hormônio produzido no tecido adiposo, e consequente redução da proteína NF- κ B na artéria aorta, indicando outro possível mecanismo que pode estar atuando nesse processo [82].

Já foi observado também o envolvimento dos receptores peroxissomais ativados por proliferação, PPAR- γ , sendo que os camundongos ApoE^{-/-} foram submetidos a 3 meses de natação intensa 5 vezes por semana e observou-se um aumento na expressão vascular desse receptor nos grupos exercitados, assim como a presença dele nas placas ateroscleróticas. A expressão do PPAR- γ foi vista como inversamente proporcional ao tamanho da lesão e, quando esses animais foram suplementados com BADGE, um antagonista dessa molécula, o efeito benéfico do exercício não foi observado, indicando um potencial papel desse receptor no efeito protetor da atividade física [30, 83].

Em estágios avançados a aterosclerose pode levar a outras doenças cardiovasculares e isso ocorre devido à ruptura das placas presentes nos vasos sanguíneos, principalmente em decorrência da redução de células musculares lisas e apoptose das células espumosas, o que leva a liberação e ativação das metaloproteinases, degradando a capa fibrosa ao redor dessas placas, que se tornam vulneráveis à ruptura. Quando isso ocorre, o vaso sanguíneo se torna mais susceptível à formação de trombo, visto que ocorre a exposição do fator tecidual e ativação da trombina da cascata de coagulação, com posterior recrutamento de plaquetas no trombo em crescimento [84].

Em modelos animais, a ruptura de placas ateroscleróticas já foi observada em camundongos ApoE^{-/-}, que foram alimentados por 46 \pm 3 semanas, levando a um estágio avançado da aterosclerose seguido de formação de trombo na artéria braquioencefálica [11].

Diante disso, animais com aterosclerose são mais propensos a desenvolver trombose, o que nos levou a utilizar esse modelo animal nesse trabalho, visto que já se estuda em nosso laboratório a formação de trombo em camundongos selvagens C57Bl/6 e o efeito do exercício físico nesse caso.

Em literatura, existem poucos estudos que relacionam a trombose com o exercício físico, seja na prevenção, ou no tratamento dessa doença. Já existem diversos modelos de estudo da trombose e escolhemos a lesão química, na qual utilizamos papel filtro embebido em solução de cloreto férrico 15%, colocado sobre a artéria carótida por 2 minutos. Após esse tempo, utilizamos uma sonda de ultrassom para medir o fluxo sanguíneo do vaso, a fim de analisar o tempo de obstrução, ou seja, o tempo que o trombo leva para ser formado. Esse método é de fácil reprodução, já estabelecido em literatura [43], testado e realizado com frequência em nosso laboratório [85]. Vimos que o exercício físico realizado antes da injúria foi capaz de aumentar significativamente esse tempo com relação aos animais sedentários, ou seja, retardou a formação do trombo arterial. Em camundongos selvagens, o aumento nesse tempo também é significativo e de 83% (obtidos em nosso laboratório).

Nos diferentes grupos desse trabalho, fizemos a análise histológica da artéria carótida, verificando-se o tamanho do trombo, neoíntima e área da túnica média desse vaso, comparando-se os animais exercitados e sedentários. A espessura da túnica média não alterou de forma significativa em nenhum dos grupos analisados.

Nos grupos tempo zero, ou seja, sacrificados uma hora após a lesão arterial, o exercício preventivo de 2 semanas reduziu de forma significativa a formação do trombo em relação ao grupo sedentário, indicando que a atividade física realizada de forma regular é capaz de retardar e reduzir a formação do trombo, de forma que pode ser considerado mais um aspecto positivo do exercício, já que não existe dado em literatura sobre o assunto em modelo animal.

Com relação ao exercício físico e a formação de neoíntima, observamos uma redução significativa da área desta no grupo exercitado apenas após a lesão arterial e nos animais com exercício antes e após a lesão, quando comparado ao grupo sedentário. Nota-se que os efeitos benéficos das 2 semanas de atividade física antes da lesão no tempo zero não se mantiveram 21 dias após a lesão, em que a área de neoíntima não difere significativamente do grupo sem exercício, mostrando que o exercício físico deve ser praticado de forma regular e por períodos maiores (sempre sob orientação médica), a fim de que o organismo obtenha resultados positivos a longo prazo, assim como recomenda a OMS.

Outros estudos com exercícios físicos já obtiveram resultados positivos no que se refere à neointima. Em um deles, os camundongos ApoE^{-/-} foram submetidos ao protocolo de treinamento antes e após a lesão arterial, também por cloreto férrico, a uma velocidade de 15m/min, 5 dias por semana, 60 minutos por dia com 2 minutos de intervalo a cada 15 minutos, sendo 3 semanas antes da lesão e 3 semanas após. Eles obtiveram uma redução significativa na área de neointima nos animais exercitados, assim como uma redução na relação túnica íntima/média (túnica média também não diferiu entre grupos) [86], o que se assemelha ao obtido em nosso trabalho.

Além deste, Laufs *et al.* também analisaram a influência do exercício físico na neointima e participação das células progenitoras endoteliais (CPEs). Eles utilizaram camundongos C57Bl/6J, que foram submetidos a exercício em esteira por 3 semanas a 12m/min, 5 dias por semana e sacrificados 14 dias após a lesão na artéria carótida. Foi observada uma redução na formação de neointima, aumento de CPEs e participação do óxido nítrico nesse processo. Nesse caso, essas células estariam envolvidas no reparo vascular e reendotelização após a injúria endotelial, sendo recrutadas devido a uma maior biodisponibilidade de NO em decorrência da atividade física [2].

Diante disso, analisamos a ocorrência dessas células progenitoras no vaso lesionado de animais sedentários e exercitados tempo zero através da técnica de imunohistoquímica utilizando o marcador CD34, que é um dos marcadores para identificar CPEs [87, 88], e observamos que o protocolo de exercício desse trabalho levou a um aumento significativo na quantidade dessas células. Análises por citometria de fluxo realizadas em nosso laboratório com camundongos selvagens C57Bl/6J também indicam um aumento no número de CPEs circulantes nos animais exercitados. Esses resultados corroboram com o que foi discutido anteriormente, em que essas células estariam contribuindo com o reparo vascular e reendotelização, sendo incorporadas aos locais de angiogênese ativa e contribuindo para a formação de vasos sanguíneos [2].

Ainda, é importante ressaltar que a marcação para CPEs não foi realizada nos grupos com neointima devido à existência de diversos trabalhos que já mostraram a importância dessas células no processo inicial de reendotelização, onde estas células são recrutadas para auxiliar no remodelamento endotelial, evitando a formação da camada de células musculares lisas [2, 89, 90]. Também já foi visto que a atividade física leva a um aumento no número de células progenitoras endoteliais circulantes, sendo que esse efeito ocorre rapidamente e é

mantido por pelo menos 4 semanas, indicando a importância dessas células na saúde cardiovascular [2].

Além disso, utilizamos da técnica de imunohistoquímica para identificar outros possíveis tipos celulares e moléculas presentes no trombo, neointima e nas lâminas elásticas da artéria carótida, como ICAM para molécula de adesão, LY6G para células inflamatórias (neutrófilos/macrófagos) e CD31 para células endoteliais. No caso do ICAM, encontrou-se uma maior expressão no endotélio da artéria dos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica com relação aos alimentados com dieta normal, já que se trata de uma molécula relacionada ao processo inflamatório, participando da adesão de linfócitos, monócitos e neutrófilos ao endotélio vascular durante o desenvolvimento da aterosclerose [10]. A expressão de ICAM foi reduzida no grupo de animais HFD exercitados 5 semanas, o que também era esperado, já que se sabe do papel anti-inflamatório dessa atividade [91].

