

Tatiana Ramos Fonseca

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO E DO EXTRATO
DE SOJA NO PERFIL LIPÍDICO, NO ESTRESSE
OXIDATIVO E NA ATEROSCLEROSE EM
CAMUNDONGOS DEFICIENTES DO GENE PARA
O RECEPTOR DE LDL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Jacqueline I. Alvarez-Leite

Co-orientador: Nilo Resende Viana Lima

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG

2007

Folha de aprovação

Aos meus pais e ao meu irmão,
profundos incentivadores de toda
minha trajetória profissional.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e força.

À minha orientadora Jacqueline-I. Alvarez-Leite por ter contribuído e incentivado a minha formação científica e pela oportunidade de desenvolver pesquisa.

Ao professor Nilo Resende Viana Lima pela coorientação na execução deste trabalho, pela amizade, carinho e conselhos.

À Danusa Dias Soares pelo carinho e conselhos no momento de escolha para o mestrado.

À professora Ângela Lana pelas consultorias estatísticas e pelo carinho e atenção.

À Maria Helena, pela competência e cuidado com os animais e pela amizade. Como a gente ria no biotério!

Aos alunos de iniciação científica: Sephora, Felipe, Paulo, em especial, Àzula e Eliane.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica Nutricional, Érica, Yani, Juliana, Maysa, Lu Portugal, Daniela, Sabrina, Carol, Luis.

À Ana Cristina e Lu Enéas pela amizade e auxílios em meus experimentos.

Ao Luciano, pelo carinho e risadas.

À Lu Fernandes pela ajuda para medir lesões e na correção da dissertação.

À Françoise Botelho por me ensinar e me auxiliar durante a iniciação científica e no mestrado e também pelo carinho.

À Sabrina, por me auxiliar o carnaval inteiro.

À Marilene Beatriz e à Úrsula Regiane, secretárias do programa de pós-graduação em Ciência de Alimentos, pelo auxílio nos momentos burocráticos.

Aos professores do programa de pós-graduação em Ciência de Alimentos, em especial ao professor Virgílio Coelho pelos auxílios no início do mestrado com alguns artigos científicos.

Aos companheiros e amigos do programa de pós-graduação em Ciência de Alimentos mestrado, em especial Carla, Eliane e Marclênia.

À Andréia que, além de amiga e companheira de mestrado, foi minha conselheira e irmã e que me acolhia com tanto carinho e atenção.

Ao laboratório de Imunoparasitologia, especialmente à Eneida.

Ao laboratório de Gnotobiologia e Imunologia, professora Leda Vieira e aos amigos Fernanda, Lucas, Virgínia, Juan, Handerson e Sônia.

Ao Núcleo de Neurociências, principalmente ao professor Márcio Flávio Dutra Moraes, pela utilização do micrótomo.

Ao Jamil pelo auxílio no uso do espectrofotômetro e pelo carinho e risadas.

Aos amigos do LAFISE.

À Dani Cerqueira pela amizade, conselhos e auxílios durante

À Paula Moura e Ana Paula da EEFFTO pela amizade

Ao CNPQ, pela bolsa concedida.

À Mel, pelo carinho e auxílio fundamental no final de meu mestrado.

Aos meus pais pela dedicação e o amor de vocês que fizeram deste sonho uma realidade. Esta conquista é nossa!

Ao meu irmão, Alexandre, pela paciência, companhia, idas ao ICB aos finais de semana e pelos milhares de auxílios no computador.

À minha família, em especial ao meu primo André pelo carinho.

Aos meus amigos de Juiz de Fora pelos momentos de descontração e acolhimento nos momentos mais estressantes.

Ao Rodrigo Guabiraba pela paciência no homogeneizador e amizade.

À Liletinha pela amizade, carinho, companhia e auxílio no inglês.

*“De tudo, ficaram três coisas:
a certeza de que estamos sempre
começando...
a certeza de que é preciso continuar...
a certeza de que seremos
interrompidos antes
de terminar...”*

*Portanto devemos:
fazer da interrupção um caminho
novo...
da queda, um passo de dança...
do medo, uma escada...
do sonho, uma ponte...
da procura... um encontro...”
(Fernando Sabino em “o encontro
marcado”)*

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	14
RESUMO.....	17
ABSTRACT.....	18
1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Objetivo Geral	20
1.2. Objetivos Específicos	20
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1. Metabolismo de lipídeos e lipoproteínas	21
2.2. Radicais livres e estresse oxidativo.....	24
2.2.1. Espécies reativas de oxigênio, estresse oxidativo e peroxidação lipídica	24
2.2.2. Sistemas antioxidantes	27
2.3. Aterosclerose	28
2.4. Receptor de LDL e o metabolismo de colesterol.....	32
2.5. Camundongo LDL ^{r/-}	33
2.6. Exercício físico	35
2.7. Soja	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1. Cuidados Éticos	40
3.2. Animais e desenho experimental	40
3.3. Protocolo de natação	40
3.4. Dieta	41
3.5. Controle de peso corporal e do consumo alimentar	42
3.6. Amostras de sangue	42
3.6.1. Determinação das concentrações de colesterol total	42
3.6.2. Determinação das concentrações de HDL-Colesterol	43
3.6.3. Determinação das frações aterogênicas e da relação colesterol total/HDLc....	44
3.6.4. Determinação das concentrações de triacilgliceróis séricos.....	44

3.6.5. Avaliação da peroxidação lipídica sérica: monitoramento da capacidade antioxidante do soro	44
3.7. Amostras de tecidos	46
3.7.1 Peso relativo do coração	46
3.7.2. Avaliação da peroxidação lipídica – TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) – em tecido hepático e renal	46
3.7.3. Dosagem da concentração de hidroperóxidos em tecido hepático e renal.....	47
3.7.4. Avaliação das lesões ateroscleróticas	48
3.7.4.1. Avaliação da deposição lipídica nas aortas torácica e abdominal	48
3.7.4.2. Avaliação das lesões ateroscleróticas na raiz aórtica.....	49
3.8. Estatística.....	49
4. RESULTADOS	50
4.1. Peso corporal e consumo alimentar dos camundongos LDLr ^{-/-}	50
4.2. Amostras de sangue	51
4.2.1. Colesterol sérico total dos camundongos LDLr ^{-/-}	51
4.2.2. Colesterol HDL, frações aterogênicas e relação colesterol total/HDLc.....	52
4.2.3. Triacilgliceróis séricos.....	54
4.2.3.. Peroxidação lipídica sérica: monitoramento da capacidade antioxidante sérica	55
4.3. Amostras de tecidos	56
4.3.1. Peso relativo do coração	56
4.3.2. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e hidroperóxidos em tecido hepático e renal.....	57
4.3.3. Lesões ateroscleróticas	59
4.3.3.1. Aorta torácica e abdominal	59
4. 3.3.2. Lesão na raiz aórtica.....	62
5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÃO	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.....	41
Composição das dietas	
Tabela 2.....	42
Composição do extrato de soja	
Tabela 3.....	43
Diluições para a determinação da curva padrão de colesterol total	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....	22
Esquema representativo de uma lipoproteína	
Figura 2.....	23
O metabolismo de lipoproteínas	
Figura 3.....	27
Peroxidação lipídica: uma reação em cadeia	
Figura 4.....	30
Eventos de iniciação no desenvolvimento de estrias gordurosas	
Figura 5.....	33
Passos seqüenciais na via do receptor de LDL	
Figura 6.....	39
Estruturas químicas. A- da daidzeína e B- da genisteína	
Figura 7.....	45
Monitoramento da peroxidação lipídica	
Figura 8.....	50
Peso corporal em gramas dos camundongos LDLr ^{-/-} ao longo das seis semanas de experimento	
Figura 9.....	51
Consumo alimentar semanal dos animais LDLr ^{-/-}	
Figura 10.....	52
Concentrações de colesterol sérico total dos camundongos LDLr ^{-/-}	
Figura 11.....	52
HDLc dos camundongos LDLr ^{-/-} ao final das seis semanas de experimento	
Consumo alimentar semanal dos animais LDLr ^{-/-}	
Figura 12.....	53
Fração aterogênica (VLDL, LDL e IDL) do colesterol dos camundongos LDLr ^{-/-} ao final das seis semanas de experimento	
Figura 13.....	54
Relação colesterol total/HDLc dos camundongos LDLr ^{-/-} ao final das seis semanas de experimento	

Figura 14.....	54
Triacilgliceróis séricos dos camundongos LDLr ^{-/-} ao final de seis semanas de experimento	
Figura 15.....	55
Fase de latência sérica dos camundongos LDLr ^{-/-} ao final de seis semanas de experimento	
Figura 16.....	56
Perfis do monitoramento espectrofotométrico na absorvância de 245 nm, a 37°C, durante 2 horas da peroxidação lipídica sérica. A- perfil representativo dos grupos: CT, EX e ES e B-perfil representativo do grupo EX + ES	
Figura 17.....	57
Peso relativo dos corações dos camundongos LDLr ^{-/-} ao final das seis semanas de experimento	
Figura 18.....	58
Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico em tecido hepático dos camundongos LDLr ^{-/-} ao final das seis semanas de experimento	
Figura 19.....	58
Hidroperóxidos em tecido hepático dos camundongos LDLr ^{-/-} ao final das seis semanas de experimento	
Figura 20.....	59
Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico em tecido renal dos camundongos LDLr ^{-/-} ao final das seis semanas de experimento	
Figura 21.....	59
Hidroperóxidos em tecido renal dos camundongos LDLr ^{-/-} ao final das seis semanas de experimento	
Figura 22.....	60
Porcentagem de deposição lipídica em aortas torácica e abdominal dos camundongos LDLr ^{-/-} ao final das seis semanas de experimento	
Figura 23.....	61
Imagens das superfícies internas das aortas torácica e abdominal dos animais LDLr ^{-/-}	
Figura 24.....	62
Área da lesão aterosclerótica na raiz aórtica dos animais LDLr ^{-/-}	
Figura 25.....	63
Aspectos histológicos da raiz da aorta dos animais LDLr ^{-/-}	
Figura 26.....	64
Quantidade de lesões ateroscleróticas na raiz aórtica nos animais LDLr ^{-/-}	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCA-1	Cassete de transporte-1 ligado a adenosina trifosfato
ACAT	Acil-coenzima A: colesterol aciltransferase
AIN	Instituição Americana de Nutrição
ANOVA	Análise de variância
APO	Apoproteína
ATP	Adenosina trifosfato
BHT	Butil hidroxitolueno
°C	Grau centígrado
CAM	Molécula de adesão celular
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CETP	Proteína de transferência de éster de colesterol
CT	Grupo sem exercício físico e com dieta controle
Cu	Cobre
CuSO ₄	Sulfato de cobre
dL	Decilitros
DNA	Ácido desoxirribonucléico
e ⁻	Életron
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético
ES	Grupo sem exercício físico e com dieta contendo extrato de soja
EX	Grupo com exercício físico e dieta controle
EX+ES	Grupo com exercício físico e dieta contendo extrato de soja
Fe	Ferro
g	Gramas
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
H ⁺	Íon de hidrogênio
HCL	Ácido clorídrico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HE	Hematoxilina e eosina
HMG-CoA	3-hidróxi-3-metilglutaril coenzima A
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio

IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
Kg	Quilograma
L·	Radical lipídico
LCAT	Lecitina: colesterol acil transferase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLmm	LDL minimamente oxidada
LDLox	LDL oxidada
LDLr	Receptor de LDL
LDLr ^{-/-}	Deficiência para receptor de LDL
LH	Ácido graxo poliinsaturado
LO·	Radical alcóxil
LOO·	Radical peróxil
LOOH	Hidroperóxido lipídico
LPL	Lipase lipoprotéica
M	Molar
MCP	Proteína quimiotática para monócitos
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófago
MDA	Malondialdeído
MET	Equivalente metabólico
mg	Miligrama
μL	Microlitros
mL	Mililitros
μm	Micrômetros
μM	Micromolar
Mn-SOD	Superóxido dismutase contendo manganês como centro ativo
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ⁻	Radical ânion superóxido
OH·	Radical hidroxila
ONOO-	Peroxinitrito
PBS	Salina tamponada com fosfato
QM	Quilomícron
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROH	Álcoois lipídicos

ROOH	Peróxido lipídico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPM	Rotações por minuto
SRA-I	Receptor <i>scavenger</i> -A I
SRA-II	Receptor <i>scavenger</i> -A II
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TPP	Trifenilfostina
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
VO ₂ MÁX	Volume máximo de oxigênio

RESUMO

Objetivo: Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do exercício físico e do extrato de soja no perfil lipídico, no estresse oxidativo e na aterosclerose em camundongos deficientes do gene para o receptor de LDL (LDLr^{-/-}).

Métodos: Os animais foram divididos: grupo que não realizou exercício e recebeu dieta controle (CT; n=8); grupo que realizou exercício e recebeu dieta controle (EX; n=8); grupo que não realizou exercício e recebeu dieta contendo extrato de soja (ES; n=8); grupo que realizou exercício e recebeu dieta contendo extrato de soja (EX+ES; n=8). Os pesos corporais e consumo alimentar foram avaliados durante as 6 semanas experimentais e o peso relativo do coração após o sacrifício. Os triacilgliceróis, colesterol total sérico e suas frações foram determinados por ensaio enzimático. Avaliou-se a fase de latência da produção de dieno conjugado nos soros e formação de TBARS e hidroperóxidos em rins e fígados. Realizaram-se análises histomorfométricas da lesão aterosclerótica na válvula aórtica e na aorta torácica e abdominal.

Resultados: Observamos que no perfil lipídico somente o extrato de soja aumentou o HDLc (CT: 21,01 ± 2,05; EX: 22,92 ± 3,46; ES: 36,02 ± 4,37; ES+EX: 32,77 ± 6,52 mg/dL, p < 0,05) e reduziu as frações aterogênicas (CT: 650,77 ± 86,10; EX: 668,03 ± 55,07; ES: 551,29 ± 63,63; ES+EX: 601,20 ± 106,59 mg/dL, p < 0,05). Com relação à resistência à peroxidação lipídica plasmática, o exercício físico e o extrato de soja prolongaram a fase de latência quando administrados em conjunto (CT: 3,40; EX: 8,40; ES: 9,40; EX+ES: 58,40 min, p < 0,05). Além disso, o exercício físico e o extrato de soja promoveram redução das concentrações de TBARS em tecido hepático (CT: 2,28 ± 0,33; EX: 1,04 ± 0,21; ES: 1,36 ± 0,35; EX+ES: 1,44 ± 0,48 nmol de MDA/mg de proteína, p < 0,05). Apesar de não ter sido constatado efeito do exercício físico e do extrato de soja na aterosclerose na aorta torácica e abdominal, ambos promoveram redução da lesão aterosclerótica na raiz aórtica, quando presentes, em conjunto ou separados (CT: 598 x 10³ ± 146 x 10³; EX: 319 x 10³ ± 91 x 10³; ES: 301 x 10³ ± 73 x 10³; EX + ES: 188 x 10³ ± 36 x 10³ μm², p < 0,05).

Conclusão: O presente estudo demonstrou que ambos, exercício e soja, reduzem a aterosclerose na raiz aórtica em camundongos LDLr^{-/-}.

Palavras chaves: exercício físico, soja, perfil lipídico, estresse oxidativo e aterosclerose.

Apoio financeiro: CNPq, FAPEMIG e CAPES.

ABSTRACT

Purpose: The present study had an objective to evaluate the effects of physical exercise and soy extract on lipid profile, oxidative stress and atherosclerosis in mice knockout for LDL receptor.

Methods: The animals were divided into four groups: control diet (CT; n=8); control diet with physical exercise (EX; n=8); diet containing soy extract (ES; n=8) and diet containing soy extract with physical exercise (EX+ES; n=8). The duration of the experiment was for 6 weeks. The body weight and the relative heart weight were evaluated at the end of the experiment, also the total serum cholesterol, HDLc and atherogenic fractions, the lag time of conjugate diene production on serum and TBARS in kidneys and livers. Histomorphometrical analyses of aortic lesion on the aortic root and thoracic-abdominal aorta were performed.

Results: We observed that only soy extract increased HDLc (CT: $21,01 \pm 2,05$; EX: $22,92 \pm 3,46$; ES: $36,02 \pm 4,37$; ES+EX: $32,77 \pm 6,52$ mg/dL, $p < 0,05$) and reduced atherogenic fraction (CT: $650,77 \pm 86,10$; EX: $668,03 \pm 55,07$; ES: $551,29 \pm 63,63$; ES+EX: $601,20 \pm 106,59$ mg/dL, $p < 0,05$) on lipid profile. Regarding to serum lipid peroxidation resistance, physical exercise and soy extract prolonged the lag time stage when administrated together (CT: 3,40; EX: 8,40; ES: 9,40; EX+ES: 58,40 min, $p < 0,05$). Besides that, physical exercise and soy extract reduced TBARS levels in hepatic tissue (CT: $2,28 \pm 0,33$; EX: $1,04 \pm 0,21$; ES: $1,36 \pm 0,35$; EX+ES: $1,44 \pm 0,48$ nmol de MDA/mg de proteína, $p < 0,05$). Although, were not noted effects of physical exercise and soy extract on atherosclerosis on thoracic-abdominal aorta, both promoted aortic lesion reduction on the aortic root (CT: $598 \times 10^3 \pm 146 \times 10^3$; EX: $319 \times 10^3 \pm 91 \times 10^3$; ES: $301 \times 10^3 \pm 73 \times 10^3$; EX + ES: $188 \times 10^3 \pm 36 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$).

Conclusion: The present study demonstrated that both, physical exercise and soy extract reduce atherosclerosis development on aortic root in LDLr^{-/-} mice.

Key words: physical exercise, soy, lipid profile, oxidative stress and atherosclerosis.

Financial support: CNPq, FAPEMIG and CAPES.

1. INTRODUÇÃO

A doença cardiovascular, incluindo ataque cardíaco, derrame e insuficiência cardíaca, é a principal causa de doença e morte no mundo desenvolvido (SCOTT, 2004). Entretanto, as mudanças que vêm ocorrendo nas sociedades dos países em desenvolvimento, dentre eles o Brasil, acompanham-se de modificações importantes no perfil de morbidade e de mortalidade. As doenças não transmissíveis representam, atualmente, importante problema de saúde pública nesses países (CASTRO et al., 2004).

Dados brasileiros mostram que, em 2000, as doenças cardiovasculares foram responsáveis pela principal alocação de recursos públicos em hospitalizações e foram a terceira causa de permanência hospitalar prolongada (DIRETRIZES..., 2001; CASTRO et al., 2004).