Na marcação para LY6G, o exercício físico de duas semanas antes da lesão foi capaz de reduzir a presença dessas células em relação ao grupo sedentário, sendo que a ocorrência delas no lúmen e no endotélio do vaso sanguíneo indica um processo inflamatório devido à aterosclerose e à lesão endotelial e a redução em sua quantidade indica o papel anti-inflamatório do exercício físico, já descrito em literatura [91].

Na marcação para células endoteliais observamos uma redução no número dessas células nos grupos lesionados tempo zero, tanto sedentário, quanto exercitado, comparado aos animais HFD sem lesão, o que era esperado visto que já é descrito que a trombose reduz a expressão de CD31 devido ao dano provocado no endotélio [92]. Quanto ao efeito do exercício físico, houve um aumento nas células marcadas no grupo exercitado com lesão quando comparado ao lesionado sedentário, indicando que essa atividade auxilia na recuperação do endotélio lesionado. Um aumento na expressão de CD31 devido à atividade física já foi descrito em outro trabalho, porém em casos de isquemia e função neuronal [93].

Devido à importância do óxido nítrico (NO) no tônus vascular e na função plaquetária [94], analisamos também por imunohistoquímica uma das enzimas responsáveis por sua produção e biodisponibilidade, a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Observamos que, quando comparado ao grupo HFD sedentário sem lesão, há uma redução significativa na marcação para essa enzima nos animais lesionados tempo zero, seja sedentário ou exercitado, porém o exercício físico é capaz de recuperar parte da atividade dessa enzima. Com relação aos grupos com neointima, de 21 dias, verificamos que somente nos grupos exercitados após, e

antes e após a lesão existe um aumento significativo na presença de eNOS comparando aos animais sedentários, sendo que nos animais com exercício antes e após esse aumento recupera a atividade da enzima de tal forma que não difere significativamente do grupo não lesionado.

Resultados semelhantes já foram observados em outros artigos com relação à neoíntima. Em um deles, a injúria à artéria carótida em ratos Wistar foi realizada através do balão de angioplastia e a natação como exercício físico, sendo que observaram um aumento na expressão e na atividade de eNOS na parede arterial dos animais exercitados, além de inibir a hiperplasia da neoíntima, acelerando um processo de reendotelização [95], o que também foi observado em nosso trabalho.

Em outro estudo, com camundongos separados isoladamente em gaiolas para corrida voluntária em esteira, verificou-se um aumento na mRNA da enzima eNOS nos animais exercitados [2]. Essa mesma resposta foi observada com outro tipo de exercício físico, o agudo, feito uma única vez até a exaustão do animal, sendo que foi visto uma ativação de eNOS através da fosforilação no resíduo de Serina 1177, além da ativação da enzima AMPK via fosforilação do resíduo de Treonina 172, estando essas moléculas intimamente relacionadas. Vale lembrar que a AMPK é uma enzima sensível ao estresse e pode ser ativada devido ao “shear stress” (uma das consequências do exercício físico por causa do aumento do fluxo sanguíneo), estresse oxidativo e agentes farmacológicos [96].

Foi demonstrado em um trabalho com camundongos knockout para eNOS que o NO está diretamente relacionado a efeitos anti-trombóticos nas plaquetas, assim como eNOS é responsável por modificar a componentes vasculares em resposta a estímulos trombóticos [94]. Sendo assim, deve-se pensar na possibilidade do uso dessa enzima como alvo terapêutico em doenças das funções plaquetárias e vasculares.

Outras moléculas importantes analisadas foram as metaloproteinases (MMPs), que, como já foi escrito anteriormente, atuam na degradação de componentes da matriz extracelular em vasos sanguíneos saudáveis e injuriados, podendo atuar, no caso desse estudo, na instabilidade de placas ateroscleróticas, assim como para o remodelamento vascular na resolução do trombo e formação de neoíntima [97, 98]. Além disso, estudos já mostraram que o exercício físico é capaz de aumentar a quantidade dessas enzimas em fibras do músculo esquelético em ratos [99] e em humanos [100], levando-nos a analisar através do ensaio de zimografia *in situ* se as MMPs (gelatinases) tem maior atividade nos grupos exercitados. Sua atividade também foi medida na raiz da aorta, já que essas enzimas tem importante papel na

instabilidade das placas ateroscleróticas [9] e estudos já mostraram que macrófagos derivados de células espumosas produzem grande quantidade de MMPs [51].

Devido à ausência de estudos em literatura sobre a atividade das MMPs em artérias e sua relação com o exercício físico, analisamos inicialmente os grupos sem lesão sedentário e exercitado 5 semanas. Verificamos que existe uma expressão basal dessas enzimas nos animais HFD sem lesão e sedentários, como já é descrito [65], porém o protocolo de exercício utilizado foi capaz de aumentar significativamente em 278% a atividade das gelatinases. Não foi realizada zimografia em gel dos grupos não lesionados.

Uma justificativa para esse aumento é que uma das respostas metabólicas da atividade física é a vasodilatação devido ao aumento da circulação sanguínea, o que gera um aumento no estresse mecânico devido ao fluxo sanguíneo, ocasionando uma maior expressão de eNOS, o que também foi verificado nesse trabalho. Com isso, ocorre um aumento de óxido nítrico e de VEGF, que levam a ativação e aumento da expressão de MMP-2 e MMP-9 e todas essas moléculas levam a mobilização de CPEs para a circulação, contribuindo para o reparo vascular e reendotelização [3, 101, 102]. Além disso, as MMPs são capazes de gerar peptídeos vasoativos de diversos substratos, como endotelina-1 e possuem propriedades vasodilatadoras nas células musculares vasculares através da inibição dos mecanismos de entrada de Ca^{2+} , o que está diretamente relacionado ao exercício físico [103].

Ainda com relação às MMPs, analisamos também os grupos tempo zero com trombo, onde observamos um aumento significativo na atividade das gelatinases nos animais exercitados 2 semanas antes da lesão arterial, quando comparado ao mesmo grupo sedentário. Isso pode ser explicado devido à atividade dessas MMPs na degradação de matriz extracelular e de seus componentes [49], o que poderia auxiliar na resolução do trombo, e também devido às propriedades vasodilatadoras dessas enzimas e do exercício, como já explicado. Porém não foram encontrados artigos que relacionem de forma direta a prática de atividade física na trombose e aumento ou redução das MMPs.

Os grupos com neointima foram analisados da mesma forma, nos quais se observou um aumento significativo na atividade das MMPs nos grupos exercitados somente após a lesão arterial e exercitados antes e após esta, quando comparado ao grupo sedentário lesionado e aos animais submetidos ao exercício somente antes da lesão. Esses resultados podem indicar, principalmente no que diz respeito ao grupo exercitado 2 semanas antes da lesão e sacrificados

21 dias após esta, que os efeitos benéficos da atividade física por esse período, observados nos animais de tempo zero, não se mantêm por estas 3 semanas após a injúria.

Em literatura, pouco se tem a respeito da relação entre neointima, exercício físico e atividade de metaloproteinases. Alguns estudos mostram que artérias saudáveis, ou seja, não lesionadas, expressam constitutivamente metaloproteinases [65], mas essa expressão é aumentada em vasos lesionados, principalmente na formação de neointima, já que células musculares lisas caracterizam-se pela expressão dessas enzimas [65, 66], o que também foi observado no nosso trabalho.

Além disso, estudos realizados em ratos utilizando lesão mecânica e administração intravenosa de adenovírus contendo TIMP-1, que é um inibidor de MMPs, observando-se uma redução de 40% na formação de neointima 16 dias após a lesão [104], indicando que a proteólise mediada por essas enzimas promove o remodelamento vascular e migração de células musculares lisas após injúria arterial [105].

Observamos também que a atividade das metaloproteinases na artéria carótida ocorreu predominantemente nas lâminas elásticas, o que pode ser explicado devido à participação dessas enzimas no remodelamento vascular e expansão arterial quando ocorre um aumento no fluxo sanguíneo [106]. Esse aumento, que pode ser ocasionado por diversos fatores, entre eles o exercício físico, leva a um estresse mecânico na parede da artéria, ocasionando a ativação da enzima eNOS e produção de óxido nítrico (NO) [3]. Este NO está diretamente relacionado com a ativação de pro-MMPs, levando a um aumento na atividade dessas moléculas nas lâminas elásticas presentes na parede arterial, que irão atuar no remodelamento deste vaso, assim como no aumento de sua área para suportar esse fluxo sanguíneo [3, 107]. No caso desse trabalho, a lesão arterial por si só já provoca um aumento significativo na atividade das gelatinases.

As MMPs também atuam no desenvolvimento e instabilidade de placas ateroscleróticas [9] e, por isso, analisamos sua atividade na raiz da aorta e o efeito do exercício físico. Nesse caso, observamos que a atividade física por 5 semanas foi capaz de reduzir a atividade dessas gelatinases quando comparado ao grupo sedentário, o que poderia estar relacionado com uma maior estabilidade das placas devido ao exercício, sendo que este mesmo resultado já foi visto em outros estudos.

Em um trabalho em que se utilizou camundongos ApoE^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica e exercício físico em esteira por 6 semanas, 5 dias/semana e 60 minutos/dia com 2 minutos de intervalo, foi observado que nos grupos de animais exercitados houve uma redução significativa na marcação para MMP-3 e MMP-8 no arco aórtico, o que permitiu maior estabilização das placas ateroscleróticas [108]. Ainda, em outro estudo, também com camundongos ApoE^{-/-}, dieta hiperlipídica e exercício em esteira, obteve-se uma atenuação na imunoreatividade para MMP-9 em artéria aorta [54].

Para confirmar os resultados da zimografia *in situ*, realizamos também o ensaio da zimografia em gel, no qual podemos identificar diferentes tipos de metaloproteinases através do seu peso molecular [109]. Analisamos duas diferentes gelatinases, a MMP-2 e MMP-9. A MMP-2, ou gelatinase-A [110], possui sua forma latente, cujo peso molecular é de 72kDa e sua forma ativa, com 66kDa [64]. Ela está diretamente relacionada com agregação de plaquetas quando há um estresse devido a um aumento no fluxo sanguíneo [111] e, também, com a formação de trombo *in vivo*. Estudos feitos com animais MMP2^{-/-} mostraram que eles possuem uma proteção contra o desenvolvimento da trombose devido a funções anormais das plaquetas na ausência de MMP-2 [112].

Além disso, outros trabalhos realizados *in vivo* também observaram a importância da MMP-2 na migração de células musculares lisas e proliferação da camada média para a íntima após lesão arterial [65]. Em outro estudo com animais knockout para MMP-2, houve uma redução na camada íntima da artéria carótida após lesão quando comparado ao animal selvagem, enquanto que houve um aumento na razão túnica íntima/média nos animais knockout, confirmando a participação dessa enzima na hiperplasia da camada íntima e na migração dessas células musculares [113]. Nesse estudo, observamos um aumento na atividade da MMP-2 no grupo exercitado tempo zero, enquanto que nos grupos com 21 dias, os valores da densitometria de bandas não diferiram de forma discrepante.

Os resultados obtidos nos grupos de tempo zero podem ser justificados que, com o exercício físico, existe um estresse maior devido ao aumento no fluxo sanguíneo na artéria e, com isso, existe uma maior atividade de MMP-2 no grupo exercitado, corroborando com o que se tem em literatura no que se refere à agregação de plaquetas [111]. Por outro lado, o aumento dessa enzima não é mantido 21 dias após a lesão, indicando que o exercício físico permitiu que houvesse uma menor migração das células musculares lisas e proliferação delas para a camada íntima [65, 113].

Já a MMP-9, ou gelatinase-B [110], também possui sua forma latente, com peso molecular de 92kDa e sua forma ativa, com 83kDa. Trabalhos já realizados *in vivo* mostraram que essa metaloproteinase está mais relacionada com a migração e proliferação de células musculares lisas para a camada média do vaso sanguíneo [65, 114], que caracteriza a neoíntima, além de um efeito benéfico na resolução do trombo por reduzir o enrijecimento da parede do vaso para o remodelamento vascular e modular o conteúdo de colágeno e macrófagos [66, 115]. Ainda, permitindo uma recuperação do endotélio lesionado através da compactação de colágeno em gel, montagem de colágeno fibrilar e acumulação deste, contribuindo no remodelamento do vaso [116].

Cho, A e M.A. utilizaram camundongos knockout para a MMP-9 e lesão mecânica com cateter inserido 3 vezes na artéria carótida e foi visto que nesses animais, 4 semanas após a lesão, não havia migração e proliferação de células da neoíntima, enquanto que nos animais selvagens o lúmen da artéria era reduzido devido à neoíntima. Isso indica a importância das MMPs, nesse caso a 9, na migração e proliferação dessas células para a formação da neoíntima [66].

Nesse trabalho, observamos uma redução na atividade da MMP-9 no grupo lesionado e exercitado tempo zero, em contrapartida com um aumento nos grupos de 21 dias exercitados somente após e antes e após a injúria. A redução nessa enzima nos animais de tempo zero pode estar relacionada com a ação dessa enzima em facilitar a migração de células musculares lisas para a camada média [114], sendo que o exercício tende a reduzir ou inibir esse processo [2, 86].

Com relação aos grupos com neoíntima, observamos maiores variações na atividade da MMP-9, sendo que o exercício físico realizado após a lesão e antes e após a lesão aumentou a atividade dessa enzima, o que poderia estar relacionado ao remodelamento vascular devido a uma perda do enrijecimento da parede do vaso sanguíneo por causa da organização das moléculas de colágeno da matriz extracelular, uma das funções da MMP-9 [115, 116]. Nesse caso, a MMP-9 não estaria atuando em aumentar a migração e proliferação de células musculares lisas [66], já que vimos uma redução no desenvolvimento de neoíntima nesses grupos.

Em literatura, pouco se sabe a respeito da relação entre o exercício físico, trombose, neoíntima e metaloproteinases, sendo que o que se tem mostra que depende diretamente da duração e intensidade da atividade física, podendo aumentar ou diminuir de acordo com cada

caso. Exercícios de resistência de longa duração (5-12 semanas) aumentam MMP-2 e -9, enquanto que quando agudo há uma redução dessas enzimas. Ao contrário disso, no exercício aeróbico, sabe-se que quando de longa duração (mais que 12 semanas), reduz a expressão de MMP-2 e -9, mas quando agudo aumenta essa atividade [52].

Ainda, vale enfatizar que, quando comparamos os grupos de tempo zero e de 21 dias, observamos um aumento na atividade de MMP-2 nos grupos com neointima, enquanto que a MMP-9 está mais presente no tempo zero. Em um trabalho utilizando ratos e lesão arterial com uso de cateter na artéria carótida, foi observada a presença da MMP-9 somente até o 6º dia após a lesão, sendo que após 2 semanas essa atividade não foi detectada, indicando que essa enzima precede o aparecimento de células musculares lisas na camada íntima por viabilizar a migração destas para a camada média [114]. Resultado semelhante foi visto em outro estudo *in vivo*, no qual também observaram um aumento na atividade da MMP-2 até 14 dias após a injúria [66, 117].