Dentre as doenças cardiovasculares, destaca-se a aterosclerose que tem como origem primária alterações no metabolismo de lipídeos e a conseqüente hiperlipidemia. Desde o surgimento da hipótese oxidativa para a aterosclerose, há aproximadamente 15 anos (STEINBERG et al., 1989; MEILHAC et al., 2001), um grande número de experimentos *in vitro*, em modelos animais e com humanos mostram que os lipídeos oxidados exibem efeitos pró-aterogênicos (PARTHASARATHY et al., 1999; MEILHAC et al., 2001). Nos eventos iniciais da aterogênese a lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDLox) é rapidamente internalizada e acumulada nos macrófagos, formando as células espumosas, que se depositam no espaço subendotelial (LIBBY, 2002). A LDLox é citotóxica para as células endoteliais, promovendo a expressão de citocinas e a proliferação celular, inibindo o relaxamento vascular induzido pelo óxido nítrico e desencadeando assim, uma cascata de respostas inflamatórias (SMITH, 2001).

O exercício físico tem sido recomendado na prevenção de doenças cardiovasculares (BUSBY et al., 1985; ENSIGN et al., 2002), pois há evidências que o exercício físico aumenta a sensibilidade à insulina (ENSIGN et al., 2002) e a tolerância à glicose (THOMPSON et al., 2003), reduz a hipertensão arterial (ENSIGN et al., 2002, THOMPSON et al., 2003), aumenta o colesterol da fração lipoproteína de alta densidade (HDL) (THOMPSON et al., 2003), diminui as concentrações de triacilgliceróis (THOMPSON et al., 2003) e do colesterol da fração LDL (THOMPSON et al., 2003) e promove redução do peso corporal e do estresse emocional (BENÍTEZ et al., 2002; ENSIGN et al., 2002; SMITH, 2001).

Na última década, intensificaram-se as pesquisas com interesse no papel da soja na prevenção e no tratamento de doenças crônicas, como câncer e doenças cardiovasculares. Recentemente, a soja é considerada um alimento funcional que proporciona benefícios à saúde além da nutrição básica (HASLER, 2002). Tem sido documentado na literatura que a dieta com soja reduz LDLc, triacilgliceróis e, possivelmente, aumenta HDLc (ANTHONY, 2000). Estes efeitos, possivelmente, são atribuídos à presença das isoflavonas (genisteína e daidzeína) ou da proteína, ou de ambos na composição da soja (TIKKANEN et al., 1998; MENG et al., 1999). Além disso, as isoflavonas podem atuar como antioxidante, removendo radicais livres e quelando íons metálicos (ARORA et al., 1998), possivelmente agindo no início e na progressão da aterosclerose por inibir a oxidação de lipoproteína (ADAMS et al., 2002).

Portanto, o presente trabalho visou investigar em camundongos susceptíveis à aterosclerose (LDLr^{-/-}), os efeitos do exercício físico e do extrato de soja no perfil lipídico, no estresse oxidativo e na aterosclerose.

1.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do exercício físico e do extrato de soja, administrados juntos ou isolados, no perfil lipídico, no estresse oxidativo e na aterosclerose em camundongos deficientes do gene para o receptor de LDL.

1.2. Objetivos Específicos

- Determinar as concentrações de colesterol plasmático total na semana zero (inicial do experimento) e ao término das seis semanas de experimento;
- Determinar o colesterol HDL, a fração aterogênica e as concentrações de triacilgliceróis no soro ao término das seis semanas de experimento;
- Avaliar a peroxidação lipídica no soro e nos tecidos renal e hepático;
- Avaliar a formação de placas ateroscleróticas nas aortas torácica e abdominal e na raiz aórtica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Metabolismo de lipídeos e lipoproteínas

Os lipídeos celulares são fundamentais não só como fonte de energia para a célula, mas também, como componentes estruturais da membrana celular, sendo os ácidos graxos, os triacilgliceróis, os fosfolipídeos e o colesterol esterificado e livre os principais para o ser humano (ALVAREZ-LEITE & PELUZIO, 2003).

Os ácidos graxos são compostos por cadeias de carbono hidrocarboxiladas, podendo ser saturados ou insaturados (SCARTEZINI et al., 1997). Os triacilgliceróis são produzidos pela esterificação do glicerol com três moléculas de ácidos graxos. Os fosfolipídeos são formados por glicerol, ácido graxo, base nitrogenada e fosfato (GENEST, 2003). E o colesterol pode apresentar-se sob a forma livre (forma funcional, componente estrutural das membranas celulares e na superfície da lipoproteína) ou esterificada (forma de armazenamento, encontrada no interior das células ou no interior das lipoproteínas) (SCARTEZINI et al., 1997).

Devido à sua natureza hidrofóbica, os lipídeos são transportados no plasma sob a forma de aglomerados denominados lipoproteínas, que são constituídas por uma capa hidrofílica composta por fosfolipídeos, colesterol livre e proteínas, envolvendo um núcleo hidrofóbico que contém triacilgliceróis, colesterol esterificado e algumas vitaminas lipossolúveis - Figura 1 (GENEST, 2003). As lipoproteínas diferem-se quanto à densidade, origem, tamanho e conteúdo de apoproteínas e lipídeos, porém sua classificação se baseia na densidade no meio aquoso do plasma. As principais classes de lipoproteínas, quanto a este quesito, são: quilomícrons (QM), lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL) (RADER & WILSON, 1995; SCARTEZINI et al., 1997; GENEST, 2003). As apoproteínas (apo) são as proteínas presentes nestas partículas (GENEST, 2003) e exercem várias funções fisiológicas no seu metabolismo, dentre as quais: agir como cofatores para enzimas, ligar-se em receptores da superfície celular, contribuir para a solubilização dos lipídeos, além da função estrutural para a biossíntese das lipoproteínas (RADER & WILSON, 1995).

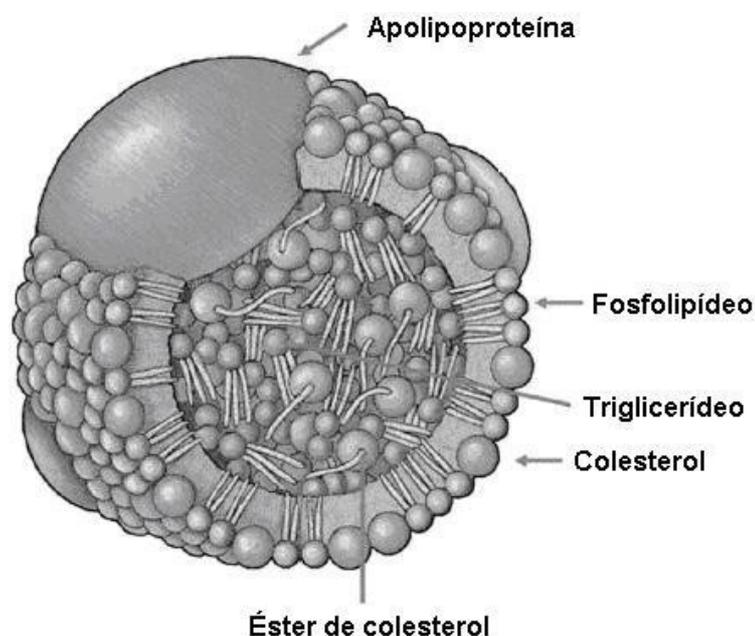


Figura 1 - Esquema representativo de uma lipoproteína (modificada de GENEST, 2003).

No metabolismo das lipoproteínas (Figura 2) os quilomícrons, que são constituídos por apo B-48, E, A-1 e C (sintetizadas pelos enterócitos), transportam os triacilgliceróis de origem alimentar que são formados no intestino a partir da digestão das gorduras alimentares. A composição, o número e o tamanho dos quilomícrons formados dependem do suprimento e das características da dieta. Uma vez sintetizados, os quilomícrons são lançados na linfa, atingindo a circulação sanguínea através do ducto torácico. Estes se tornam uma partícula de menor tamanho (quilomícron remanescente), pela retirada dos seus ácidos graxos, ao sofrerem hidrólise dos seus triacilgliceróis pela ação da enzima lipase lipoprotéica (LPL), que utiliza como cofator enzimático a apo C-II. Os remanescentes são removidos da circulação para o fígado devido a ligação da apo E com o receptor de remanescentes neste órgão (GENEST, 2003).

Os ácidos graxos provenientes do quilomícron juntamente com os sintetizados no fígado são “re-enpacotados” e secretados no sangue na forma de VLDL, lipoproteínas ricas em triacilgliceróis, cuja principal apoproteína é a apo B-100. Na circulação, as VLDL são hidrolisadas por LPL, originando as IDL que contêm apo B-100 e apo E na sua superfície. A IDL tem dois destinos: é captada da circulação pelo fígado, pela interação das apoproteínas com receptores hepáticos, ou é processada pela lipase hepática e se transforma em LDL – Figura 2 (GENEST, 2003).

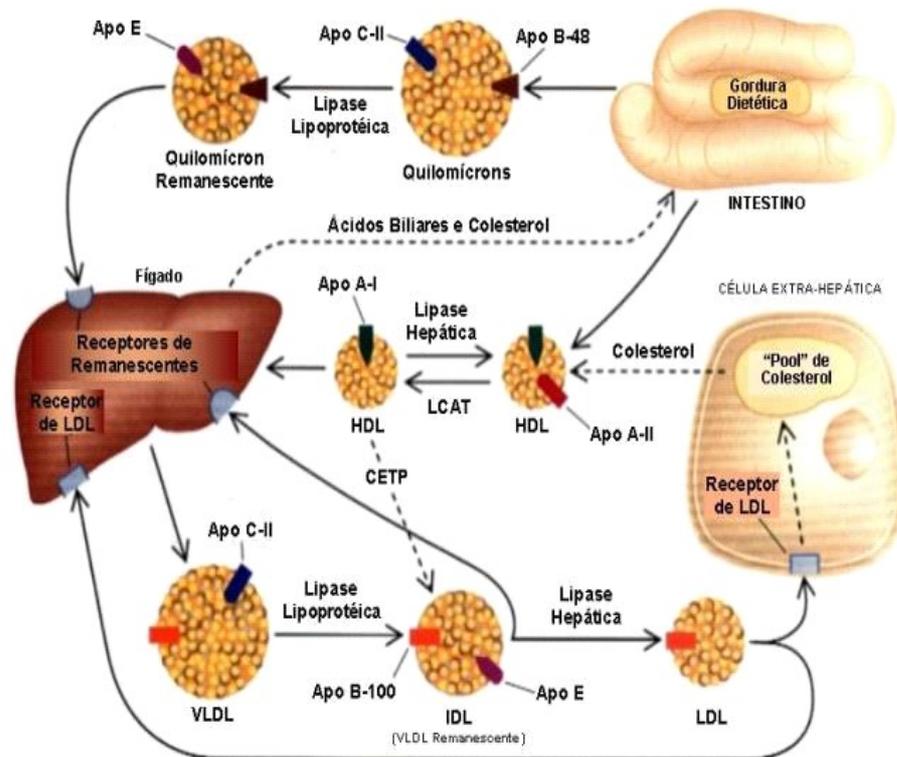


Figura 2 - O metabolismo das lipoproteínas. O intestino absorve os lipídeos da dieta em quilomícrons que contêm apo B-48. Lipase lipoprotéica, com seu cofator apo C-II, hidrolisa os QM que são captados pelo fígado pela ligação da apo E. O fígado secreta os lipídeos como VLDL com apo B-100. VLDL é hidrolisada em IDL, a qual pode ser captada pelo fígado. IDL também pode sofrer hidrólise pela lipase hepática e se tornar LDL. Células hepáticas e periféricas removem a LDL da circulação quando apo B-100 se liga ao receptor de LDL. HDL remove o excesso de colesterol das células para o fígado para excreção na bile. O metabolismo das lipoproteínas está simbolizado por linhas sólidas. O transporte de colesterol, quando não contido nas lipoproteínas, está indicado por linhas pontilhadas (modificada de RADER & WILSON, 1995).

A LDL é a principal condutora de colesterol na circulação humana, transporta ésteres de colesterol e vitamina E para os tecidos periféricos, cujas membranas apresentam os receptores B/E de LDL que reconhecem a apo-100. Além disso, significativa quantidade de LDL do plasma é eventualmente removida da circulação pelo fígado, também por interação apo B-100/receptor B/E. A entrada de LDL na célula é seguida por um ataque lisossômico, com conseqüente hidrólise da apo B-100 e do colesterol esterificado. O aumento da concentração intracelular de colesterol livre apresenta os seguintes efeitos regulatórios: inibição da enzima hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) redutase, impedindo a síntese de colesterol; inibição da síntese de receptores de LDL; estímulo da enzima acil-CoA colesterol aciltransferase (ACAT) para esterificação do colesterol citoplasmático – Figura 2 (RADER & WILSON, 1995; ALVAREZ – LEITE et al., 2003).

Não existe uma via de catabolismo de colesterol, sendo este eliminado pelo fígado como ácidos biliares secretados na bile (RADER & WILSON, 1995; ALVAREZ – LEITE et al., 2003). De acordo com ECKARDSTEIN et al. (2001), a HDL é responsável pelo transporte reverso de colesterol, que consiste na remoção do excesso de colesterol livre dos tecidos periféricos e de lipoproteínas para o fígado e subsequente depósito para excreção. As HDL nascentes são formadas por hepatócitos, pela mucosa intestinal e por remanescentes de lipoproteínas, cujas principais apoproteínas são apo A-I e apo A-II (ECKARDSTEIN et al., 2001). O colesterol livre, em contato com a HDL nascente, é substrato para a enzima plasmática lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) resultando na formação de ésteres de colesterol e aumento do tamanho da partícula de HDL. O colesterol esterificado pode ser transferido para as lipoproteínas que contêm apo B, pela proteína de transferência de éster de colesteril (CETP), e retornar para o fígado pelo receptor de LDL. A HDL ainda pode liberar colesterol diretamente para o fígado – Figura 2 (RADER & WILSON, 1995; ALVAREZ – LEITE et al., 2003).

As lipoproteínas podem ser aterogênicas ou anti-aterogênicas, dependendo da composição e das propriedades fisiológicas. O mais conhecido efeito protetor da HDL na aterosclerose é no transporte reverso de colesterol, citado anteriormente. Além disso, a HDL também desempenha importante papel como antioxidante e na função endotelial (LUSIS, 2000; ECKARDSTEIN et al., 2001; ASSMANN & GOTTO, 2004). Por sua vez, a LDL possui propriedades aterogênicas, visto que há evidente associação entre elevadas concentrações desta lipoproteína e o aumento da aterosclerose (STEFFENS & MACH, 2004). Conforme já citado, a LDL funciona como fonte de colesterol para os tecidos extra-hepáticos.

2.2. Radicais livres e estresse oxidativo

2.2.1. Espécies reativas de oxigênio, estresse oxidativo e peroxidação lipídica

O termo radical livre é freqüentemente usado para designar qualquer espécie química que contém um ou mais elétrons não pareados ocupando orbitais externos. Um elétron não pareado é aquele que ocupa um orbital atômico ou molecular isoladamente (STOKER & KEANEY, 2004).

Existem, entretanto, outras moléculas que não são necessariamente radicais livres, mas são agentes oxidantes (OPARA, 2006). Estas substâncias são classificadas de

maneira ampla como espécies reativas de oxigênio (ROS) ou espécies reativas de nitrogênio (RNS) (HALLIWELL, 1996).

O oxigênio é considerado o principal fornecedor de espécies reativas (LEITE & SARNI, 2003). Durante o metabolismo aeróbico mais de 95% do oxigênio consumido decorre da produção de energia nas mitocôndrias celulares; o restante, não sendo completamente reduzido à água, produz as espécies reativas de oxigênio numa seqüência de reações de oxi-redução (LEITE & SARNI, 2003; URSO & CLARKSON, 2003).

A completa redução do oxigênio à água requer quatro elétrons. A primeira redução do oxigênio molecular leva a formação do radical superóxido ($O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$) (GIORDANO, 2005; OPARA, 2006). Este, logo após a sua formação, pode desencadear outras reações gerando os radicais hidroxilas, além de reagir com o óxido nítrico (NO), formando peroxinitrito ($O_2^{\cdot-} + NO \rightarrow ONOO^{\cdot-}$) que se apresenta como potente radical livre (YANG et al., 2004; OPARA, 2006). A adição do segundo elétron e de dois íons de hidrogênio ao ânion superóxido resulta no peróxido de hidrogênio ($O_2^{\cdot-} + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$) (OPARA, 2006). A adição do terceiro elétron, como ocorre na reação de Fenton, resulta na produção do radical hidroxila ($H_2O_2 + Fe^{+2}/Cu^+ \rightarrow OH^{\cdot} + OH^- + Fe^{+3}/Cu^{+2}$). E finalmente, a adição do quarto elétron produz água. E ainda, há a reação do ânion superóxido com o peróxido de hidrogênio formando radical hidroxila e oxigênio molecular pela reação de Haber-Weiss ($H_2O_2 + O_2^{\cdot-} \rightarrow OH^{\cdot} + OH^- + O_2$) (GIORDANO, 2005).

As ROS podem ser formadas, também, por alguns mecanismos, como: produzidas pelas xantina oxidases, NAD(P)H oxidases, citocromo P450-oxidases, pela auto-oxidação de catecolaminas e lipoxigenases (MADAMANCHI et al., 2005; GIORDANO, 2005). Além disso, as ROS podem ser provenientes de fontes externas como dieta, poluentes do ar e cigarro (SCANDALIOS, 2005).

Em alguns processos biológicos as ROS exercem importante papel, estando envolvidas em vias de sinalização intracelular para a diferenciação celular e apoptose, na imunidade e na defesa contra microorganismos (MÁTES et al., 1999; GIORDANO, 2005).

No entanto, quando ocorre um desbalanço entre oxidantes e antioxidantes, em favor dos oxidantes, há o estresse oxidativo (STOKER & KEANEY, 2004). Nesta situação, as espécies reativas podem interagir com componentes celulares incluindo ácidos nucléicos, proteínas e lipídeos causando danos moleculares (SCANDALIOS, 2005).

Acredita-se que a atividade das ROS na parede vascular pode contribuir com a formação da LDL oxidada, um importante fator para a patogênese da aterosclerose

(GIORDANO, 2005). De acordo com MADAMANCHI et al. (2005), há evidências que células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos são fontes de ROS que modificam fosfolípidos e oxidam as LDL, além de estarem envolvidas na sinalização vascular para migração e proliferação celular durante a formação da lesão aterosclerótica.

Os ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular podem ser um alvo das ROS, desencadeando uma cadeia de reações químicas denominada peroxidação lipídica (URSO & CLARKSON, 2003).