Outro trabalho utilizando camundongos e lesão por interrupção do fluxo sanguíneo da artéria carótida mostrou que a MMP-9 é expressa no vaso em níveis elevados até o 7º dia, reduzindo após esse tempo até o 28º dia, ao passo que a MMP-2 tem sua expressão aumentada apenas após o 7º dia. Essas diferenças estariam relacionadas com a função de cada uma dessas metaloproteinasas [117], sendo que se sabe que a MMP-2 exerce um papel na agregação plaquetária e migração de células musculares lisas [111, 116] e a MMP-9 na resolução do trombo através do remodelamento vascular e perda do enrijecimento do vaso por organizar as moléculas de colágeno, além de migração e proliferação de células musculares [115, 116].

Investigamos também o plasma coletado dos camundongos, verificando parâmetros da cascata de coagulação (TTPA e TT). No caso do tempo de tromboplastina parcial ativada, o TTPA, não observamos diferença significativa entre os grupos lesionados tempo zero sedentário e exercitado antes da lesão, sendo que os valores obtidos em ambos os grupos estão dentro do normal para esse teste, que é de 30 a 45 segundos, segundo instruções do fabricante. Já no TT observamos que o exercício físico reduziu significativamente esse tempo quando comparado aos animais sedentários.

Sabe-se que a trombina é uma das moléculas-chave na cascata de coagulação, sendo que pode estar relacionada com um vaso-relaxamento do endotélio e biodisponibilidade de óxido nítrico, assim como com um aumento na inflamação vascular, redução da função endotelial, proliferação de células musculares lisas e consequente aterotrombose. Em estudos

já realizados que analisaram tempo de trombina em modelos animais de aterosclerose, observou-se um aumento nesse valor quando comparado ao que se esperava de valores normais, tanto em LDLr^{-/-} [118], quanto em ApoE^{-/-} [119], o que se assemelha ao que observamos.

Estudos já realizados mostram que o exercício físico é pró-coagulante, sendo demonstrado através dos tempos de coagulação, principalmente o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), que tem seu valor reduzido após diferentes protocolos de atividade física, diminuindo de 7 a 38%. Com relação a outros parâmetros de coagulação, existem divergências no meio científico, no que se refere ao tempo de trombina (TT) e tempo de protrombina (TP), sendo que alguns estudos mostram que esses tempos não se alteram, ou são reduzidos [120, 121].

No nosso trabalho, observamos diferença somente nos valores de TT, em que o exercício físico foi capaz de reduzir esse tempo, indicando uma maior atividade da via final da cascata de coagulação, ou seja, hipercoagulatividade. Esse fator tem sido explicado devido ao aumento de diversos fatores de coagulação durante o exercício, principalmente do fibrinogênio e alterações nesse fator dependem da intensidade da atividade física, porém os mecanismos para tal aumento ainda estão pouco esclarecidos. Até o momento sabe-se que o estímulo desse fator pode ser mediado por receptores β -adrenérgicos e é um mecanismo NO-dependente [122].

Além disso, diversos fatores podem influenciar nesses parâmetros de coagulação, como os diferentes protocolos de exercício físico utilizados em cada estudo, idade, sexo e condições iniciais de cada indivíduo (como diabetes e hipertensão). Porém, de modo geral, a atividade física regular e de forma moderada tem seus benefícios por afetar alguns fatores relacionados às diferentes vias da coagulação sanguínea [123].

Em um estudo recente utilizando exercício físico extenuante e camundongos fêmeas ApoE/LDLr^{-/-} mostrou-se que houve uma superativação de plaquetas nesses animais knockout comparados aos selvagens, mas essa ativação foi atenuada, e não aumentada. De acordo com o artigo, esse fenômeno pode estar relacionado com um mecanismo compensatório anti-plaquetário de regulação positiva dependente de prostaciclina (PGI₂) [124].

RESUMO DOS RESULTADOS

1- O protocolo de exercício físico utilizado nesse projeto foi caracterizado como de alta intensidade através do teste de VO₂máx e levou a um aumento na capacidade física dos

camundongos LDLr-/- por aumentar a velocidade máxima atingida ao final do teste, o tempo de exaustão e a distância percorrida.

2- O protocolo de exercício físico de duas semanas antes da lesão arterial foi capaz de retardar a formação do trombo ao aumentar o tempo de oclusão, além de reduzir significativamente a formação deste. A área de neointima foi significativamente menor nos grupos exercitados 3 semanas após a injúria e exercitados 2 semanas antes + 3 semanas após a lesão.

3- O exercício físico reduziu de forma significativa o processo inflamatório na artéria carótida por diminuir a marcação para ICAM e LY6G, além de levar a um possível recrutamento de células progenitoras endoteliais para o vaso lesionado (CD34), permitindo uma recuperação das células endoteliais (CD31) da parede arterial. Ainda, aumentou significativamente a presença da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), tanto nos vasos com trombo, quanto com neointima.

4- A dieta hiperlipídica levou ao desenvolvimento da aterosclerose por aumentar significativamente a deposição de lipídeos na raiz da aorta, os níveis de colesterol total e triglicérides. Por outro lado, a atividade física reduziu de forma significativamente a presença desses lipídeos nessa região e diminuiu também o nível de colesterol total no plasma dos camundongos.

5- O exercício físico de duas semanas reduziu significativamente somente o tempo de trombina (TT) e não alterou o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa).

6- O exercício levou a um aumento significativo na atividade das metaloproteinases na artéria carótida no grupo sem lesão arterial e no grupo lesionado tempo zero. Além disso, a atividade dessas enzimas foi significativamente maior nos grupos de 21 dias exercitados somente após e antes e após a injúria no vaso. Mais especificamente, nos grupos tempo zero, o exercício aumentou MMP-2 e reduziu MMP-9, enquanto que com 21 dias, houve um aumento de MMP-9 e a MMP-2 diferiu pouco entre os grupos.

CONCLUSÃO

Assim, concluímos que o exercício físico regular de alta intensidade, desde que sob prescrição médica e orientação de profissionais especializados, pode promover efeitos benéficos tanto na prevenção e tratamento da trombose, quanto da aterosclerose, retardando a formação do trombo arterial e reduzindo o desenvolvimento de neointima, além de diminuir os níveis de colesterol total e a deposição de lipídeos. Esses efeitos estão diretamente relacionados com o remodelamento vascular e reendotelização, envolvendo as células progenitoras

endoteliais e a atividade de metaloproteinases. Nas figuras 58 e 59 resumimos gráfica e esquematicamente os resultados obtidos demonstrando os efeitos benéficos dos exercícios físicos realizados no protocolo experimental deste trabalho.

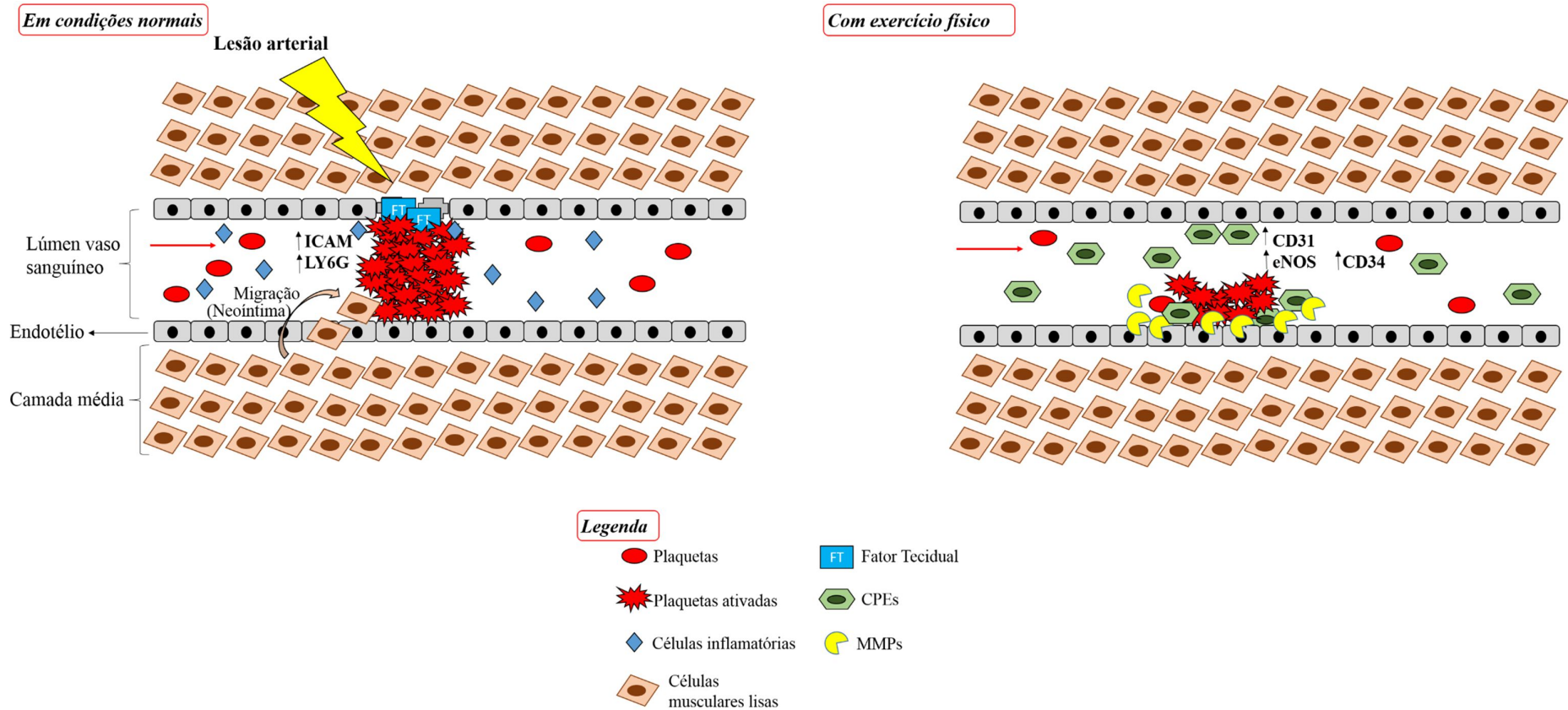


Figura 58. Esquema dos resultados. À direita, em condições normais, a lesão arterial leva à exposição do fator tecidual na camada endotelial e consequente ativação da cascata de coagulação, formação do trombo com plaquetas ativadas e processo inflamatório (ICAM e LY6G), posteriormente migração de células musculares lisas da camada média para formação de neointima. Com exercício físico, ocorre migração de células progenitoras endoteliais (CPEs-CD34) para o local da lesão, onde atuam para recuperação do endotélio lesionado (CD31) através da atividade das metaloproteinases (MMPs) e óxido nítrico sintase endotelial (eNOS).

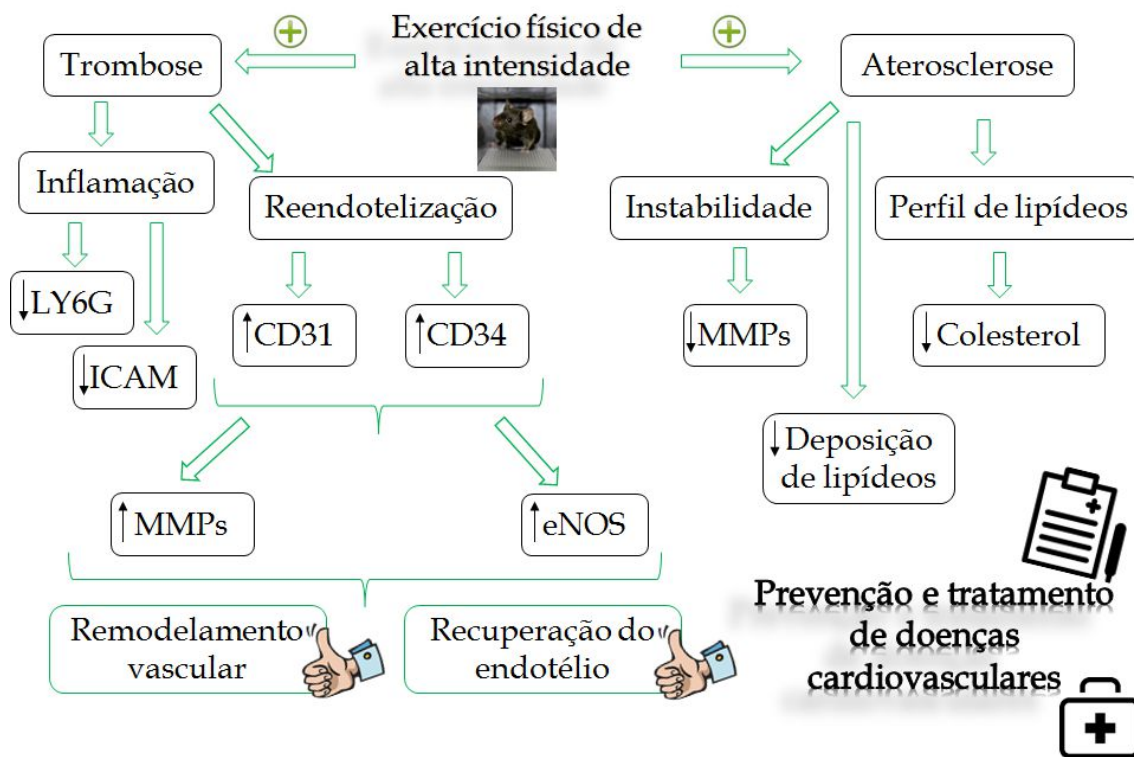


Figura 59. Conclusão do projeto. O exercício físico de alta intensidade possui efeitos positivos tanto na aterosclerose, quanto na trombose, através de diversos mecanismos moleculares e celulares, podendo ser utilizado na prevenção e no tratamento de doenças cardiovasculares.