O processo de peroxidação lipídica se inicia quando espécies reativas abstraem um átomo de hidrogênio do grupo metileno das cadeias de ácidos graxos poliinsaturados (LH) das membranas ou de partículas de lipoproteínas, formando o radical lipídico (L[•]). Este, por sua vez, sofre rearranjo molecular, formando um dieno conjugado que reage com oxigênio produzindo radical peróxil (LOO[•]), o qual na presença de um outro lipídeo (LH) ou outro doador de elétron, forma hidroperóxido lipídico (LOOH) e um outro radical lipídico (L[•]) - Figura 3 (SJODIN et al., 1990; BLOKHINA et al., 2003; STOKER & KEANEY, 2004).

O radical lipídico (L[•]) é reativo e pode iniciar a formação de novos radicais livres e assim, continuar a cascata de reações. E o hidroperóxido lipídico pode sofrer degradação catalisada por metais de transição e produzir ainda mais radicais reativos, como o radical peróxil (LOO[•]) ou o radical alcóxil (LO[•]) que irão continuar a reação em cadeia e produzir, como por exemplo, o malondialdeído – MDA, o pentano e o etano (SJODIN et al., 1990; BLOKHINA et al., 2003; STOKER & KEANEY, 2004).

Os aldeídos insaturados, dentre estes o malondialdeído, são dotados de capacidade de se ligarem covalentemente a grupos nucleofílicos presentes em DNA (ácido desoxirribonucléico), peptídeos e proteínas, provocando alterações nas funções dessas moléculas, fato que tem sugerido a implicação destes compostos em vários processos degenerativos (HALLIWELL & CHIRICO, 1993). Assim, o malondialdeído tem sido, freqüentemente, utilizado como marcador de peroxidação lipídica nos tecidos (SJODIN et al., 1990).

Há mecanismos celulares que contrabalançam a produção de ROS, incluindo vias enzimáticas e não-enzimáticas. As enzimas são, por exemplo, a catalase, a superóxido dismutase e a glutatona peroxidase, e os mecanismos antioxidantes não-enzimáticos, incluem vitaminas E e C, glutatona, ubiquinona e flavonóides (URSO & CLARKSON, 2003; GIORDANO, 2005).

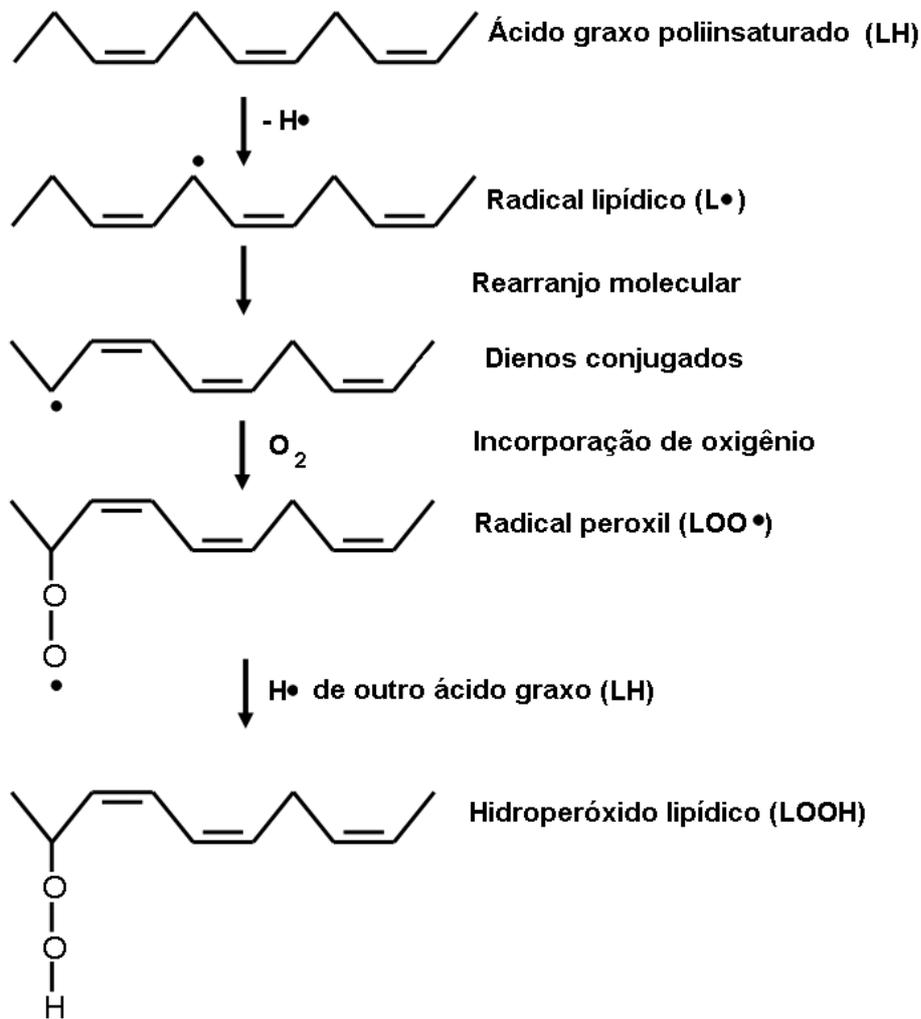


Figura 3 - Peroxidação lipídica: uma reação em cadeia (modificada de MAFRA et al., 1999).

2.2.2. Sistemas antioxidantes

A superóxido dismutase é uma enzima antioxidante que catalisa a dismutação do ânion superóxido a peróxido de hidrogênio num processo sucessivo de oxidação e redução dos metais de transição que compõem seu centro ativo ($O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$) (STOCKER & KEANEY, 2004).

Outra enzima é a catalase que tem como principal função a decomposição do peróxido de hidrogênio que ocorre em uma taxa extremamente rápida (COHEN et al., 1996). A catalase reage com peróxido de hidrogênio para formar água e oxigênio molecular ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$) (MATÉS & SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 1999).

Já a glutathiona peroxidase reduz o peróxido de hidrogênio ($\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O}$) e peróxidos lipídicos ($\text{ROOH} + 2 \text{GSH} \rightarrow \text{ROH} + \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O}$) à água e álcoois lipídicos, respectivamente (MATÉS & SÁNCHEZ - JIMÉNEZ, 1999).

Estudos recentes demonstraram que dietas com elevado conteúdo de vegetais e grãos podem reduzir o risco de inúmeras doenças, este fato é atribuído, principalmente, à presença de substâncias antioxidantes (BIANCHI & ANTUNES, 1999; LIU, 2003; PRIOR, 2003).

Os compostos presentes nos alimentos podem reagir diretamente com os radicais livres, levando à formação de produtos muito menos reativos, além de participarem na ativação de genes que codificam proteínas envolvidas no sistema enzimático antioxidante e/ou no silenciamento de genes que podem contribuir para a ocorrência do estresse oxidativo (SVILAAS et al., 2004).

Na última década, pesquisadores voltaram à atenção para os compostos fenólicos, principalmente, pelo reconhecimento de suas propriedades antioxidantes, pela abundância destes compostos na dieta e pelo possível papel na prevenção de diversas doenças associadas ao estresse oxidativo como o câncer, as doenças neurodegenerativas e as cardiovasculares (DUTHIE et al., 2000; MANACH et al., 2004; KWON et al., 2005).

Os compostos fenólicos são estruturas que possuem anel aromático e grupos hidroxilas ligados ao mesmo, sendo classificados em diferentes grupos, dentre os quais os flavonóides assumem papel de destaque (MANACH et al., 2004). A família dos flavonóides compreende membros das classes das flavonas, isoflavonas, flavonol e flavanonas (ERLUND, 2004). A atividade antioxidante dos flavonóides depende, basicamente, da capacidade de atuarem como quelante de metais e de seqüestrarem espécies reativas, devido à sua estrutura química (CESQUINI, 2001).

2.3. Aterosclerose

A aterosclerose consiste em uma complexa e crônica inflamação que ocorre nas artérias de médio e grande calibre (BERLINER et al., 1995 e VANDERLAAN et al., 2004), associada a fatores de risco como, hiperlipidemia (BINDER et al., 2002; VANDERLAAN et al., 2004), hipertensão (KATZMARZYK et al., 2001; SMITH, 2001; BINDER et al., 2002), diabetes (BINDER et al., 2002), idade (BINDER et al., 2002), tabagismo (ROSS & GLOMSET, 1973; KATZMARZYK et al., 2001; BINDER et al., 2002), sedentarismo

(KATZMARZYK et al., 2001), obesidade (KATZMARZYK et al., 2001; SMITH, 2001), dentre outros.

De acordo com STEINBERG (2002) a inflamação é uma resposta a um agente que desestabiliza a homeostase do local envolvido. A hipótese oxidativa da aterosclerose, segundo WITZTUM (1993), sugere que o processo aterosclerótico possa ser iniciado por danos no endotélio vascular, produzido por modificações oxidativas da LDL. Esta injúria leva a alterações do endotélio que desencadeiam interações celulares com monócitos, plaquetas, células musculares lisas e linfócitos, tendo-se início a lesão aterosclerótica (ROSS, 1999). De acordo com ROSS (1995) a lesão ocorre em três estágios: estria gordurosa, intermediária ou fibrogordurosa e placa fibrosa.

Altas concentrações plasmáticas de LDL podem levar à infiltração e retenção da LDL na matriz subendotelial. As partículas de LDL difundem-se passivamente através das células endoteliais e sua retenção na parede do vaso envolve interações entre a apolipoproteína B, presente nesta lipoproteína, e os proteoglicanos da matriz subendotelial (LUSIS, 2000). A LDL nativa não é captada pelos macrófagos para iniciar o processo aterosclerótico. Entretanto, a LDL aprisionada na íntima pode ser oxidada por espécies reativas de oxigênio (ROS), produzidas por células endoteliais, macrófagos residentes e células musculares lisas – Figura 4 (STEFFENS & MACH, 2004).

A oxidação da LDL parece ocorrer em dois estágios: o primeiro, ocorre antes que os monócitos sejam recrutados e resulta da oxidação dos lipídeos da LDL, com pequena alteração na apo B (BERLINER et al., 1995). Neste estágio, a LDL apresenta-se minimamente oxidada (LDL_{mm}) (GLASS & WITZUM, 2001) e exerce papel importante no aumento da aderência de leucócitos (como monócitos/macrófagos e linfócitos-T) para a parede vascular (STEFFENS & MACH, 2004), estimulando as células endoteliais a produzirem moléculas pró-inflamatórias, incluindo moléculas de adesão e fatores de crescimento, como o fator estimulador de colônia de macrófago (M-CSF) – Figura 4 (LUSIS, 2000).

O segundo estágio de oxidação da LDL, formando LDL oxidada, ocorre quando monócitos são recrutados para a lesão e convertidos em macrófagos, contribuindo com sua enorme capacidade oxidativa. Nesta fase, os lipídeos da LDL são adicionalmente oxidados e a parte protéica também é modificada, impedindo o reconhecimento da lipoproteína pelo receptor de LDL, tornando-a reconhecível apenas pelos receptores *scavengers* (removedores) presentes nos macrófagos e células musculares lisas – Figura 4 (BERLINER et al., 1995).

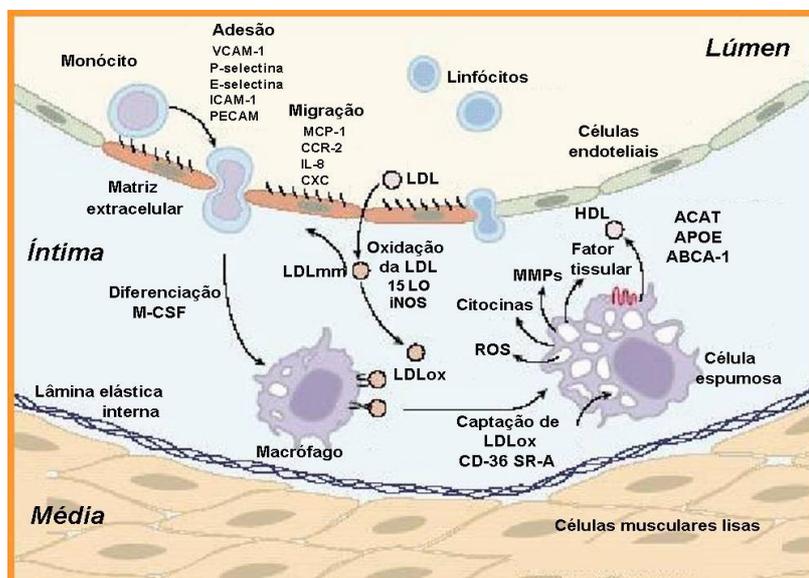


Figura 4 - Eventos de iniciação no desenvolvimento de estrias gordurosas. LDL é submetida a modificações oxidativas no espaço subendotelial, progredindo de LDL minimamente oxidada (LDLmm) para extensivamente oxidada (LDLox). Monócitos aderem às células endoteliais que foram induzidas a expressarem moléculas de adesão por LDLmm e citocinas inflamatórias. Monócitos aderidos migram para o espaço subendotelial e se diferenciam em macrófagos. A capturação de LDL oxidada via receptores *scavengers* proporcionam a formação de células espumosas. O colesterol captado da LDLox pelos receptores *scavengers* é submetido a esterificação e estocado em gotas lipídicas, podendo ser convertido em formas mais solúveis, ou exportado para HDL extracelular via transportadores de colesterol, tais como ABCA-1 (modificada de SCOTT, 2004).

Os receptores *scavengers*, tais como SRA-I, SRA-II e CD36, estão presentes na superfície dos macrófagos e células musculares lisas da parede arterial e não sofrem regulação negativa, isto é, sua expressão não é regulada pelo conteúdo intracelular de colesterol (STEINBERG, 2002). Deste modo, a interação de LDL oxidada com os receptores *scavengers* resulta na rápida capturação dessa lipoproteína pelos macrófagos. A LDLox é degradada intracelularmente, o colesterol livre é esterificado e em seguida armazenado nas gotas lipídicas, conferindo às células o aspecto de espuma (YANG et al., 1996; STEINBERG, 1997). O resultado é o grande acúmulo de colesterol e a formação de células espumosas, originando a primeira lesão da aterosclerose: a estria gordurosa - Figura 4 (MITCHINSON & BALL, 1987).

A disfunção endotelial, provocada pela hipercolesterolemia, leva ao recrutamento focal de monócitos e linfócitos, uma das primeiras respostas vasculares detectáveis na formação da lesão aterosclerótica. Este recrutamento é controlado pelas moléculas de adesão, que são expressas no endotélio e nas células de defesa, circulantes na corrente sanguínea (NAKASHIMA et al., 1998). Dentre as moléculas de adesão, as selectinas,

como E-selectina e P-selectina, medeiam o rolamento inicial de células inflamatórias ao longo do endotélio (DONG et al., 1998). A adesão firme de monócitos e células T ao endotélio pode ser realizada pelas interações entre as integrinas LFA-1 e Mac-1 e moléculas-1 de adesão intercelular (ICAMs-1), e entre a integrina VLA-4 e a molécula-1 de adesão da célula vascular (VCAM-1) - Figura 4 (CYBULSKY & GIMBRONE, 1991; ULBRICH et al., 2003).

Embora o recrutamento de macrófago, induzido pelo fator de crescimento M-CSF, possa inicialmente servir como função protetora, por remover partículas de LDL oxidada ou células apoptóticas, o acúmulo progressivo e a ativação de macrófagos na parede do vaso são responsáveis por um importante passo para a formação da placa aterosclerótica (BERLINER et al., 1995; HANSSON, 2005). A ativação do macrófago promove a liberação de citocinas, quimiocinas, proteases e radicais de oxigênio, e irá provocar mais inflamação e dano ao tecido, contribuindo para o desenvolvimento da lesão - Figura 4 (MILLER et al., 2003).

A transição de estria gordurosa, relativamente simples, para lesão fibrogordura, é caracterizada pela migração de células musculares lisas da camada média da parede arterial para a íntima ou espaço subendotelial. Estas podem proliferar e captar lipoproteínas modificadas, contribuindo para a formação de células espumosas, além da capacidade de sintetizar proteínas da matriz extracelular, que leva a formação da capa fibrosa, particularmente colágeno (GLASS & WITZTUM, 2001) e ser fonte de mediadores inflamatórios, como MCP-1 (proteína quimiotática para monócitos) (NELKEN et al., 1991). A proliferação e a migração de células musculares lisas é provocada por fatores de crescimento e citocinas produzidos por macrófagos, células T, e células endoteliais (RAINES & ROSS, 1993). Esta fase de desenvolvimento da lesão é influenciada por interações entre monócitos/macrófagos e células T que resultam na aquisição de características de estado inflamatório crônico. Estas lesões desenvolvem um núcleo de material rico em lipídeos, sugerindo que elas representam um precursor para lesões mais avançadas, as placas fibrosas (ROSS, 1995).

As Placas maduras ou fibrosas apresentam uma estrutura mais complexa. No centro da placa, estão presentes as células espumosas, os lipídeos extracelulares e as células necróticas, envolvidos por uma capa de células musculares lisas e fibras de colágeno. Outros tipos celulares que formam a placa são as células dendríticas, os mastócitos e poucas células B. Na interface da capa e do centro da placa, apresentam-se macrófagos e células T em abundância (HANSSON & LIBBY, 2006). Calcificações são encontradas próximas ao centro necrótico. A capa fibrosa pode variar de espessura,

sendo mais delgada nas regiões laterais e margens da lesão. A formação de lesões avançadas é usualmente associada a uma contínua diminuição na espessura da camada média da artéria, resultante da migração de células musculares lisas para a camada íntima durante a progressão da doença (ROSS, 1995).

A ruptura da placa aterosclerótica expõe material pró-trombótico ao sangue, podendo este processo ser determinado pela estabilidade das mesmas. As lesões estáveis são mais resistentes e se caracterizam por células musculares lisas envoltas de densa matriz de colágeno, com baixo conteúdo de células inflamatórias e lipídeos no centro necrótico. Por outro lado, as regiões onde as lesões apresentam volumoso centro necrótico e um grande infiltrado de células inflamatórias, capa fibrosa frágil e fina, com pouca quantidade de colágeno, são mais susceptíveis à ruptura, caracterizando lesões instáveis (DAVIES et al., 1993; LEE & LIBBY, 1997).

2.4. Receptor de LDL e o metabolismo de colesterol

O receptor de LDL é uma glicoproteína expressa na maioria das células com núcleo, em especial no fígado. Esses receptores reconhecem a apoproteína B (apo B-100), presente na LDL, e a apoproteína E, presente na IDL e HDL, removendo essas lipoproteínas da circulação por meio de um processo de alta afinidade de ligação e internalização (BRESLOW, 1996; JEON & BLACKLOW, 2005), regulando assim, o nível de colesterol plasmático (ISHIBASHI et al., 1993).

Inicialmente, no metabolismo celular da partícula de LDL, a apo B-100 da superfície liga-se ao receptor de LDL, que está localizado em regiões denominadas de fossetas revestidas, que contêm clatrina. Em seguida, o complexo receptor-LDL é internalizado por endocitose formando as vesículas endocíticas (endossomos). O endossomo possui pH ácido, o que permite que a LDL se dissocie do receptor de LDL. Este é reciclado, podendo retornar à superfície da célula e iniciar outro ciclo de endocitose. A LDL, por sua vez, é entregue ao lisossomo quando as membranas do endossomo e do lisossomo se fundem. Os componentes protéicos da LDL são hidrolisados a aminoácidos e os ésteres de colesterol à colesterol livre o qual é transferido para um compartimento celular onde pode associar-se às membranas celulares. O acúmulo de colesterol não esterificado dentro da célula regula a atividade de duas enzimas: inibe a 3-hidróxi-3-metilglutaril coenzima A redutase, levando a uma redução da síntese de colesterol, e ativa a acil-CoA colesteril aciltransferase, facilitando sua própria reesterificação e estocagem (JEON & BLACKLOW,

2005). As etapas da captação do colesterol pela via do receptor de LDL estão representadas na Figura 7.

Defeitos genéticos no receptor de LDL produzem aumento sérico do colesterol em humanos com desenvolvimento da hipercolesterolemia familiar, uma doença que predispõe às doenças cardiovasculares em pessoas ainda jovens (ISHIBASHI et al., 1993; JEON & BLACKLOW, 2005).

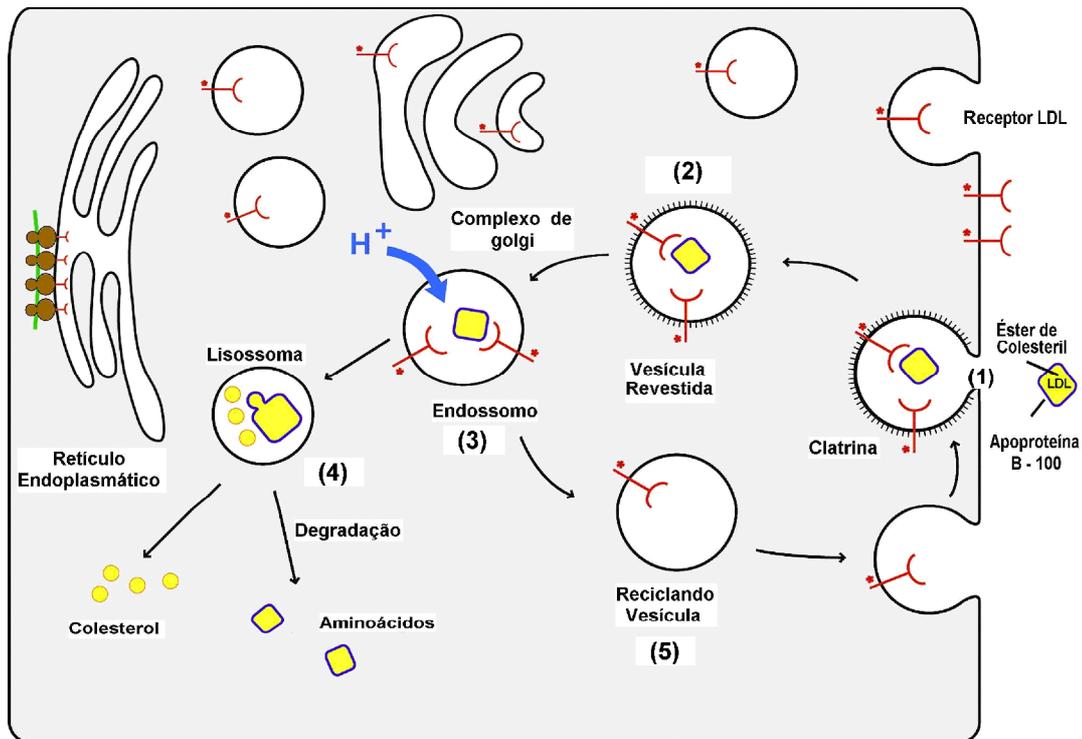


Figura 5 - Passos sequenciais na via do receptor de LDL. (1) ligação da LDL ao receptor → (2) internalização da LDL → (3) formação dos endossomos → (4) hidrólise dos componentes → (5) reciclagem dos receptores (modificada de JEON & BLACKLOW, 2005).

2.5. Camundongo LDLr^{-/-}

Os Camundongos selvagens são altamente resistentes ao desenvolvimento de aterosclerose (BRESLOW, 1996; JAWIEN et al., 2004), tendo como principal fator as altas concentrações de HDLc. Uma vez que, esta é responsável pelo transporte de mais de 85% do colesterol plasmático de camundongos, enquanto que em humanos a principal lipoproteína carreadora de colesterol é a LDL (65-85%) (BRESLOW, 1996; HOFKER et al., 1998; NEUZIL et al., 1998; FAZIO & LINTON, 2001).

Embora não muito bem entendida, a diferença entre camundongos e humanos é devido à alguns fatores conhecidos, tais como: ausência da CETP (proteína de transferência de ésteres de colesterol) no plasma de camundongos (em humanos, ela transfere ésteres de colesterol da HDL para VLDL e triacilgliceróis na direção oposta); lipase hepática, a qual é ligada à membrana em humanos e solúveis em camundongos; reduzida síntese de apo B-100 em camundongos; alta eficiência da apo E murina, quando comparada com a apo E humana, no que diz respeito à remoção de lipoproteínas remanescentes (FAZIO & LINTON, 2001). Apesar destas diferenças, camundongos e seres humanos possuem, com poucas exceções, o mesmo conjunto de genes que controlam o metabolismo de lipoproteínas (HOFKER et al., 1998).

Entretanto, quando esses camundongos são geneticamente deficientes (*knockout*), para o gene da apoproteína E ou para o gene do receptor de LDL, desenvolvem placas ateroscleróticas (MEIR & LEITERSDORF, 2004). As lesões ateroscleróticas, nestes animais, têm sido extensivamente caracterizadas e apresentam semelhanças com as encontradas em humanos (PALINSKI et al., 1994).

O camundongo LDLr^{-/-} foi criado através da remoção do gene para o receptor de LDL para induzir altas concentrações séricas das lipoproteínas aterogênicas, LDL e IDL. Uma vez que possui o *clearance* de LDL, VLDL e IDL plasmáticos diminuídos (BRESLOW, 1996), estes animais têm sido extensivamente usados para estudar os mecanismos aterogênicos, ensaios de intervenção de medicamentos e para investigar o papel do sistema imune na aterosclerose (FAZIO & LINTON, 2001).

Em resposta a uma dieta comercial, esses animais desenvolvem hipercolesterolemia moderada com concentrações de colesterol de aproximadamente 250 mg/dL, devido primariamente ao acúmulo de LDL e não desenvolvem lesões ateroscleróticas avançadas (ISHIBASHI et al., 1994). Contudo, quando alimentados com dieta aterogênica, esses animais desenvolvem grave hipercolesterolemia, com níveis de colesterol entre 1000-1200 mg/dL e graves lesões ateroscleróticas ao longo da árvore aórtica (FAZIO & LINTON, 2001). Já em humanos, a falta desse receptor leva a hipercolesterolemia familiar homozigótica, na qual as concentrações de LDL no plasma aproximam-se de 1000 mg/dL (FAZIO & LINTON, 2001).

As manifestações patológicas relativamente leves nos camundongos LDLr^{-/-}, alimentados com ração comercial, são provavelmente atribuídas ao fato destes animais não alcançarem as concentrações de colesterol observadas em humanos com hipercolesterolemia familiar homozigótica. Tal diferença pode ser explicada pelo fato do fígado destes camundongos, diferente ao do humano, produzir duas versões da

apolipoproteína B, apo B-100 e apo B-48, ambas sendo incorporadas na VLDL. Em humanos e camundongos, as VLDL que apresentam apo B-100 fornecem partículas remanescentes contendo apo B-100 (IDL) que são retiradas do plasma pelos receptores de LDL. O fígado de camundongos também produz VLDL contendo apo B-48, diferente de humanos, onde tal partícula é secretada somente no intestino compondo os QM. Lipoproteínas contendo apo B-48 geram remanescentes que podem se ligar a um segundo receptor, designado como receptor para quilomícron remanescente. Os quilomícrons remanescentes e remanescentes de VLDL, que apresentam a apo B-48, são retirados rapidamente da circulação mesmo quando os receptores de LDL estão ausentes. Essa retirada de circulação é atribuída à capacidade das partículas de apo B-48 aceitar apo E, que se liga aos receptores de remanescentes de QM. No camundongo $LDLr^{-/-}$ aproximadamente 70% da apo B hepática está na forma de apo B-48 e, acredita-se que isso possa contribuir para a pouca elevação das concentrações de LDL nestes animais alimentados com dieta comercial (ISHIBASHI et al., 1994).

2.6. Exercício físico

Segundo SHEPHARD & BALADY (1999) e THOMPSON et al. (2003), a atividade física pode ser definida como um movimento físico produzido pelos músculos esqueléticos que resulta em gasto energético pelo organismo; e o exercício físico como uma atividade física estruturada e de repetição que visa a melhora ou manutenção dos condicionamento cardiorespiratório e físico, incluindo a força muscular, a composição corporal e a flexibilidade. A magnitude das respostas para o exercício físico depende da duração, da frequência, do tipo e da intensidade do mesmo (SHEPHARD & BALADY, 1999; JONES & CARTER, 2000).

De acordo com THOMPSON et al. (2003), os exercícios de intensidade moderada são aqueles cujo desempenho corresponde a 40-60% do $VO_{2máx}$ (volume máximo de oxigênio), que reflete a capacidade máxima individual de gasto energético aeróbico (JONES & CARTER, 2000), ou de 4 a 6 METs (equivalente metabólico), sendo que um MET é equivalente a taxa de consumo metabólico de aproximadamente $3,5 \text{ mL.O}_2.\text{kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Já os de intensidade vigorosa são os que o $VO_{2máx}$ é maior que 60% ou que a atividade represente mais de 6 METs.

A fonte imediata de energia para a contração muscular é o trifosfato de adenosina (ATP), entretanto as células musculares armazenam quantidades limitadas desta

molécula (MCMAHON & JENKINS, 2002; SJODIN et al., 1990). Como o exercício físico requer um suprimento constante de ATP, existem vias metabólicas celulares com capacidade de produção rápida: formação de ATP pela degradação da creatina fosfato; da glicose ou do glicogênio (denominada glicólise) e formação oxidativa da ATP. Nos dois primeiros processos não há utilização de O₂, sendo denominada via anaeróbica. Já na formação oxidativa o metabolismo é aeróbico (ASHE & KHAN et al., 2004).

Em geral, quanto mais curta a atividade e de alta intensidade, maior a contribuição da produção anaeróbica de energia. Em contraste, as atividades prolongadas (maior que 10 minutos) de intensidade baixa a moderada utilizam a ATP proveniente de fontes aeróbicas (POWERS & HOWLEY, 2000; ASHE & KHAN et al., 2004).

A duração de exercício recomendada pelo Colégio Americano de Medicina dos Esportes para prevenção de doenças cardiovasculares é de 20 a 60 minutos de atividade aeróbica contínua ou intermitente (sessões mínimas de 10 minutos acumuladas no transcorrer do dia), com frequência de execução de 3 a 5 dias por semana (BALADY et al., 2003) e de intensidade moderada (THOMPSON et al., 2003).

O exercício físico, predominantemente aeróbico (LEON, 2000; NAPOLI et al., 2006) e de intensidade moderada (SMITH, 2001; NAPOLI et al., 2006), realizado regularmente (BENÍTEZ et al., 2002; PYNN et al., 2004; YANG & CHEN, 2003), pode promover adaptações fisiológicas e bioquímicas, prevenindo o desenvolvimento de doença cardiovascular, incluindo aterosclerose (SHEPHARD & BALADY, 1999; THOMPSON et al., 2003). Dentre estas alterações estão o aumento da sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose (SMITH, 2001; THIRUNAVUKKARASU et al., 2003); a redução da pressão arterial (SMITH, 2001; BENÍTEZ et al., 2002), do peso corporal (SMITH, 2001) e de triacilgliceróis (LEAF, 2003); melhora do perfil de lipoproteínas (SMITH, 2001; BENÍTEZ et al., 2002), como o aumento das concentrações plasmáticas de HDL (SMITH, 2001; LEAF, 2003) e redução de VLDL (BENÍTEZ et al., 2002). Todavia, o mecanismo pelo qual o exercício promove a redução do risco para a aterogênese não está totalmente esclarecido (MEILHAC et al., 2001).

Uma explicação para a redução de eventos coronarianos associados ao exercício físico crônico, diz respeito ao aumento do débito cardíaco que ocorre durante o exercício que aumentaria a força de cisalhamento (*shear stress*) sobre a parede vascular e assim, gerando o aumento da expressão de óxido nítrico pelo endotélio vascular (GREEN et al., 2004; PRIOR et al., 2004; MARSH & COOMBES, 2005).

O endotélio atua na manutenção do tônus vascular através da liberação de endotelina, prostaglandinas e óxido nítrico. Este último mantém a superfície dos vasos

não trombogênica e não aderente às plaquetas e leucócitos, inibindo a aderência de células à parede arterial e a migração e proliferação de células musculares lisas, além de inibir a oxidação da LDL (SMITH, 2001; YANG & CHEN, 2003).

Deste modo, o aumento de óxido nítrico com o exercício físico é benéfico para a redução de doenças cardiovasculares. Uma vez que, a redução na síntese ou na disponibilidade local de óxido nítrico tem sido frequentemente relacionada como a principal responsável pela disfunção endotelial, a qual caracteriza-se por ser um dos primeiros passos para o início da aterosclerose (GREEN et al., 2004; PRIOR et al., 2004; MARSH & COOMBES, 2005).

Em humanos saudáveis quatro semanas de treinamento físico melhoram o óxido nítrico basal relacionado com a função endotelial. Já em animais, pode melhorar com apenas sete dias de exercício físico (GREEN et al., 2004).

O exercício físico de intensidade moderada, longa duração, regular e crônico também está associado ao aumento da geração de espécies reativas de oxigênio no metabolismo aeróbico, principalmente devido, ao aumento do consumo de oxigênio pelos tecidos ativos (MEILHAC et al., 2001, SMITH, 2001; COOPER et al., 2002). Além disto, durante o exercício a produção de radicais livres também pode estar relacionada ao aumento da liberação de catecolaminas e sua auto-oxidação e ao aumento do metabolismo das enzimas xantina oxidase e NADPH oxidases (COOPER et al., 2002; URSO & CLARKSON, 2003). Ocorrendo, deste modo, o estresse oxidativo (SHERNBREWER et al., 1998; MEILHAC et al., 2001). No entanto, progressivas adaptações ao exercício podem diminuir-lo, como o aumento da atividade de enzimas antioxidantes em diferentes tecidos, como coração, fígado, sangue e músculo (MEILHAC et al., 2001; LAUFS et al., 2005).

2.7. Soja

A soja (*Glycine max*) é uma leguminosa que é tradicionalmente usada para preparar tanto alimentos fermentados, quanto não fermentados (OMONI & ALUKO, 2005). O grão da soja é rico em proteínas, aproximadamente 40%, quando comparado a outras leguminosas, que geralmente contém de 20% a 30%. A soja também contém uma quantidade de componentes fisiologicamente ativos, incluindo aminoácidos e componentes não protéicos, como inibidores de proteases, fitato, saponinas e isoflavonas (HASLER, 2002; DEWEL et al., 2006).

A soja e os seus constituintes fisiologicamente ativos têm sido investigados na prevenção de vários tipos de câncer, assim como na osteoporose, diabetes, doença renal, síndrome da menopausa e doenças cardiovasculares. Entretanto, os componentes da soja responsáveis por estes efeitos e os mecanismos envolvidos são incertos, sendo que maior atenção tem sido atribuída às isoflavonas (WAGNER et al., 2003; ADAMS et al., 2004; OMONI & ALUKO, 2005).

As isoflavonas apresentam-se em quatro formas químicas, somando assim 12 isômeros: as agliconas daidzeína, genisteína e gliciteína; os β -glicosídeos daidzina, genistina e glicitina; e os conjugados malonil-glicosídeos e acetil-glicosídeos (GÓES-FAVONI et al., 2004, OMONI & ALUKO, 2005; BARBOSA et al., 2006).

A presença e a concentração das isoflavonas nos produtos à base de soja (extratos hidrossolúveis, farinhas desengorduras, isolados e texturizados protéicos, dentre outros) dependem das condições de processamento, principalmente a temperatura de tratamento do material. As principais isoflavonas presentes na soja não-processada, malonilgenistina, genistina, malonildaidzina e daidzina, são transformadas para outras formas durante o processamento, tais como acetilglicosídeos e agliconas (GÓES-FAVONI et al., 2004, OMONI & ALUKO, 2005; BARBOSA et al., 2006).

As isoflavonas compõem uma classe de fitoestrogênios e representam uma subclasse dos flavonóides (ERLUND, 2004). A daidzeína (Figura 8A) e a genisteína (Figura 8B), que são as principais isoflavonas da soja, possuem estrutura química similar a do hormônio 17β -estradiol. Esta semelhança se deve a presença do anel fenólico e a distância entre os grupos hidroxilas, que são considerados pré-requisitos para a ligação ao receptor de estrogênio ($ER\alpha$ e $ER\beta$) (CASSIDY et al. 2000; DEWEL et al., 2006), o que justifica a hipótese que as isoflavonas podem ser responsáveis pelo efeito hipocolesterolêmico da soja, relatado na literatura (HASLER, 2002; DEWEL et al., 2006).

Adicionalmente, as isoflavonas da soja têm atividade antioxidante, devido a sua estrutura química, agindo como removedores de radicais livres e/ou quelando íons metálicos, podendo desse modo, inibir o início e a progressão da aterosclerose (ARORA et al., 1998). A capacidade antioxidante das isoflavonas foi relacionada ao número de grupos hidroxilas presente em sua estrutura. Entre as três agliconas, a genisteína apresenta a maior capacidade antioxidante (BARBOSA et al., 2006).



Figura 6 - Estruturas químicas. A da daidzeína e B da genisteína (HASLER, 2002).