BIBLIOGRAFIA

1. Mann, T., R.P. Lamberts, and M.I. Lambert, *Methods of prescribing relative exercise intensity: physiological and practical considerations*. Sports medicine, 2013. **43**(7): p. 613-625.
2. Laufs, U., et al., *Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis*. Circulation, 2004. **109**(2): p. 220-226.
3. Gielen, S., G. Schuler, and V. Adams, *Cardiovascular effects of exercise training molecular mechanisms*. Circulation, 2010. **122**(12): p. 1221-1238.
4. Mill, J.G. and D.V. Vassallo, *Hipertrofia cardíaca*. Rev Bras Hipertens, 2001. **8**(1): p. 18-29.
5. Mooren, F.C. and K. Krüger, *Chapter Seventeen-Exercise, Autophagy, and Apoptosis*. Progress in molecular biology and translational science, 2015. **135**: p. 407-422.
6. Epstein, F.H. and R. Ross, *Atherosclerosis—an inflammatory disease*. New England Journal of Medicine, 1999. **340**(2): p. 115-126.
7. Husain, K., et al., *Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis*. World Journal of Biological Chemistry, 2015. **6**(3): p. 209.
8. Insull, W., *The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment*. The American journal of medicine, 2009. **122**(1): p. S3-S14.
9. Herranz, F., et al., *Superparamagnetic nanoparticles for atherosclerosis imaging*. Nanomaterials, 2014. **4**(2): p. 408-438.
10. Nakashima, Y., et al., *Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 1998. **18**(5): p. 842-851.
11. Johnson, J.L. and C.L. Jackson, *Atherosclerotic plaque rupture in the apolipoprotein E knockout mouse*. Atherosclerosis, 2001. **154**(2): p. 399-406.
12. Frodermann, V., et al., *Oxidized Low-Density Lipoprotein-Induced Apoptotic Dendritic Cells as a Novel Therapy for Atherosclerosis*. The Journal of Immunology, 2015. **194**(5): p. 2208-2218.
13. Libby, P. and P. Theroux, *Pathophysiology of coronary artery disease*. Circulation, 2005. **111**(25): p. 3481-3488.
14. Seung, K.B., et al., *Stents versus coronary-artery bypass grafting for left main coronary artery disease*. New England Journal of Medicine, 2008. **358**(17): p. 1781-1792.
15. Carmeliet, P., L. Moons, and D. Collen, *Mouse models of angiogenesis, arterial stenosis, atherosclerosis and hemostasis*. Cardiovascular research, 1998. **39**(1): p. 8-33.
16. Reddick, R.L., S.H. Zhang, and N. Maeda, *Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesion development and progression*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 1994. **14**(1): p. 141-147.
17. Maganto-Garcia, E., M. Tarrío, and A. Lichtman, *Mouse models of atherosclerosis*. Current protocols in immunology, 2012: p. 15.24. 1-15.24. 23.
18. Ishibashi, S., *[LDL-receptor-related protein]*. Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine, 1994. **52**(12): p. 3177-3183.
19. Knowles, J.W. and N. Maeda, *Genetic modifiers of atherosclerosis in mice*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2000. **20**(11): p. 2336-2345.
20. de Campos, W., et al., *Atividade física, consumo de lipídios e fatores de risco para aterosclerose em adolescentes*. Arq Bras Cardiol, 2010. **94**(5): p. 601-607.
21. Meilhac, O., et al., *Role of arterial wall antioxidant defense in beneficial effects of exercise on atherosclerosis in mice*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2001. **21**(10): p. 1681-1688.
22. Ramachandran, S., et al., *Exercise reduces preexisting atherosclerotic lesions in LDL receptor knock out mice*. Atherosclerosis, 2005. **178**(1): p. 33-38.
23. Fukao, K., et al., *Voluntary exercise ameliorates the progression of atherosclerotic lesion formation via anti-inflammatory effects in apolipoprotein E-deficient mice*. Journal of atherosclerosis and thrombosis, 2010. **17**(12): p. 1226-1236.

24. Pellegrin, M., et al., *Swimming prevents vulnerable atherosclerotic plaque development in hypertensive 2-kidney, 1-clip mice by modulating angiotensin II type 1 receptor expression independently from hemodynamic changes*. Hypertension, 2009. **53**(5): p. 782-789.
25. Teodoro, B.G., et al., *Improvements of atherosclerosis and hepatic oxidative stress are independent of exercise intensity in LDLr^{-/-} mice*. Journal of atherosclerosis and thrombosis, 2012. **19**(10): p. 904-911.
26. Ajjola, O.A., et al., *Voluntary Running suppresses proinflammatory cytokines and bone marrow endothelial progenitor cell levels in apolipoprotein-E-deficient mice*. Antioxidants & redox signaling, 2009. **11**(1): p. 15-23.
27. Pellegrin, M., et al., *Long-term exercise stabilizes atherosclerotic plaque in ApoE knockout mice*. Med Sci Sports Exerc, 2009. **41**(12): p. 2128-35.
28. Cardinot, T.M., et al., *Preventive and therapeutic moderate aerobic exercise programs convert atherosclerotic plaques into a more stable phenotype*. Life sciences, 2016. **153**: p. 163-170.
29. Mach, F., et al., *Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling*. Nature, 1998. **394**(6689): p. 200-203.
30. Szostak, J., et al., *Training-induced anti-atherosclerotic effects are associated with increased vascular PPAR γ expression in apolipoprotein E-deficient mice*. Acta Physiologica, 2016. **216**(2): p. 221-230.
31. Esmon, C.T., *Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis*. Blood reviews, 2009. **23**(5): p. 225-229.
32. Abbate, R., et al., *Age-related changes in the hemostatic system*. International Journal of Clinical and Laboratory Research, 1993. **23**(1-4): p. 1-3.
33. Previtali, E., et al., *Risk factors for venous and arterial thrombosis*. Blood Transfusion, 2011. **9**(2): p. 120.
34. Ruggeri, Z.M. and G.L. Mendolicchio, *Adhesion mechanisms in platelet function*. Circulation research, 2007. **100**(12): p. 1673-1685.
35. Mackman, N., *Triggers, targets and treatments for thrombosis*. Nature, 2008. **451**(7181): p. 914-918.
36. Calara, F., et al., *Spontaneous plaque rupture and secondary thrombosis in apolipoprotein E-deficient and LDL receptor-deficient mice*. The Journal of pathology, 2001. **195**(2): p. 257-263.
37. Lowe, G., *Common risk factors for both arterial and venous thrombosis*. British journal of haematology, 2008. **140**(5): p. 488-495.
38. Furie, B. and B.C. Furie, *Mechanisms of thrombus formation*. New England Journal of Medicine, 2008. **359**(9): p. 938-949.
39. Mackman, N., R.E. Tilley, and N.S. Key, *Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2007. **27**(8): p. 1687-1693.
40. Shiba, Y., et al., *M-CSF Accelerates Neointimal Formation in the Early Phase After Vascular Injury in Mice The Critical Role of the SDF-1-CXCR4 System*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2007. **27**(2): p. 283-289.
41. Ashino, T., M. Yamamoto, and S. Numazawa, *Nrf2/Keap1 system regulates vascular smooth muscle cell apoptosis for vascular homeostasis: role in neointimal formation after vascular injury*. Scientific reports, 2016. **6**.
42. Vicente, C.P., L. He, and D.M. Tollefsen, *Accelerated atherogenesis and neointima formation in heparin cofactor II-deficient mice*. Blood, 2007. **110**(13): p. 4261-4267.
43. Kurz, K., B. Main, and G. Sandusky, *Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride*. Thrombosis research, 1990. **60**(4): p. 269-280.
44. Carmeliet, P., et al., *Vascular wound healing and neointima formation induced by perivascular electric injury in mice*. The American journal of pathology, 1997. **150**(2): p. 761.
45. Le Menn, R., L. Bara, and M. Samama, *Ultrastructure of a model of thrombogenesis induced by mechanical injury*. Journal of submicroscopic cytology, 1981. **13**(4): p. 537-549.

46. Jan, H., T.J. van Berkel, and E.A. Biessen, *Induction of rapid atherogenesis by perivascular carotid collar placement in apolipoprotein E-deficient and low-density lipoprotein receptor-deficient mice*. *Circulation*, 2001. **103**(8): p. 1164-1170.
47. Leidenfrost, J.E., et al., *A model of primary atherosclerosis and post-angioplasty restenosis in mice*. *The American journal of pathology*, 2003. **163**(2): p. 773-778.
48. Schwartz, R.S., et al., *Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model*. *Journal of the American College of Cardiology*, 1992. **19**(2): p. 267-274.
49. Liu, P., M. Sun, and S. Sader, *Matrix metalloproteinases in cardiovascular disease*. *Canadian Journal of Cardiology*, 2006. **22**: p. 25B-30B.
50. Lenglet, S., F. Mach, and F. Montecucco, *Role of matrix metalloproteinase-8 in atherosclerosis*. *Mediators of inflammation*, 2013. **2013**.
51. Galis, Z.S. and J.J. Khatri, *Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis*. *Circulation research*, 2002. **90**(3): p. 251-262.
52. Jaoude, J. and Y. Koh, *Matrix metalloproteinases in exercise and obesity*. *Vascular Health and Risk Management*, 2016. **12**: p. 287.
53. Kadoglou, N.P., et al., *Effects of exercise training on the severity and composition of atherosclerotic plaque in apoE-deficient mice*. *Journal of vascular research*, 2011. **48**(4): p. 347-356.
54. Shon, S.-M., et al., *Exercise attenuates matrix metalloproteinase activity in preexisting atherosclerotic plaque*. *Atherosclerosis*, 2011. **216**(1): p. 67-73.
55. Reeves, P.G., F.H. Nielsen, and G.C. Fahey Jr, *AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet*. *J nutr*, 1993. **123**(11): p. 1939-1951.
56. Ghosh, S.S., et al., *High fat high cholesterol diet (western diet) aggravates atherosclerosis, hyperglycemia and renal failure in Nephrectomized LDL receptor knockout mice: role of intestine derived lipopolysaccharide*. *PloS one*, 2015. **10**(11): p. e0141109.
57. Watanabe, T., et al., *Reduction in hemoglobin-oxygen affinity results in the improvement of exercise capacity in mice with chronic heart failure*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2008. **52**(9): p. 779-786.
58. Paula, F.M., et al., *Exercise increases pancreatic β -cell viability in a model of type 1 diabetes through IL-6 signaling*. *The FASEB Journal*, 2015. **29**(5): p. 1805-1816.
59. Tseng, M.T., et al., *Transendothelial migration of ferric ion in FeCl₃ injured murine common carotid artery*. *Thrombosis research*, 2006. **118**(2): p. 275-280.
60. Godoy, J.A., et al., *Dermatan sulfate and bone marrow mononuclear cells used as a new therapeutic strategy after arterial injury in mice*. *Cytotherapy*, 2011. **13**(6): p. 695-704.
61. Lounana, J., et al., *Relationship between % HRmax, % HR reserve, % VO₂max, and % VO₂ reserve in elite cyclists*. *Medicine and science in sports and exercise*, 2007. **39**(2): p. 350-357.
62. Carmeli, E., B. Imam, and E. Kodesh, *Effects of Moderate Exercise Training on Spatial Behavior Among Old Mice-Preliminary Results*. *Open Rehabilitation Journal*, 2014. **7**: p. 6-10.
63. Vieira, C.P., et al., *Green tea and glycine modulate the activity of metalloproteinases and collagen in the tendinitis of the myotendinous junction of the achilles tendon*. *The Anatomical Record*, 2016. **299**(7): p. 918-928.
64. Sudhakar, Y.A., R.K. Verma, and S.C. Pawar, *Type IV collagen α 1-chain noncollagenous domain blocks MMP-2 activation both in-vitro and in-vivo*. *Scientific reports*, 2014. **4**.
65. Zempo, N., et al., *Matrix metalloproteinases of vascular wall cells are increased in balloon-injured rat carotid artery*. *Journal of vascular surgery*, 1994. **20**(2): p. 209-217.
66. Cho, A. and M.A. Reidy, *Matrix metalloproteinase-9 is necessary for the regulation of smooth muscle cell replication and migration after arterial injury*. *Circulation research*, 2002. **91**(9): p. 845-851.
67. De Angelis, K., et al., *Exercise training changes autonomic cardiovascular balance in mice*. *Journal of Applied Physiology*, 2004. **96**(6): p. 2174-2178.

68. Chappell, M.A., et al., *Voluntary running in deer mice: speed, distance, energy costs and temperature effects*. *Journal of Experimental Biology*, 2004. **207**(22): p. 3839-3854.
69. Bassett, D.R. and E.T. Howley, *Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance*. *Medicine and science in sports and exercise*, 2000. **32**(1): p. 70-84.
70. Wenger, H.A. and G.J. Bell, *The interactions of intensity, frequency and duration of exercise training in altering cardiorespiratory fitness*. *Sports medicine*, 1986. **3**(5): p. 346-356.
71. Swain, D.P., *Moderate-or Vigorous-Intensity Exercise: What Should We Prescribe?* *ACSM's Health & Fitness Journal*, 2006. **10**(5): p. 7-11.
72. Pollock, M.L., et al., *Acsm Position Stand*. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 1998. **30**(6): p. 975-991.
73. Samorajski, T., et al., *Effect of exercise on longevity, body weight, locomotor performance, and passive-avoidance memory of C57BL/6J mice*. *Neurobiology of aging*, 1985. **6**(1): p. 17-24.
74. Bradley, R.L., et al., *Voluntary exercise improves insulin sensitivity and adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice*. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2008. **295**(3): p. E586-E594.
75. Okabe, T.-a., et al., *Effects of exercise on the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. *Experimental and clinical cardiology*, 2006. **11**(4): p. 276.
76. Matsumoto, Y., et al., *Regular exercise training prevents aortic valve disease in low-density lipoprotein-receptor-deficient mice*. *Circulation*, 2010. **121**(6): p. 759-767.
77. Schreyer, S.A., D.L. Wilson, and R.C. LeBoeuf, *C57BL/6 mice fed high fat diets as models for diabetes-accelerated atherosclerosis*. *Atherosclerosis*, 1998. **136**(1): p. 17-24.
78. Paigen, B., *Genetics of responsiveness to high-fat and high-cholesterol diets in the mouse*. *The American journal of clinical nutrition*, 1995. **62**(2): p. 458S-462S.
79. Cesar, L., et al., *An essential role for diet in exercise-mediated protection against dyslipidemia, inflammation and atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice*. *PloS one*, 2011. **6**(2): p. e17263.
80. Guizoni, D.M., et al., *Aerobic exercise training protects against endothelial dysfunction by increasing nitric oxide and hydrogen peroxide production in LDL receptor-deficient mice*. *Journal of Translational Medicine*, 2016. **14**(1): p. 213.
81. Shimada, K., et al., *Exercise training reduces severity of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice via nitric oxide*. *Circulation Journal*, 2007. **71**(7): p. 1147-1151.
82. Wu, W., et al., *Aerobic Exercise Suppresses Atherosclerosis Through Adiponectin-Nuclear Transcription Factor κ B Pathway in Apolipoprotein E-deficient Mice*. *The American journal of the medical sciences*, 2017. **353**(3): p. 275-281.
83. Butcher, L., et al., *Low-intensity exercise exerts beneficial effects on plasma lipids via PPAR γ* . *Med Sci Sports Exerc*, 2008. **40**(7): p. 1263-70.
84. Badimon, L. and G. Vilahur, *Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture*. *Journal of internal medicine*, 2014. **276**(6): p. 618-632.
85. Vassequi-Silva, T., et al., *Losartan and captopril treatment rescue normal thrombus formation in microfibril associated glycoprotein-1 (MAGP1) deficient mice*. *Thrombosis research*, 2016. **138**: p. 7-15.
86. Pynn, M., et al., *Exercise training reduces neointimal growth and stabilizes vascular lesions developing after injury in apolipoprotein E-deficient mice*. *Circulation*, 2004. **109**(3): p. 386-392.
87. Yang, J., et al., *CD34⁺ cells represent highly functional endothelial progenitor cells in murine bone marrow*. *PloS one*, 2011. **6**(5): p. e20219.
88. Hager, G., et al., *Three specific antigens to isolate endothelial progenitor cells from human liposuction material*. *Cytotherapy*, 2013. **15**(11): p. 1426-1435.
89. Werner, N., et al., *Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury*. *Circulation research*, 2003. **93**(2): p. e17-e24.