Entretanto, há outras evidências que não apenas as isoflavonas, mas também a proteína de soja ou a ação em conjunto de ambas podem ter efeitos benéficos sobre as concentrações de lipoproteínas e lipídeos plasmáticos, reduzindo LDLc, triacilgliceróis e, possivelmente, aumentando HDLc (ANDERSON et al., 1995; CROUSE et al., 1999; ANTHONY, 2000). Além de exercerem influência em células e em processos implicados na aterosclerose, por exemplo, a migração e a proliferação de células arteriais musculares lisas e a agregação e a ativação de plaquetas e possivelmente, alguns destes efeitos mediados pelo receptor ERB na parede vascular (ADAMS et al., 2002; ANTHONY, 2000).

De acordo com TORRES et al. (2006), possivelmente, o efeito da proteína de soja seria na redução da razão insulina/glucagon, produzindo profundas alterações na expressão de genes do metabolismo intermediário, uma vez que estes hormônios são controladores da biossíntese de colesterol e triacilgliceróis no fígado, modulando a atividade e a expressão de enzimas envolvidas na síntese e captação de colesterol, bem como na síntese de ácidos graxos. A diminuição da razão insulina/glucagon se deve ao fato das plantas possuírem altas quantidades absolutas de aminoácidos, como arginina, glicina e alanina, enquanto a proteína animal apresenta altas quantidades de lisina, sendo que uma elevada razão arginina/lisina esta associada ao aumento de concentração de glucagon.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cuidados Éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Federal Minas Gerais (CETEA/UFMG), nº do protocolo: 100/05.

3.2. Animais e desenho experimental

Foram utilizados camundongos deficientes (*knock out*) do gene para o receptor de LDL (LDLr^{-/-}) com idade de nove a dez semanas, os quais foram obtidos e mantidos no Biotério Ênio Cardillo Vieira do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais ficaram em gaiolas coletivas, em ambiente com ciclos de luminosidade de 12 horas (7:00 às 19:00).

Os animais foram separados de modo a obter grupos homogêneos quanto ao peso corporal e as concentrações iniciais de colesterol total plasmático. Os camundongos foram divididos em: grupo que não realizou exercício físico e recebeu dieta controle (CT; n=8); grupo que realizou exercício físico e recebeu dieta controle (EX; n=8); grupo que não realizou exercício físico e recebeu dieta contendo extrato de soja (ES; n=8); grupo que realizou exercício físico e recebeu dieta contendo extrato de soja (EX+ES; n=8), houve perda do “n” amostral para alguns parâmetros analisados durante os experimentos. A duração do experimento foi de seis semanas.

3.3. Protocolo de natação

O protocolo de natação foi baseado naqueles descritos por OH-SHI et al. (1996) e NAKAO et al. (2000).

Os animais que realizavam exercício físico foram submetidos a seis semanas de natação, cinco dias/semana. O tempo inicial do exercício foi de 10 minutos prolongados por mais 10 min diários até que nadassem continuamente por 1 hora. Os animais

nadavam coletivamente, em média seis animais, sendo que a temperatura da água permanecia em $34 \pm 1^\circ\text{C}$.

Já os animais dos grupos controles (sem exercício físico) foram apenas colocados na água e rapidamente retirados.

Todos os camundongos eram secos com toalhas e permaneciam em gaiolas sob luz quente até estarem totalmente secos.

3.4 – Dieta

Todos os animais consumiram, antes de serem divididos nos grupos experimentais, dieta controle aterogênica por quatro dias para que houvesse aumento das concentrações plasmáticas de colesterol total. A composição da dieta foi baseada na padrão AIN93G para roedores (REEVES et al., 1993), acrescida de colesterol.

Durante o experimento, os animais dos quatro grupos experimentais receberam dieta controle ou dieta contendo extrato de soja, sendo ambas acrescidas de colesterol e isocalóricas. O extrato de soja solúvel utilizado foi obtido de mercado popular em pacotes fechados (contendo 500 gramas) da marca Adicel Indústria e Comércio. A composição das dietas e do extrato de soja estão representados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Os animais tiveram livre acesso à água e à comida.

Tabela 1 - Composição das dietas.

INGREDIENTES	DIETA CONTROLE*: AIN 93G (quantidade em gramas)	DIETA CONTENDO EXTRATO DE SOJA* (quantidade em gramas)
CASEÍNA	200	94,2
METIONINA	3	3
AMIDO DE MILHO	529,5	464,1
SACAROSE	100	100
CELULOSE	50	25
ÓLEO DE SOJA	70	16,2
MIX MINERAIS	35	35
MIX VITAMINAS	10	10
BIT. DE COLINA	2,5	2,5
EXTRATO DE SOJA	0	250

* Ambas dietas acrescidas com 1,25 % de colesterol e 0,014% de BHT.

Tabela 2 - Composição do extrato de soja.

CONSTITUINTES	QUANTIDADE (g/250g de extrato de soja)
PROTEÍNAS	105,80
CARBOIDRATOS	65,40
GORDURAS	53,80
FIBRAS	25,00
ISOFLAVONAS	0,25

3.5 – Controle de peso corporal e do consumo alimentar

Semanalmente, os camundongos foram pesados para observar o crescimento ponderal e o efeito do exercício físico e do extrato de soja sobre o peso, também foi realizada a quantificação do consumo alimentar. Para isto, as dietas ofertadas aos animais foram pesadas no início e no final de cada semana, sendo que a diferença entre dieta ofertada e o restante não consumido e de restos no fundo da gaiola forneceram o consumo de dieta semanal.

3.6. Amostras de sangue

No início do experimento, após jejum de 8 a 10 horas, amostras de sangue foram retiradas da veia caudal em microtubos heparinizados. Já ao final das seis semanas, após o mesmo período de jejum e aplicação da anestesia intraperitoneal de uma solução de ketamina (130 mg/kg) e xilazina (0,3 mg/kg), os animais foram sacrificados por exangüinação pela artéria femural sem anticoagulante.

O plasma e o soro foram separados, após centrifugação a 6000 rpm por cinco minutos, em centrífuga de mesa Fanem Centrimicro 243. Estes ficaram armazenados à -70°C para análises posteriores.

3.6.1. Determinação das concentrações de colesterol total

As concentrações de colesterol total foram medidas de acordo com o método da colesterol oxidase (ALLAIN et al., 1974), utilizando kit comercial Doles, Brasil. O método consiste na hidrólise de ésteres de colesterol pela colesterol esterase produzindo

colesterol livre. Este, em presença da colesterol oxidase e de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio que pela ação da peroxidase em presença de fenol e 4-aminoantipirina produz um composto róseo-avermelhado com absorção máxima em 500 nm.

As concentrações de colesterol no soro ou plasma dos animais foram determinadas por um ensaio em microplaca de 96 poços, de acordo com FAZIO et al. (1997). Resumindo, 5 µL das amostras de soro foram diluídos em água destilada (1:200), a fim de que as leituras de absorbância fossem adequadas à variação linear do teste. Cem microlitros de reagente de colesterol total foram adicionados a 100 µL do soro diluído. Após um período de incubação de 10 minutos à 37°C, a absorbância foi lida a 492 nm em um leitor de microplaca (Modelar Devices, modelo Spectra Max Plus). As dosagens foram feitas em duplicatas.

Para a determinação da concentração de colesterol total foi realizada uma curva padrão de acordo com as diluições demonstradas na Tabela 2, sendo utilizados 200 µL de cada diluição. Considerou-se a concentração de colesterol no padrão de 200 mg/dL.

Tabela 3 - Diluições para a determinação da curva padrão de colesterol total.

Concentrações	Solução Padrão	H2O destilada
1,0 mg/dL	5 µL	995,0 µL
2,0 mg/dL	10 µL	990,0 µL
4,0 mg/dL	20 µL	980,0 µL
6,0 mg/dL	30 µL	970,0 µL
8,0 mg/dL	40 µL	960,0 µL
10,0 mg/dL	50 µL	950,0 µL

3.6.2. Determinação das concentrações de HDL-Colesterol

As concentrações de colesterol HDL no soro foram dosadas por meio do kit enzimático Doles, Brasil. O princípio se baseia na precipitação seletiva de LDL e VLDL por polietilenoglicol tamponado (PEG 6000), restando apenas a fração HDL no sobrenadante.

O sobrenadante foi separado em uma microplaca de 96 poços, sendo 10 µL da amostra adicionados a 200 µL do reagente de cor Colesterol 250 Doles/Colesterol Enzimático Líquido Doles. Após incubação de 10 minutos à 37°C, a absorbância foi lida a 492 nm em leitor de microplaca (Thermo Plate). As dosagens foram feitas em duplicatas.

Para a determinação do padrão substituiu-se 10 µL de do sobrenadante de HDL por 10 µL de padrão. Para o cálculo das concentrações de HDLc foi feita a determinação do Fator de Calibração através da seguinte equação: F (Fator de Calibração) = $100/\text{Média da Absorvância do Padrão}$; $\text{HDLc} = \text{Absorvância da amostra} \times \text{Fator de Calibração}$.

3.6.3. Determinação das frações aterogênicas e da relação colesterol total/HDLc

O colesterol das frações aterogênicas (LDLc, VLDLc e IDLc) foi calculado pela diferença entre o colesterol total e a HDLc e a relação colesterol total/HDLc pela divisão dos valores de colesterol total pelos de HDLc.

3.6.4. Determinação das concentrações de triacilgliceróis séricos

As concentrações de triacilgliceróis séricos foram medidos de acordo com o método enzimático colorimétrico (FOSSATI & PRENCIPE, 1982), utilizando kit comercial Doles, Brasil. O método consiste da hidrólise de triacilgliceróis do soro pela lipase lipoprotéica produzindo glicerol livre, que é fosforilado pela glicerol quinase, cujo produto sofre a ação da glicerol-P-oxidase a qual, em presença de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio. Este, sob a ação da peroxidase em presença de um reagente fenólico (p-clorofenol) e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo-avermelhado, com máximo de absorção a 500 nm. As dosagens e a curva padrão foram feitas em microplacas como descrito acima para o colesterol. Porém, a diluição utilizada foi de 5 µL de soro em 245 µL de água destilada. As dosagens foram feitas em duplicatas.

3.6.5. Avaliação da peroxidação lipídica sérica: monitoramento da capacidade antioxidante do soro

O perfil cinético da peroxidação lipídica pode ser dividido em três fases: a fase de latência (fase lag), a fase de propagação e a fase da decomposição. Na primeira fase, os antioxidantes são consumidos, porém sem ocorrer uma oxidação significativa de ácidos graxos. Logo após a depleção dos antioxidantes há a fase de propagação e então os

ácidos graxos são rapidamente oxidados formando dienos conjugados. Na fase de decomposição os níveis de dienos caem lentamente. O tempo de latência tem sido usado como critério para avaliação da resistência à oxidação lipídica e para avaliação da suscetibilidade dos lipídeos séricos a oxidação (SCHNITZER et al., 1998).

Amostras séricas foram diluídas em tampão fosfato pH 7,4 na proporção de 1:100, sendo adicionada uma solução de CuSO_4 à 1mmol/L até a concentração final de 30 $\mu\text{mol/L}$. Em seguida, as amostras séricas foram incubadas à 37°C e monitoradas espectrofotometricamente a 245 nm durante duas horas (SCHNITZER et al., 1998).

Assim, o valor do tempo de latência, no experimento, foi determinado graficamente através do intercepto de duas retas traçadas no início da formação dos dienos e na fase de propagação onde a produção é máxima – Figura 9 (GIESEG & ESTERBAUER, 1994).

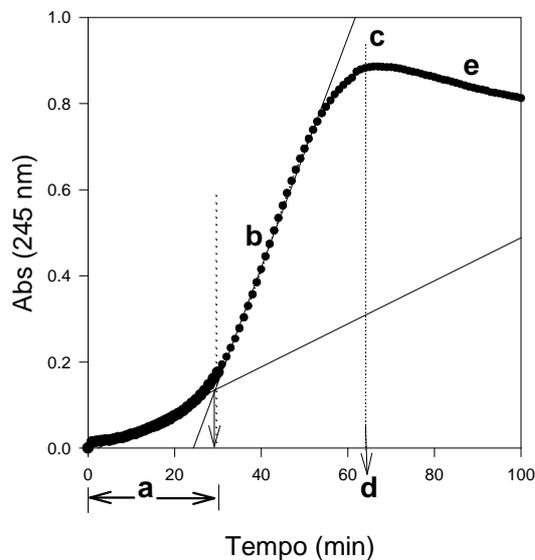


Figura 7 - Monitoramento da peroxidação lipídica (LDL) mediada por íons cobre pelo método de dieno conjugado. As mudanças de absorção a 245nm em função do tempo foram realizadas em cubetas de quartzo a 37°C. No perfil obtido a-representa a fase de latência em minutos; b-fornece a taxa máxima de oxidação; d-c-fornece a concentração máxima de dienos conjugado antes da decomposição e c-e fornece a taxa de decomposição (modificada de PINCHUK & LICHTENBERG, 2002).

3.7. Amostras de tecidos

Ao final das seis semanas de tratamento, coração, fígado, rins e aorta dos animais LDLr^{-/-} foram retirados, perfundidos com salina tamponada com fosfato (PBS) e acondicionados a -70°C para análises posteriores.

3.7.1. Peso relativo do coração

No sacrifício, os corações foram removidos e pesados para o cálculo do peso relativo desses em relação ao peso total de cada animal (peso do coração x 100% / peso total do animal = peso relativo) (KEMI et al., 2002).

3.7.2. Avaliação da peroxidação lipídica – TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) – em tecido hepático e renal

A geração de radicais livres e a peroxidação lipídica são reações extremamente rápidas, que são, geralmente, mensuradas pelos seus produtos, principalmente as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), entre as quais o malondialdeído é o principal. A formação de malondialdeído, pela quebra de ácidos graxos poliinsaturados, é um conveniente método para se determinar o grau de peroxidação lipídica, sendo assim uma ferramenta para o monitoramento das propriedades antioxidantes de qualquer substância (PATOCKOVA et al., 2003).

A mensuração dos metabólitos, reativos ao ácido tiobarbitúrico, foi realizada em microplacas pelo método descrito por WALLIN et al. (1993). Os fígados e rins (100,0 mg de tecido mais 1,0 mL de PBS 1X) foram triturados com um homogeneizador (Euro Turraz T20b, IKA labortechnik) e mantidos em gelo. Um volume de 500,0 µL do homogenato de cada amostra foi colocado em tubos de ensaio e adicionou-se 1,0 mL de solução contendo ácido tricloroacético (TCA, 15%), ácido tiobarbitúrico (TBA, 0,0375%) e ácido clorídrico (HCl, 0,25 N). As amostras foram mantidas em banho-maria fervente por 15 minutos e então colocadas sob água corrente até esfriarem. Foram adicionados aos tubos 1,5 mL de ácido butílico, que foram vigorosamente agitados. Após uma centrifugação a 3000 rpm, por 10 minutos, o sobrenadante foi recolhido e plaqueado em duplicata e a leitura foi realizada a 535 nm.

Uma curva-padrão de malondialdeído foi feita e as concentrações utilizadas foram: 0; 2,5; 5,0; 10,0; 50,0; 100,0 μM . Foi realizada ainda uma dosagem de proteínas (LOWRY et al, 1951), sendo a concentração nas amostras calculada através de uma curva padrão, a qual foi feita com albumina.

3.7.3. Dosagem da concentração de hidroperóxidos em tecido hepático e renal

O ensaio da oxidação ferrosa do xilenol orange consiste basicamente na oxidação de íons ferrosos (Fe^{2+}) à férricos (Fe^{3+}) sob condições ácidas, pelos hidroperóxidos (NOUROOZ-ZADEH et al., 1994; BANERJEE et al., 2002). O indicador utilizado é o Xilenol Orange, que se liga aos íons férrico produzindo um cromóforo azul-arroxeadado.

No momento da realização do ensaio, uma parte da solução FOX-2 (preparado pela dissolução do xileno orange e do sulfato ferroso amoniacal em 250 mM de H_2SO_4 para uma concentração final de 1 e 2,5 mM, respectivamente) foi diluída em nove partes da solução de metanol grau-HPLC contendo 4,4 mM de BHT, obtendo-se o reagente FOX-2.

Para as dosagens foram retirados 50 μL do homogenato preparado para a análise de TBARS e, acrescido a este 450 μL do reagente para FOX-2. Para fazer o branco foi utilizado 50 μL de água Milli Q no lugar do homogenato. Em seguida, estas misturas foram mantidas à temperatura ambiente, por 30 minutos. Após este tempo, elas foram centrifugada à 12000 rpm por cinco minutos, sendo 200 μL do sobrenadante colocado na microplaca de 96 poços. Posteriormente, a absorbância foi lida à 560 nm em um leitor de microplaca (Modelar Devices, modelo Spectra Max Plus).

Adicionalmente, foi realizada a redução dos hidroperóxidos com Trifenilfostina (TPP). A TPP é utilizada como eficiente ferramenta para distinção entre peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos (não- H_2O_2), já que a presença ou a ausência de TPP indica o teor de H_2O_2 na amostra (NOUROOZ-ZADEH et al., 1994; BANERJEE et al., 2002).

Em 45 μL do homogenato preparado para a análise de TBARS adicionou-se 5,0 μL de TPP a 10 mM (a TPP foi diluída em metanol), sendo mantido a temperatura ambiente por 30 minutos. Logo após, foi acrescido 450 μL do reagente para FOX-2. Para fazer o branco foi utilizado 45 μL de água Milli Q no lugar do homogenato. Em seguida, estas misturas foram mantidas à temperatura ambiente, por 30 minutos. Após este tempo, elas

foram centrifugada à 12000 rpm por cinco minutos, sendo 200 µL do sobrenadante colocado na microplaca de 96 poços. Posteriormente, a absorbância foi lida à 560 nm em um leitor de microplaca (Modelar Devices, modelo Spectra Max Plus).

O Xilenol Orange, ao se ligar aos íons férrico, produz um cromóforo azul-arroxeadado com coeficiente de extinção de $1,5 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 560 nm. A concentração de hidroperóxidos pode ser estimada uma vez que o coeficiente de extinção dos hidroperóxidos é de $4,3 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 560 nm. Concentrações inferiores à 1 µM podem ser detectadas.

Para quantificar os hidroperóxidos da amostra subtraiu-se as dosagens sem TPP das com TPP (sem TPP – com TPP = Quantidade de hidroperóxidos da amostra), podendo ser expressa em absorbância ou em nmolar. Foi realizada ainda uma dosagem de proteínas (LOWRY et al, 1951), sendo a concentração nas amostras calculada através de uma curva padrão, a qual foi feita com albumina.

3.7.4. Avaliação das lesões ateroscleróticas

3.7.4.1. Avaliação da deposição lipídica nas aortas torácica e abdominal

A deposição lipídica foi determinada nas aortas torácica e abdominal, utilizando a análise *en face* pela coloração Sudan IV (PALINSKI et al., 1994). As aortas foram dissecadas, removendo cuidadosamente toda a adventícia a partir da válvula aórtica até a bifurcação ilíaca. A aorta foi aberta longitudinalmente e fixada, durante 12 horas, na solução de formol-sacarose (4% paraformaldeído, 5% de sacarose, 20 µmol/L de BHT, e 2 µmol/L EDTA, pH 7,4) à 4°C. Após fixadas, as aortas foram submetidas a uma solução de 70% de etanol durante cinco minutos. Posteriormente, foram coradas por 10 minutos sob agitação em uma solução filtrada contendo 0,5% de Sudan IV, 35% de etanol e 50% de acetona, sendo em seguida descoradas em solução de 80% de etanol, por cinco minutos. As imagens das aortas coradas com Sudan IV foram digitalizadas e a análise feita pelo programa Image-Pro Plus. A soma das áreas das lesões ateroscleróticas (local onde houve acúmulo lipídico) foi calculada pelo programa, sendo o resultado expresso pelo percentual da área total da aorta.

3.7.4.2. Avaliação das lesões ateroscleróticas na raiz aórtica

Após o sacrifício dos camundongos, todos os corações foram retirados em bloco, com a raiz da aorta, e perfusionados com PBS diluído uma vez. O coração foi separado da aorta torácica e abdominal, fixado em formol tamponado à 10% e processado, conforme rotina para inclusão em parafina. Foram feitos cortes consecutivos de 10 μm de espessura na região da válvula aórtica, sendo as lâminas codificadas e coradas por hematoxilina e eosina (HE).

O tamanho da lesão aterosclerótica foi avaliado em dez cortes, tomando sempre como referência a presença da válvula aórtica. Localizada a formação da válvula, a cada 30 μm um corte era selecionado para a medida. Assim, foi percorrida uma extensão média de 300 μm , com os cortes analisados sendo intercalados por dois cortes consecutivos, segundo técnica modificada de PAIGEN et al. (1987) (PORTUGAL et al., 2004). As áreas foram medidas por meio da análise morfométrica, pelo programa Image-Pro Plus. O cálculo do tamanho da lesão de cada animal foi feito pela soma das áreas dos dez cortes. O valor médio por grupo foi utilizado para comparações estatísticas.

Foram também contados os números de lesões encontradas ao longo dos dez cortes analisados para cada animal. O valor médio por grupo foi utilizado para comparações estatísticas.

3.8. Estatística

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão, exceto para a variável fase de latência que foi expressa em média dos valores reais, uma vez que estes não apresentaram distribuição normal. Para a análise estatística estes dados sofreram transformação logarítmica atingindo a normalidade.

Para verificar a normalidade das amostras foi utilizado o teste de Lilliefords e para homogeneidade de variâncias, o teste de Bartlett.

Os dados foram analisados por fatorial 2 x 2 (dieta x exercício) por meio de análise de variância (ANOVA) e quando havia diferença estatística, aplicava-se o teste T student, uma vez que eram quatro grupos experimentais e a maioria dos dados apresentaram coeficiente de variação elevado (SAMPAIO, 2002). Foram considerados resultados estatisticamente significativos àqueles com valores de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Peso corporal e consumo alimentar dos camundongos LDLr^{-/-}

Na Figura 8 está representado o peso corporal médio dos camundongos LDLr^{-/-}, medido semanalmente. Houve aumento do peso corporal ao longo das seis semanas, entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre os quatro grupos experimentais em nenhum dos tempos estudados.

De acordo com os valores apresentados na Figura 9, não houve diferença na quantidade de dieta ingerida entre os animais LDLr^{-/-} dos quatro grupos experimentais (CT: 34,60 ± 3,12; EX: 34,17 ± 4,32; ES: 36,14 ± 3,63; EX+ES: 37,47 ± 2,91 g/semana/animal).

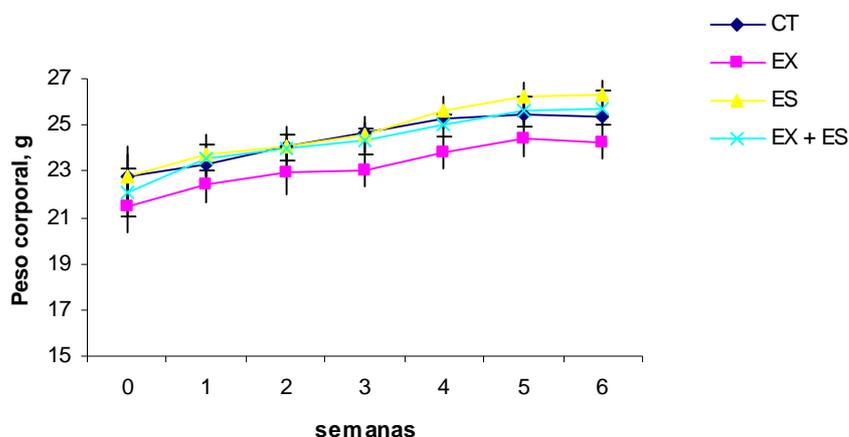


Figura 8 - Peso corporal em gramas dos camundongos LDLr^{-/-} ao longo das seis semanas de experimento. Sendo CT: sem exercício físico e com dieta controle; EX: com exercício físico e com dieta controle; ES: sem exercício físico e com dieta contendo extrato de soja; EX+ES: com exercício físico e com dieta contendo extrato de soja (n = 6 em cada grupo experimental). Os resultados foram expressos como média do peso ± erro padrão, em gramas, dos animais em cada semana do experimento.

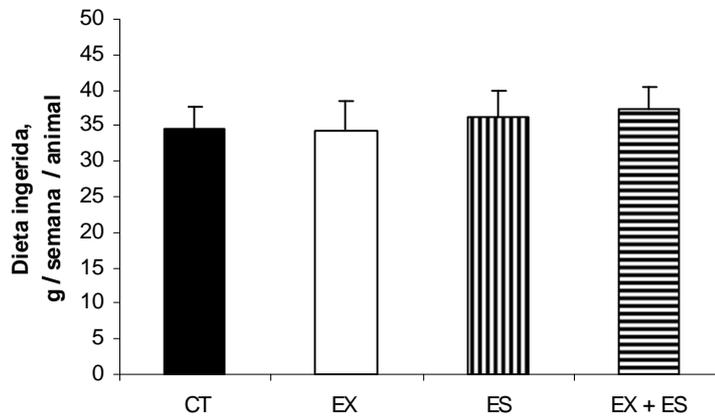


Figura 9 - Consumo alimentar semanal dos animais LDLr^{-/-}. Sendo CT: sem exercício físico e com dieta controle; EX: com exercício físico e com dieta controle; ES: sem exercício físico e com dieta contendo extrato de soja; EX+ES: com exercício físico e com dieta contendo extrato de soja (n = 6 animais para cada tratamento). As barras e as linhas verticais representam a média e o erro padrão de cada grupo, respectivamente.

4.2. Amostras de sangue

4.2.1. Colesterol sérico total dos camundongos LDLr^{-/-}

No início do experimento (após quatro dias de dieta controle aterogênica) realizou-se dosagem de colesterol total, não sendo observada diferença significativa entre os quatro grupos (CT: 806,55 ± 45,76; EX: 887,81 ± 42,96; ES: 777,98 ± 48,66; EX+ES: 793,15 ± 73,69 mg/dL). Após as seis semanas de tratamento não houve alteração neste parâmetro, ou seja, não foram observados efeitos do exercício físico e do extrato de soja sobre as concentrações de colesterol (CT: 671,79 ± 84,95; EX: 690,95 ± 54,87; ES: 587,30 ± 66,46; EX+ES: 633,98 ± 111,60 mg/dL). -Figura 10.

Ao comparar os grupos nos tempos inicial e final, pôde-se verificar que houve valores significativamente menores de concentrações de colesterol ao final das seis semanas para todos os quatro grupos experimentais, p < 0,05 - Figura 10.

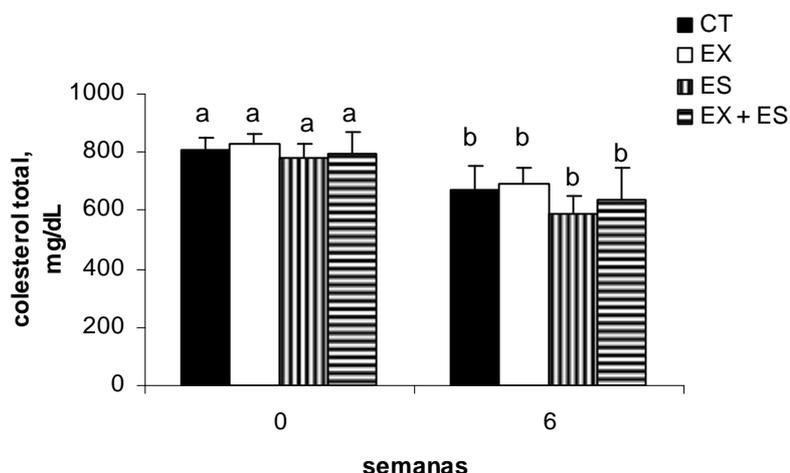


Figura 10 - Concentrações de colesterol sérico total dos camundongos LDLr^{-/-} nos tempos: inicial (semana zero) e final (semana seis) das seis semanas de experimento. Sendo CT (n = 8): sem exercício físico e com dieta controle; EX (n = 7): com exercício físico e com dieta controle; ES (n = 8): sem exercício físico e com dieta contendo extrato de soja; EX+ES (n = 6): com exercício físico e com dieta contendo extrato de soja. As barras e linhas verticais representam a média e o erro padrão de cada grupo, respectivamente. Letras distintas, p < 0,05 pelo test t.

4.2.2. Colesterol HDL, frações aterogênicas e relação colesterol total/HDLc

Ao analisar a fração não aterogênica (HDLc) observou-se que aqueles grupos que consumiram soja tiveram concentrações maiores de HDL (ES: 36,02 ± 4,37; ES+EX: 32,77 ± 6,52 mg/dL) quando comparados aos grupos controle ou que apenas realizaram exercício físico sem ingerirem soja (CT: 21,01 ± 2,05; EX: 22,92 ± 3,46 mg/dL), p < 0,05 – Figura 11.

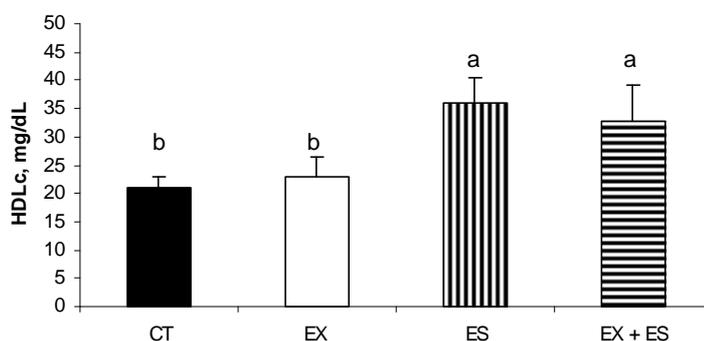


Figura 11 - HDLc dos camundongos LDLr^{-/-} ao final das seis semanas de experimento. Sendo CT (n = 8): sem exercício físico e com dieta controle; EX (n = 7): com exercício físico e com dieta controle; ES (n = 8): sem exercício físico e com dieta contendo extrato de soja; EX+ES (n = 6): com exercício físico e com dieta contendo extrato de soja. As barras e linhas verticais representam a média e o erro padrão de cada grupo, respectivamente. Letras distintas representam p < 0,05 pelo test t.

Na Figura 12 está representado o efeito do extrato de soja nas frações aterogênicas. Pode-se verificar que aqueles grupos que consumiram soja tiveram concentrações menores de frações aterogênicas (ES: $551,29 \pm 63,63$; ES+EX: $601,20 \pm 106,59$ mg/dL) quando comparados aos grupos controle ou que apenas realizaram exercício físico sem ingerirem soja (CT: $650,77 \pm 86,10$; EX: $668,03 \pm 55,07$ mg/dL), $p < 0,05$.

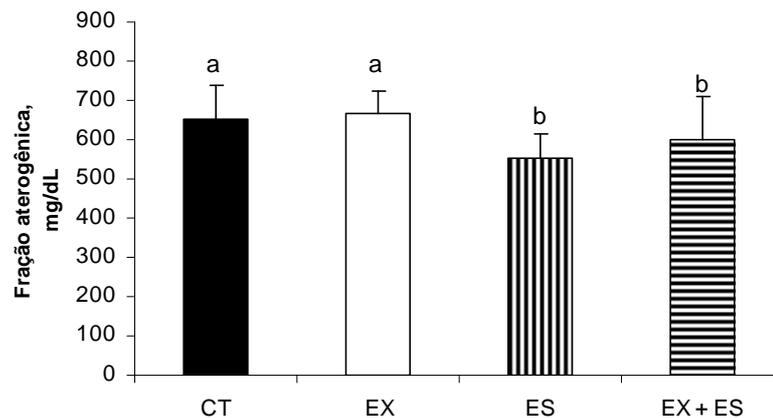


Figura 12 - Fração aterogênica (VLDLc, LDLc e IDLc) do colesterol dos camundongos LDLr^{-/-} ao final das seis semanas de experimento. Sendo CT (n = 8): sem exercício físico e com dieta controle; EX (n = 7): com exercício físico e com dieta controle; ES (n = 8): sem exercício físico e com dieta contendo extrato de soja; EX+ES (n = 6): com exercício físico e com dieta contendo extrato de soja. As barras e linhas verticais representam a média e o erro padrão de cada grupo, respectivamente. Letras distintas representam $p < 0,05$ pelo test t.

O extrato de soja também promoveu redução da relação colesterol total /HDLc, ou seja, os grupos que consumiram soja tiveram relação menor (ES: $17,02 \pm 1,96$; ES+EX: $20,07 \pm 2,27$) que os grupos controle ou que apenas realizaram exercício físico sem ingerirem soja (CT: $35,47 \pm 6,84$; EX: $34,76 \pm 5,70$), $p < 0,05$ – Figura 13.

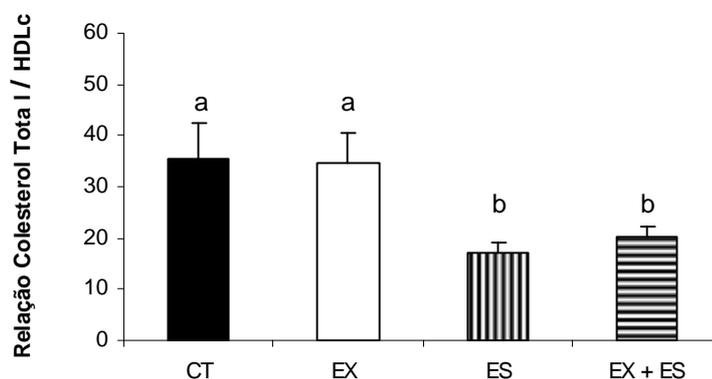


Figura 13 - Relação colesterol total/HDLc dos camundongos LDLr^{-/-} ao final das seis semanas de experimento. Sendo CT (n = 8): sem exercício físico e com dieta controle; EX (n = 7): com exercício físico e com dieta controle; ES (n = 8): sem exercício físico e com dieta contendo extrato de soja; EX+ES (n = 6): com exercício físico e com dieta contendo extrato de soja. As barras e linhas verticais representam a média e o erro padrão de cada grupo, respectivamente. Letras distintas representam $p < 0,05$ pelo test t.

4.2.3. Triacilgliceróis séricos

Não foram observadas diferenças nos triacilgliceróis séricos entre os quatro grupos experimentais ao final das seis semanas de experimento (CT: $47,52 \pm 5,21$; EX: $50,20 \pm 11,59$; ES: $52,89 \pm 6,71$; EX+ES: $62,44 \pm 7,83$ mg/dL).-Figura 14.

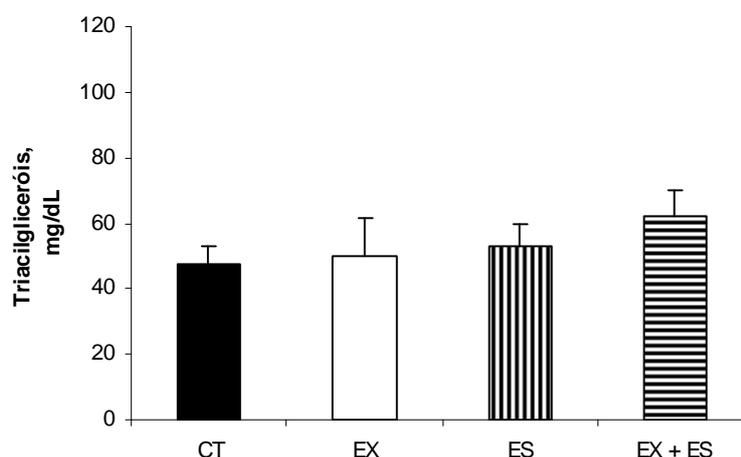


Figura 14 - Triacilgliceróis séricos dos camundongos LDLr^{-/-} ao final das seis semanas de experimento. Sendo CT (n = 8): sem exercício físico e com dieta controle; EX (n = 7): com exercício físico e com dieta controle; ES (n = 8): sem exercício físico e com dieta contendo extrato de soja; EX+ES (n = 6): com exercício físico e com dieta contendo extrato de soja. As barras e linhas verticais representam a média e o erro padrão de cada grupo, respectivamente.

4.2.4. Peroxidação lipídica sérica: monitoramento da capacidade antioxidante sérica

Nos camundongos LDLr^{-/-}, o exercício físico e o extrato de soja exerceram efeito sobre o potencial antioxidante do soro, apenas quando administrados em conjunto (grupo EX+ES: 58,40 min), promovendo o aumento da fase de latência (tempo *lag*). Este resultado foi diferente estatisticamente quando comparado aos grupos controle, com exercício físico e com extrato de soja, administrados isoladamente (CT: 3,40; EX: 8,40; ES: 9,40 min), $p < 0,05$ – Figura 15.

Nas Figura 16 estão os perfis representativos do monitoramento oxidativo dos soros dos camundongos LDLr^{-/-} dos quatro grupos experimentais.