90. Werner, N., et al., *Bone marrow–derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2002. **22**(10): p. 1567-1572.
91. Petersen, A.M.W. and B.K. Pedersen, *The anti-inflammatory effect of exercise*. *Journal of Applied Physiology*, 2005. **98**(4): p. 1154-1162.
92. Liu, L. and G.-P. Shi, *CD31: beyond a marker for endothelial cells*, 2012, The Oxford University Press.
93. Hu, X., et al., *Physical exercise induces expression of CD31 and facilitates neural function recovery in rats with focal cerebral infarction*. *Neurological research*, 2010. **32**(4): p. 397-402.
94. Moore, C., C. Tymvios, and M. Emerson, *Functional regulation of vascular and platelet activity during thrombosis by nitric oxide and endothelial nitric oxide synthase*. 2010.
95. Indolfi, C., et al., *Physical training increases eNOS vascular expression and activity and reduces restenosis after balloon angioplasty or arterial stenting in rats*. *Circulation research*, 2002. **91**(12): p. 1190-1197.
96. Cacicedo, J.M., et al., *Acute exercise activates AMPK and eNOS in the mouse aorta*. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2011. **301**(4): p. H1255-H1265.
97. Morishige, K., et al., *Overexpression of matrix metalloproteinase-9 promotes intravascular thrombus formation in porcine coronary arteries in vivo*. *Cardiovascular research*, 2003. **57**(2): p. 572-585.
98. Deatrick, K.B., et al., *Vein wall remodeling after deep vein thrombosis involves matrix metalloproteinases and late fibrosis in a mouse model*. *Journal of vascular surgery*, 2005. **42**(1): p. 140-148.
99. Carmeli, E., et al., *High intensity exercise increases expression of matrix metalloproteinases in fast skeletal muscle fibres*. *Experimental physiology*, 2005. **90**(4): p. 613-619.
100. Rullman, E., et al., *Endurance exercise activates matrix metalloproteinases in human skeletal muscle*. *Journal of Applied Physiology*, 2009. **106**(3): p. 804-812.
101. Wahl, P., W. Bloch, and A. Schmidt, *Exercise has a positive effect on endothelial progenitor cells, which could be necessary for vascular adaptation processes*. *International journal of sports medicine*, 2007. **28**(05): p. 374-380.
102. Bowles, D.K. and M.H. Laughlin, *Mechanism of beneficial effects of physical activity on atherosclerosis and coronary heart disease*, 2011, Am Physiological Soc.
103. Chow, A., J. Cena, and R. Schulz, *Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature*. *British journal of pharmacology*, 2007. **152**(2): p. 189-205.
104. Furman, C., et al., *Systemic tissue inhibitor of metalloproteinase-1 gene delivery reduces neointimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery*. *FEBS letters*, 2002. **531**(2): p. 122-126.
105. Lijnen, H., P. Soloway, and D. Collen, *Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 impairs arterial neointima formation after vascular injury in mice*. *Circulation research*, 1999. **85**(12): p. 1186-1191.
106. Sho, E., et al., *Arterial enlargement in response to high flow requires early expression of matrix metalloproteinases to degrade extracellular matrix*. *Experimental and molecular pathology*, 2002. **73**(2): p. 142-153.
107. Tronc, F., et al., *Role of Matrix Metalloproteinases in Blood Flow–Induced Arterial Enlargement*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2000. **20**(12): p. e120-e126.
108. Kadoglou, N., et al., *The anti-inflammatory effects of exercise training promote atherosclerotic plaque stabilization in apolipoprotein E knockout mice with diabetic atherosclerosis*. *European journal of histochemistry: EJH*, 2013. **57**(1).
109. Toth, M., A. Sohail, and R. Fridman, *Assessment of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by gelatin zymography*. *Metastasis Research Protocols*, 2012: p. 121-135.
110. Newby, A.C., *Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates*. *Cardiovascular research*, 2006. **69**(3): p. 614-624.

111. Guglielmini, G., et al., *Matrix metalloproteinase-2 enhances platelet deposition on collagen under flow conditions*. Thrombosis and haemostasis, 2016. **115**(2): p. 333-343.
112. Momi, S., et al., *Loss of matrix metalloproteinase 2 in platelets reduces arterial thrombosis in vivo*. Journal of Experimental Medicine, 2009. **206**(11): p. 2365-2379.
113. Kuzuya, M., et al., *Deficiency of gelatinase a suppresses smooth muscle cell invasion and development of experimental intimal hyperplasia*. Circulation, 2003. **108**(11): p. 1375-1381.
114. Bendeck, M.P., et al., *Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat*. Circulation research, 1994. **75**(3): p. 539-545.
115. Nguyen, K.P., et al., *Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) Regulates Vein Wall Biomechanics in Murine Thrombus Resolution*. PloS one, 2015. **10**(9): p. e0139145.
116. Johnson, C. and Z.S. Galis, *Matrix metalloproteinase-2 and- 9 differentially regulate smooth muscle cell migration and cell-mediated collagen organization*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2004. **24**(1): p. 54-60.
117. Godin, D., et al., *Remodeling of carotid artery is associated with increased expression of matrix metalloproteinases in mouse blood flow cessation model*. Circulation, 2000. **102**(23): p. 2861-2866.
118. Kassel, K.M., et al., *Therapeutic administration of the direct thrombin inhibitor argatroban reduces hepatic inflammation in mice with established fatty liver disease*. The American journal of pathology, 2012. **181**(4): p. 1287-1295.
119. Pingel, S., et al., *Thrombin inhibition by dabigatran attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice*. Archives of medical science: AMS, 2014. **10**(1): p. 154.
120. El-Sayed, M.S., et al., *Blood hemostasis in exercise and training*. Medicine and science in sports and exercise, 2000. **32**(5): p. 918-925.
121. Smith, J., *Effects of strenuous exercise on haemostasis*. British journal of sports medicine, 2003. **37**(5): p. 433-435.
122. Ribeiro, J.L. and A.R. Oliveira, *Efeitos do exercício e do treinamento físico na hemostasia*. Rev Bras Hematol Hemoter, 2005. **27**(3): p. 213-20.
123. Ghaediyan, S., et al., *The effect of a moderate aerobic exercise on the blood coagulation markers in young non-athlete females*. Journal of Jahrom University of Medical Sciences, 2012. **10**(2): p. 55.
124. Przyborowski, K., et al., *Effects of a single bout of strenuous exercise on platelet activation in female ApoE/LDLR-/- mice*. Platelets, 2017: p. 1-11.

ANEXOS



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo dos mecanismos envolvidos no efeito do exercício físico na trombose e inflamação após lesão arterial em camundongos ateroscleróticos", protocolo nº 4144-1, sob a responsabilidade de Profa. Dra. Cristina Pontes Vicente / Malara Ferreira Terra, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA**, tendo sido aprovado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em 04 de abril de 2016.

Vigência do projeto: 03/2016-02/2018

Início do experimento envolvendo manipulação animal: ABRIL/2016

Espécie/Linhagem: Camundongo Knockout / B6.129S7-LdIrtm1Her/J

No. de animais: 90

Idade/Peso: 06 semanas / 23g

Sexo: machos

Origem: CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio**.

Campinas, 04 de abril de 2016.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Estudo dos mecanismos envolvidos no efeito do exercício físico na trombose e inflamação após lesão arterial em camundongos ateroscleróticos**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 20/02/2018

Assinatura: Maiara F. Terra
Nome do(a) autor(a): **Maiara Ferreira Terra**
RG n.º 45036873 B

Assinatura: Cristina Pontes Vicente
Nome do(a) orientador(a): **Cristina Pontes Vicente**
RG n.º 04627030 V