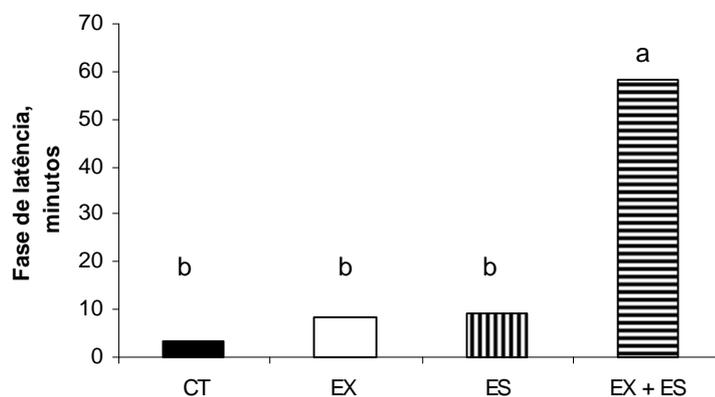


Figura 15 - Fase de latência sérica dos camundongos LDLr^{-/-} ao final das seis semanas de experimento. Sendo CT: sem exercício físico e com dieta controle; EX: com exercício físico e com dieta controle; ES: sem exercício físico e com dieta contendo extrato de soja; EX+ES: com exercício físico e com dieta contendo extrato de soja (n = 5 para cada grupo experimental). As barras e linhas verticais representam a média de cada grupo, respectivamente. Letras distintas representam $p < 0,05$ pelo test t.

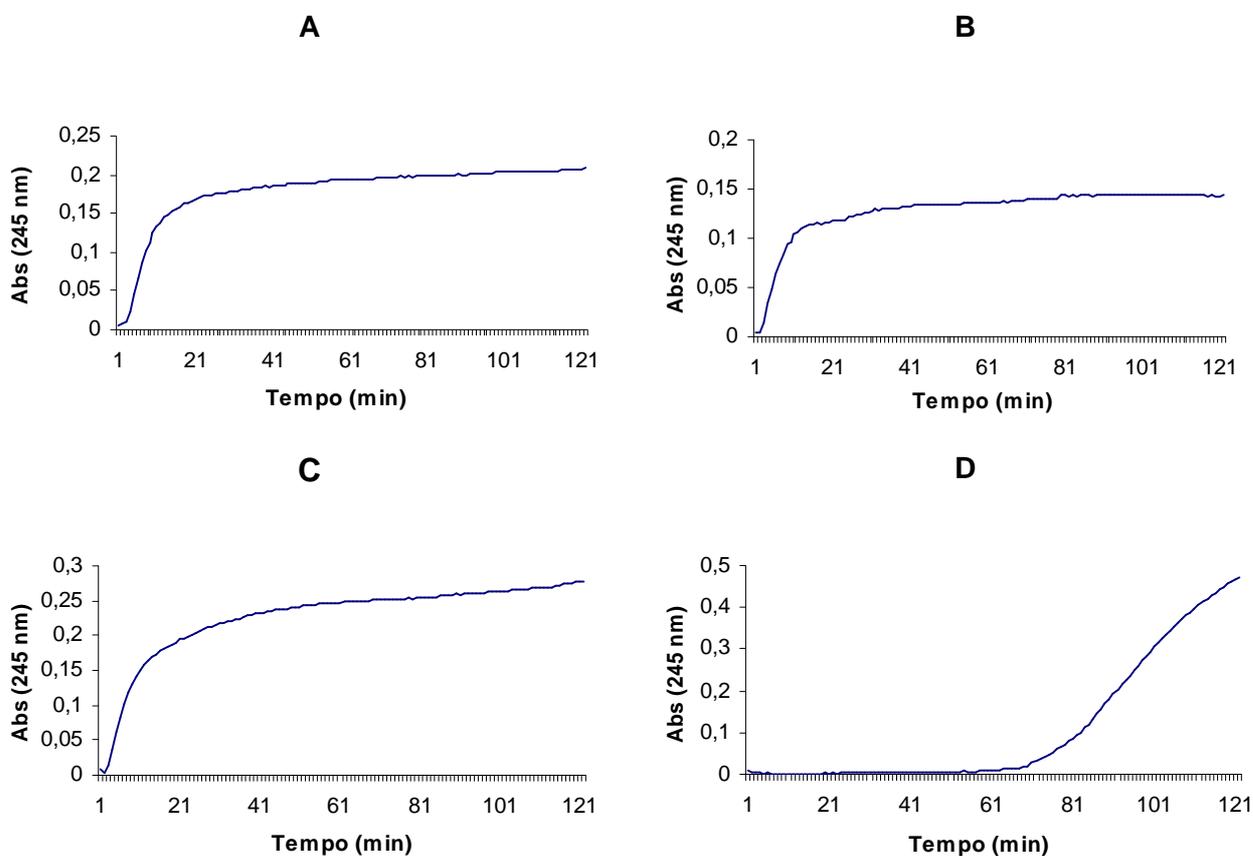


Figura 16 - Perfis do monitoramento espectrofotométrico na absorvância de 245 nm, a 37°C, durante 2 horas da peroxidação lipídica sérica dos grupos: A-perfil representativo do grupo sem exercício físico e com dieta controle; B-perfil representativo do grupo com exercício físico e com dieta controle; C-perfil representativo do grupo sem exercício físico e com dieta contendo extrato de soja; D-perfil representativo do grupo com exercício físico e com dieta contendo extrato de soja.

4.3. Amostras de tecidos

4.3.1. Peso relativo do coração

Na Figura 17 está representado o percentual do peso relativo do coração dos camundongos LDLr^{-/-}. Não houve diferença para tal parâmetro entre os quatro grupos experimentais (CT: 0,53 ± 0,02; EX: 0,52 ± 0,01; ES: 0,51 ± 0,01; EX+ES: 0,51 ± 0,01 %), logo, o exercício físico não exerceu efeito sobre o peso relativo deste órgão.

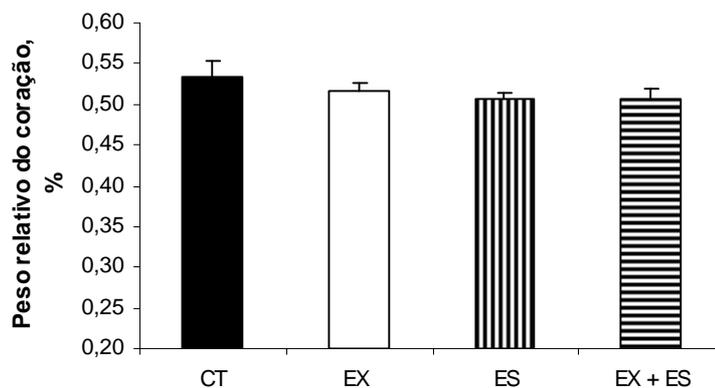


Figura 17 - Peso relativo dos corações dos camundongos LDLr^{-/-} ao final das seis semanas de experimento. Sendo CT sem exercício físico e com dieta controle; EX: com exercício físico e com dieta controle; ES: sem exercício físico e com dieta contendo extrato de soja; EX+ES: com exercício físico e com dieta contendo extrato de soja (n = 6 para cada grupo experimental). As barras e linhas verticais representam a média e o erro padrão de cada grupo, respectivamente.

4.3.2. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e hidroperóxidos em tecido hepático e renal

O extrato de soja e o exercício físico exerceram efeito sobre a peroxidação lipídica em tecido hepático, uma vez que, proporcionaram redução nas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e nos hidroperóxidos formados, $p < 0,05$ (Figuras 18 e 19). Este efeito foi observado quando o exercício físico e o extrato de soja estavam presentes juntos ou separados (grupos EX, ES e EX + ES) em relação ao controle (CT: $2,28 \pm 0,33$; EX: $1,04 \pm 0,21$; ES: $1,36 \pm 0,35$; EX+ES: $1,44 \pm 0,48$ nmol de MDA/mg de proteína, para TBARS; e CT: $0,048 \pm 0,013$; EX: $0,008 \pm 0,001$; ES: $0,009 \pm 0,004$; EX+ES: $0,018 \pm 0,006$ nmol/mg de proteína, para hidroperóxidos, $p < 0,05$).

Entretanto, não foram observadas diferenças, entre os quatro grupos experimentais, no tecido renal, em relação a esses parâmetros (CT: $11,82 \pm 1,38$; EX: $12,66 \pm 1,60$; ES: $13,15 \pm 0,61$; EX+ES: $9,82 \pm 1,29$ nmol de MDA/mg de proteína, para TBARS; e CT: $0,016 \pm 0,003$; EX: $0,011 \pm 0,001$; ES: $0,012 \pm 0,002$; EX+ES: $0,014 \pm 0,004$ nmol/mg de proteína, para hidroperóxidos) -Figuras 20 e 21.

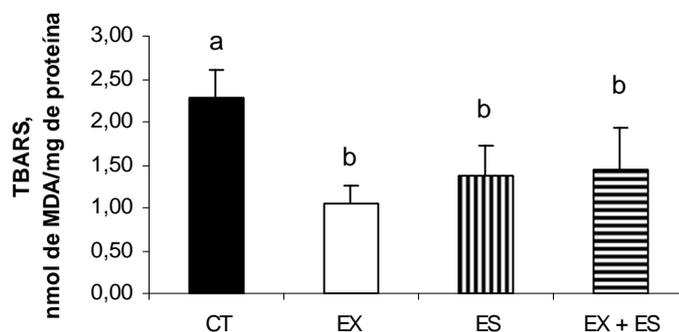


Figura 18 - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em tecido hepático dos camundongos LDLr^{-/-} ao final das seis semanas de experimento. Sendo CT: sem exercício físico e com dieta controle; EX: com exercício físico e com controle; ES: sem exercício físico e com dieta contendo extrato de soja; EX+ES: com exercício físico e com dieta contendo extrato de soja (n = 6 para cada grupo experimental). As barras e linhas verticais representam a média e o erro padrão de cada grupo, respectivamente. Letras distintas representam p < 0,05 pelo test t.

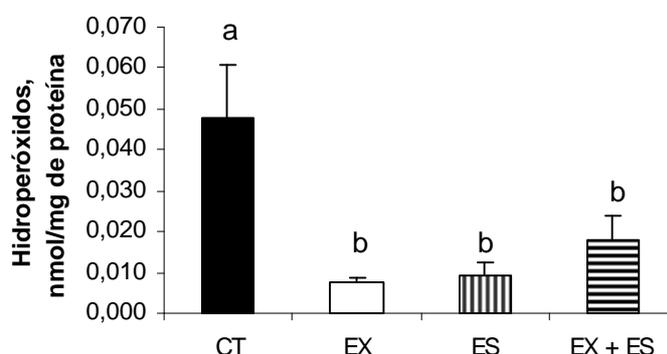


Figura 19 - Hidroperóxidos em tecido hepático dos camundongos LDLr^{-/-} ao final das seis semanas de experimento. Sendo CT (n = 5): sem exercício físico e com dieta controle; EX (n = 6) com exercício físico e com dieta controle; ES (n = 5): sem exercício físico e com dieta contendo extrato de soja; EX+ES (n = 6): com exercício físico e com dieta contendo extrato de soja. As barras e linhas verticais representam a média e o erro padrão de cada grupo, respectivamente. Letras distintas representam p < 0,05 pelo test t.

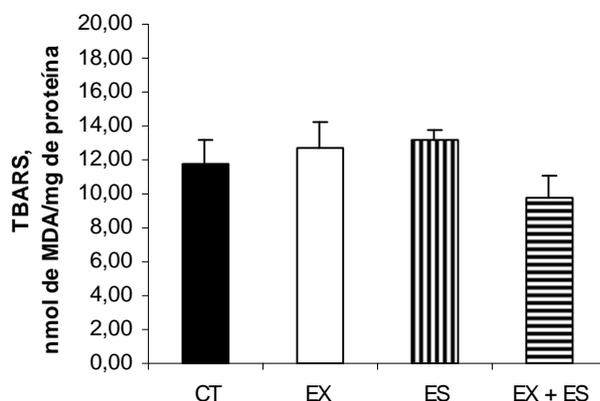


Figura 20 - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em tecido renal dos camundongos LDLr^{-/-} ao final das seis semanas de experimento. Sendo CT: sem exercício físico e com dieta controle; EX: com exercício físico e com dieta controle; ES: sem exercício físico e com dieta contendo extrato de soja; EX+ES: com exercício físico e com dieta contendo extrato de soja (n = 6 para cada grupo experimental). As barras e linhas verticais representam a média e o erro padrão de cada grupo, respectivamente.

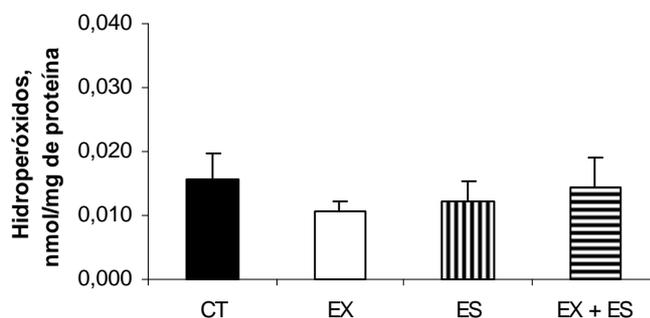


Figura 21 - Hidroperóxidos em tecido renal dos camundongos LDLr^{-/-} ao final das seis semanas de experimento. Sendo CT (n = 6): sem exercício físico e com dieta controle; EX (n = 6): com exercício físico e com dieta controle; ES (n = 6): sem exercício físico e com dieta contendo extrato de soja; EX+ES (n = 5): com exercício físico e com dieta contendo extrato de soja. As barras e linhas verticais representam a média e o erro padrão de cada grupo, respectivamente.

4.3.3. Lesões ateroscleróticas

4.3.3.1. Aorta torácica e abdominal

A análise da lesão aterosclerótica, nas aortas torácica e abdominal, mostrou em camundongos LDLr^{-/-}, que tanto o extrato de soja quanto o exercício físico não exerceram

efeito sobre a área da lesão, ou seja, não houve diferença entre os grupos experimentais (CT: $2,77 \pm 0,62$; EX: $2,51 \pm 0,26$; ES: $2,79 \pm 0,99$; EX+ES: $1,41 \pm 0,63$ %) - Figura 22.

A Figura 23 representa as imagens obtidas por “scanner” das aortas torácica e abdominal coradas com Sudan IV representativas para cada grupo experimental.

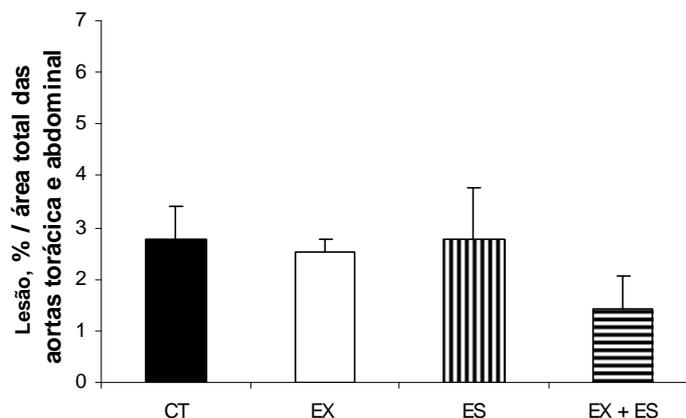


Figura 22 - Porcentagem de deposição lipídica em aortas torácica e abdominal dos camundongos LDLr^{-/-} ao final das seis semanas de experimento. Sendo CT: sem exercício físico e com dieta controle; EX: com exercício físico e com dieta controle; ES: sem exercício físico e com dieta contendo extrato de soja; EX+ES: com exercício físico e com dieta contendo extrato de soja (n = 5 para cada grupo experimental). As barras e linhas verticais representam a média e o erro padrão de cada grupo, respectivamente.

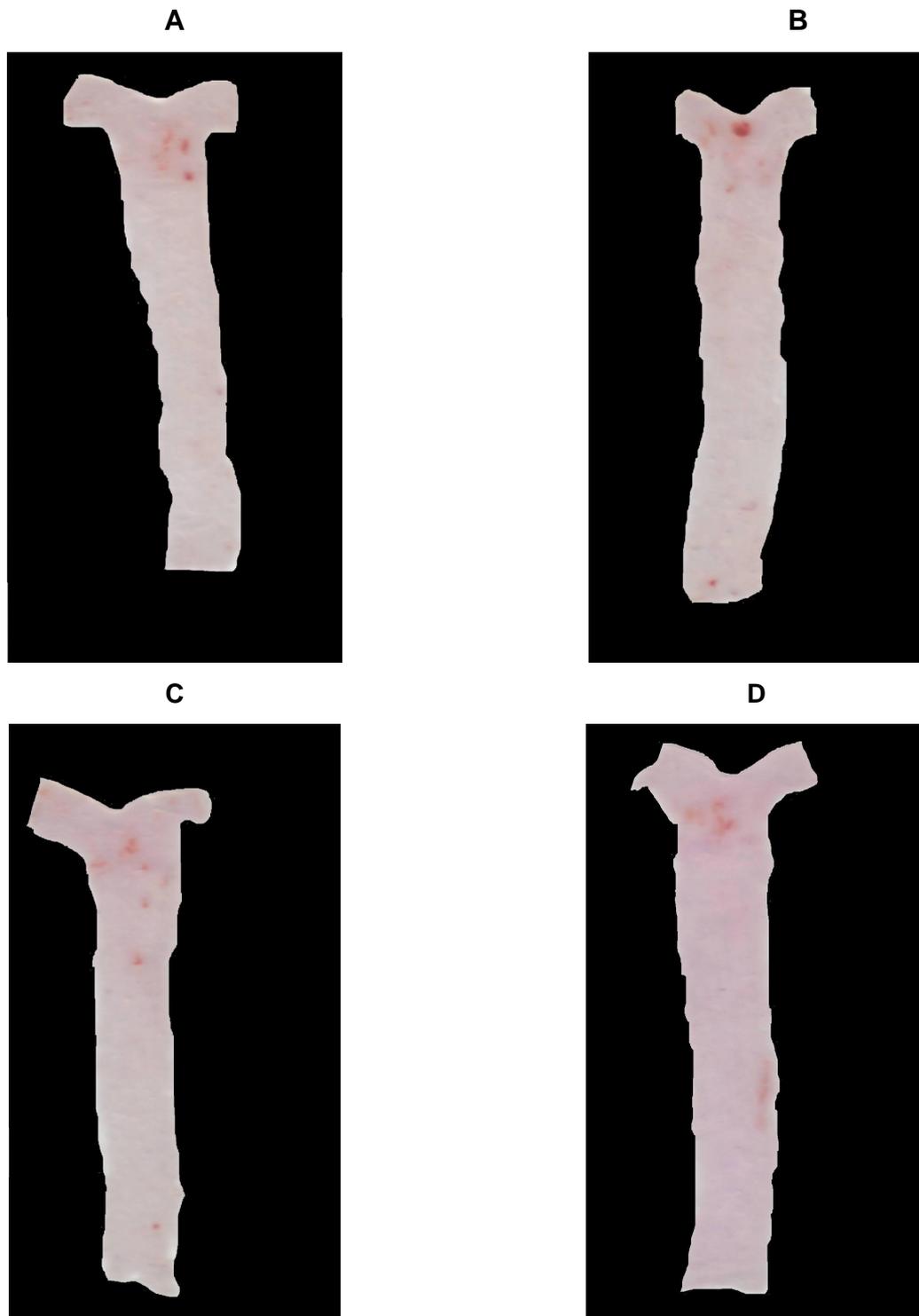


Figura 23 - Imagens das superfícies internas das aortas torácica e abdominal dos animais $LDLr^{-/-}$. As aortas foram coradas com SUDAN IV e as lesões ateroscleróticas estão representadas em vermelho. A-aorta representativa do grupo sem exercício físico e com dieta controle; B-aorta representativa do grupo com exercício físico e com dieta controle; C-aorta representativa do grupo sem exercício físico e com dieta contendo extrato de soja; D-aorta representativa do grupo com exercício físico e com dieta contendo extrato de soja.

4.3.3.2. Lesão na raiz aórtica

Outro local para avaliação do desenvolvimento da lesão aterosclerótica é a raiz da aorta, na região da válvula. Nesta área, houve efeito do exercício físico e do extrato de soja sobre o tamanho da lesão aterosclerótica, ou seja, ambos promoveram redução da lesão, grupos EX ($319 \times 10^3 \pm 91 \times 10^3 \mu\text{m}^2$), ES ($301 \times 10^3 \pm 73 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) e EX + ES ($188 \times 10^3 \pm 36 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) em relação ao controle ($598 \times 10^3 \pm 146 \times 10^3 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$ - Figura 24. Na Figura 25 está representado os aspectos histológicos das lesões ateroscleróticas representativos dos quatro grupos experimentais.

Com relação à quantidade de lesões encontradas na raiz da aorta, não houve diferenças entre os quatro grupos experimentais (CT: $5,67 \pm 0,33$; EX: $4,00 \pm 0,45$; ES: $4,67 \pm 0,42$; EX+ES: $4,43 \pm 0,65$).-Figura 26.

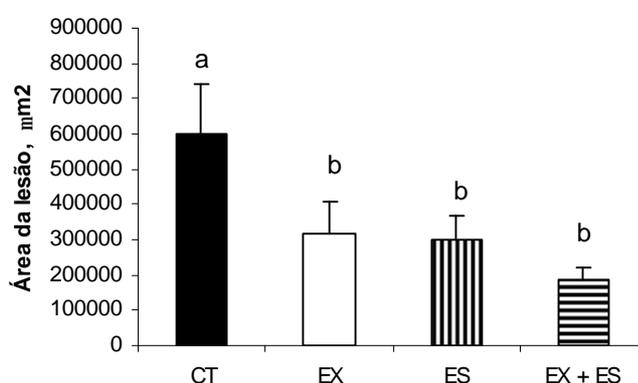


Figura 24 - Área da lesão aterosclerótica na raiz aórtica dos animais LDLr^{-/-}. Sendo CT (n = 6): sem exercício físico e com dieta controle; EX (n = 6): com exercício físico e com dieta controle; ES (n = 6): sem exercício físico e com dieta contendo extrato de soja; EX+ES (n = 7): com exercício físico e com dieta contendo extrato de soja. As barras e linhas verticais representam a média e o erro padrão de cada grupo, respectivamente. Letras distintas representam $p < 0,05$ pelo test t.

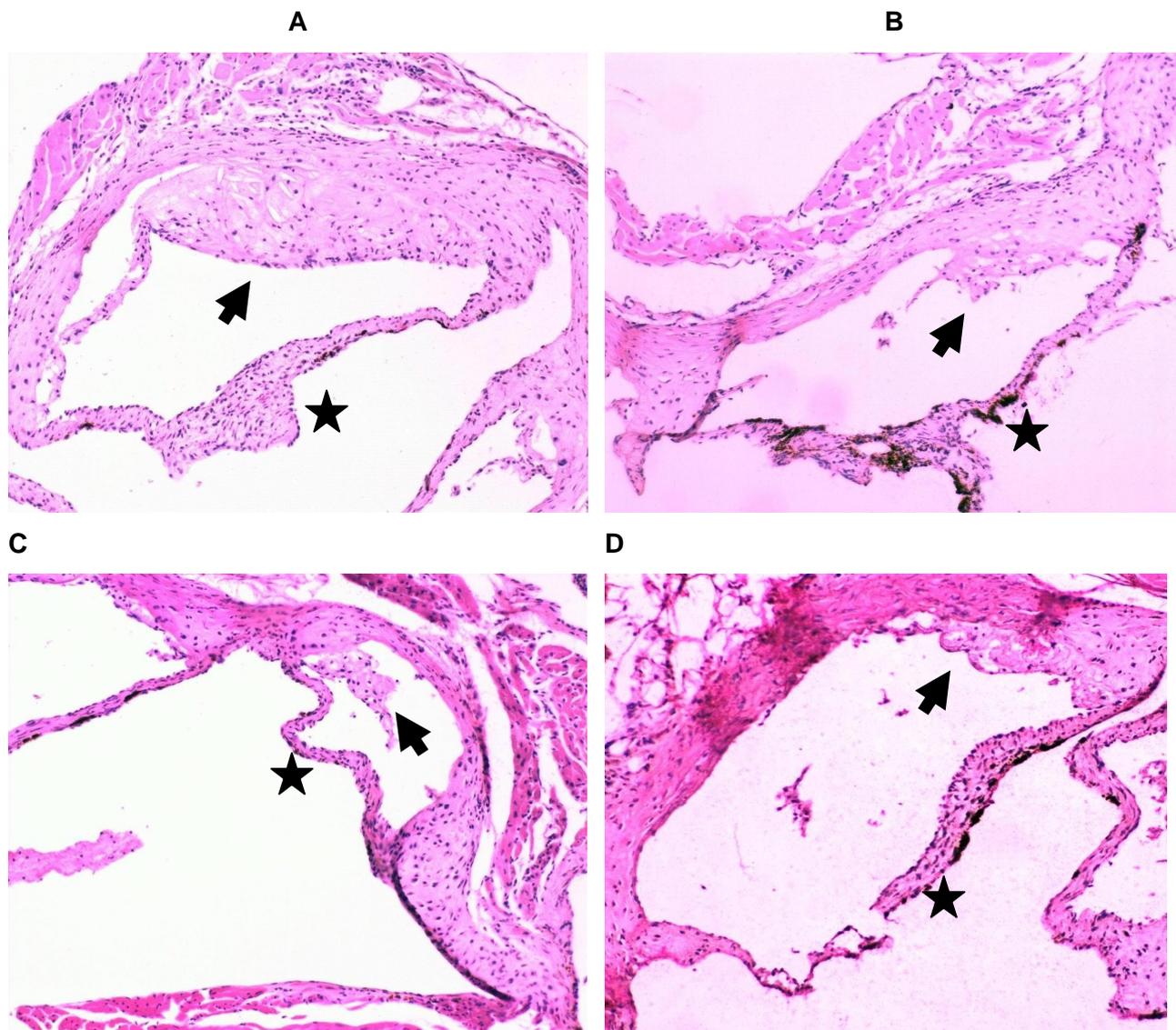


Figura 25 - Aspectos histológicos da raiz da aorta dos animais $LDLr^{-/-}$. A-representativo do grupo sem exercício físico e com dieta controle; B-representativo do grupo com exercício físico e com dieta controle; C-representativo do grupo sem exercício físico e com dieta contendo extrato de soja; D-representativo do grupo com exercício físico e com dieta contendo extrato de soja. Os cortes foram corados com HE, aumento 100X. Sendo as lesões apontadas por setas e a referência anatômica está representada por presença das válvulas aórticas (estrela).

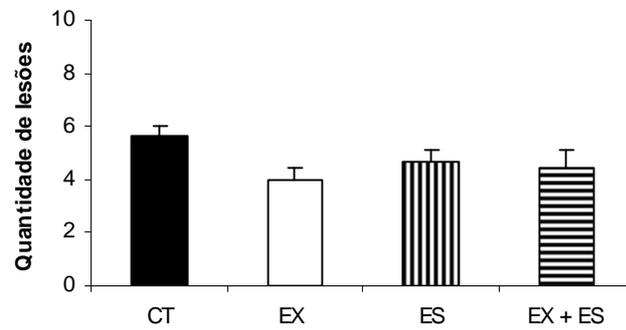


Figura 26 - Quantidade de lesões ateroscleróticas na raiz aórtica nos animais $LDLr^{-/-}$. Sendo CT (n = 6): sem exercício físico e com dieta controle; EX (n = 6): com exercício físico e com dieta controle; ES (n = 6): sem exercício físico e com dieta contendo extrato de soja; EX+ES (n = 7): com exercício físico e com dieta contendo extrato de soja. As barras e linhas verticais representam a média e o erro padrão de cada grupo, respectivamente.

5. DISCUSSÃO

A aterosclerose, especialmente presente nas sociedades ocidentais, é a maior causa das doenças cardiovasculares (SCOTT, 2004), sendo uma doença progressiva caracterizada pelo acúmulo de lipídeos e elementos fibrosos nas artérias, também postulada como uma resposta à injúria endotelial vascular (LUSIS, 2000). Alguns pesquisadores têm estudado o efeito do exercício físico (BENÍTEZ, et al., 2002; PYNN et al., 2004) e da soja (WAGNER et al., 2003; ADAMS et al., 2004; OMONI & ALUKO, 2005) na prevenção de doenças cardiovasculares, assim este trabalho objetivou avaliar os efeitos do exercício físico e do extrato de soja, administrados juntos ou isolados, no perfil lipídico, no estresse oxidativo e na aterosclerose em camundongos deficientes do gene para o receptor de LDL.

Os resultados deste trabalho mostraram que tanto o exercício físico quanto o extrato de soja, estando eles juntos ou separados, promoveram redução na área da lesão aterosclerótica na raiz da aorta (Figura 24). No entanto, não foi observada nenhuma diferença estatística neste parâmetro, na aorta torácica e abdominal (Figura 22) e não exerceram influência significativa no aparecimento das lesões na raiz aórtica (Figura 26).

Um fator importante a se destacar é que a lesão aterosclerótica tem início na raiz aórtica e vai se desenvolvendo ao longo da aorta torácica e abdominal, assim, o efeito do exercício físico e do extrato de soja sobre este parâmetro pode ser mais visível na raiz em relação à aorta torácica e abdominal, visto que nosso estudo teve apenas seis semanas de duração e que os camundongos LDLr^{-/-} necessitariam de um período experimental maior para apresentarem lesões em estágios mais avançados e em maior quantidade. Uma possível explicação para a lesão iniciar-se na válvula aórtica seria o fluxo sanguíneo oscilatório ou turbulento ou a baixa força de cisalhamento (*shear stress*) nesta região, o que leva a uma elevada expressão de moléculas de adesão, sendo estas áreas caracterizadas por células endoteliais poligonais e sem orientação, contribuindo para um aumento da permeabilidade a LDL, tornando-se, assim, locais de preferência para a formação das lesões ateroscleróticas (LUSIS, 2000; VANDERLAAN et al., 2004).

De acordo com os nossos resultados estão o de PELLEGRIN et al. (2007) que observaram redução da área da lesão na raiz da aorta em camundongos APOE^{-/-} do grupo de exercício, ao término do experimento, quando comparados aos sedentários (natação, iniciaram com 30 min na semana 1; terminando com 45 min na semana 3 e das

semanas 4 a 9 nadaram por 50 min; 5 dias por semana; durante 9 semanas; com dieta acrescida de 0,2% de colesterol).

Discordantes com nosso trabalho estão o de MEILHAC et al. (2001) que relataram uma diminuição da área de lesão nas aortas de camundongos LDLr^{-/-} treinados em relação aos sedentários com dieta aterogênica (corrida, 30 minutos por dia a 15 metros por minuto, 5 dias por semana, durante 12 semanas). E no estudo de KIRK et al. (1998), o consumo de isoflavona não influenciou na área de lesão aterósclerótica no sinus aórtico, em camundongos LDLr^{-/-}, mas reduziu nos alimentados com proteína de soja e isoflavonas em relação aos sem nos animais C57Bl/6 (experimento por seis semanas nos LDLr^{-/-} e de 10 semanas nos C57Bl/6).

Um fator de risco importante para o desenvolvimento de aterosclerose é a dislipidemia, sendo esta definida como o aumento de componentes lipídicos – colesterol, triacilgliceróis e lipoproteínas no plasma. A relevância das dislipidemias como problema de saúde pública está na sua relação com as doenças cardiovasculares, particularmente com a doença aterósclerótica coronariana (GARCIA et al., 2002; HERRON et al., 2004). Embora não exista uma cura para aterosclerose, evidências sugerem que a redução de colesterol sérico total ou da fração LDLc (GIESEG & ESTERBAUER, 1994) e aumento da fração HDLc (LEAF, 2003) podem retardar a progressão das doenças cardiovasculares (GIESEG & ESTERBAUER, 1994; LEAF, 2003). Devemos ressaltar também, que os triacilgliceróis são componentes importantes de lipoproteínas, assim, além do colesterol, este lipídeo exerce papel importante na aterosclerose.

Em nosso estudo, foi observado em camundongos LDLr^{-/-} que o exercício físico não exerceu influência significativa em nenhum dos parâmetros analisados para o perfil lipídico: colesterol total, HDLc, fração aterogênica e relação colesterol total/HDLc e triacilgliceróis (Figuras de 10 a 14). Por outro lado, o extrato de soja promoveu aumento do HDLc e redução das frações aterogênicas e da relação colesterol total/HDLc, sem efeito no colesterol total e triacilgliceróis totais (Figuras de 10 a 14). A partir destes resultados do papel da soja na melhoria do perfil lipídico, poderia justificar, em parte, sua ação na diminuição do tamanho de lesões ateróscleróticas na raiz da aorta observada neste trabalho.

Foi constatado também, valores de colesterol total ao final das seis semanas significativamente menores em relação ao tempo inicial para todos os grupos experimentais. Isto poderia ser explicado, provavelmente, pela retroalimentação negativa na produção intracelular de colesterol por inibir a enzima HMG-CoA redutase, uma vez que os camundongos ingeriram dieta contendo colesterol (Figura 10).

O modo pelo qual a soja exerce benefícios nas doenças cardiovasculares parece estar relacionado ao seu conteúdo de isoflavonas (OMONI & ALUKO, 2005; ELIA et al., 2006), pois estes componentes possuem estrutura similar ao estrogênio endógeno (OMONI & ALUKO, 2005; DEWELL et al., 2006), o qual causa aumento no HDLc (SHEPHARD & BALADY, 1999). O que poderia justificar a hipótese das isoflavonas serem responsáveis pelo efeito do extrato de soja no HDLc e nas frações aterogênicas (DEWELL et al., 2006).

A importância do aumento das concentrações plasmáticas de HDLc está relacionada com suas propriedades antiinflamatórias e antioxidantes, além de realizar o transporte reverso do colesterol (ARNTZENIUS, 1991; LAMON-FAVA et al., 1999; LUSIS, 2000; BORGGREVE et al., 2003). Na parede celular, a HDLc pode inibir a migração de monócitos indutores de oxidação de LDLc, bem como a adesão de monócitos nas células do subendotélio arterial induzida por LDLox. Além disso, a HDLc pode ter papel modulador na produção de óxido nítrico endotelial, importante fator anti-aterogênico (ALENZI et al., 2004; HERMSDORFF et al., 2004).

Adicionalmente, o extrato de soja reduziu as frações aterogênicas, sendo um dos componentes desta fração a lipoproteína LDL que quando oxidada participa na formação de células espumosas iniciando o processo aterosclerótico.

Outros autores relataram resultados concordantes com os nossos, como PELLEGRIN et al. (2007) que observaram que o exercício físico regular não exerceu efeito sobre os parâmetros avaliados no perfil lipídico plasmático (colesterol total, HDLc e triacilgliceróis) em camundongos APOE^{-/-} com dieta acrescida de colesterol (natação, iniciou-se com 30 min na semana 1; terminando com 45 min na semana 3 e das semanas 4 a 9 nadaram por 50 min; 5 dias por semana; durante 9 semanas). Em relação à soja, KIRK et al. (1998) encontraram que as concentrações plasmáticas de colesterol total não diferiram entre os camundongos LDLr^{-/-} dos grupos alimentados com dieta contendo ou não proteína de soja, genisteína e daidzeína.

Resultados contrários aos nossos foram encontrados por MEILHAC et al. (2001) que observaram redução do colesterol total plasmático em camundongos LDLr^{-/-} treinados em relação aos sedentários, ambos com dieta aterogênica, porém sem diferença significativa entre os animais alimentados com dieta normal (corrida, 30 minutos por dia a 15 m por minuto, 5 dias por semana, durante 12 semanas). E KIRK et al. (1998) encontraram redução do colesterol total e o HDLc manteve-se constante em camundongos C57Bl/6 alimentados com proteína de soja contendo genisteína e daidzeína em relação aos sem esses componentes na dieta.

De acordo com SHEPHARD & BALADY (1999), a variabilidade nos resultados da literatura sobre exercício físico no metabolismo lipídico, pode ser devido, em parte, à heterogeneidade dos métodos (como: intensidade, frequência e tempo total de treinamento) e o uso de intervenções adicionais, como a dieta. No estudo de MEILHAC et al. (2001), relatado anteriormente, que verificaram diferenças no perfil lipídico, o tempo total de treinamento foi maior, 12 semanas, em relação ao nosso experimento, de seis semanas, que não observamos efeito do exercício físico nos parâmetros analisados para o perfil lipídico. Além disso, em um trabalho de BURNEIKO et al. (2006) a frequência do exercício (2 e 5 dias na semana) e a dieta (controle e hipercalórica) exerceram efeitos diferentes nos mesmos parâmetros para o metabolismo lipídico.

Neste estudo dois métodos para a avaliação da peroxidação lipídica em tecidos foram usados. Primeiramente, realizaram-se as dosagens das concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, entretanto esta metodologia não é específica visto que vários produtos primários e secundários de outros componentes (como proteínas e carboidratos), além dos provenientes da oxidação de lipídeos, poderiam reagir com o ácido tiobarbitúrico (ARAÚJO, 2001). Assim optou-se por dosar, também, os hidroperóxidos lipídicos.

No que diz respeito ao efeito do exercício físico e do extrato de soja no estresse oxidativo, encontramos uma ação aditiva de ambos sobre a fase de latência, proporcionando aumento do potencial antioxidante no soro. No entanto, quando separados o exercício físico e o extrato de soja não exerceram influência significativas nesta mesma fase (Figura 15). Com relação às concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e hidroperóxidos formados, o exercício físico e o extrato de soja promoveram a redução dos mesmos em tecido hepático, no entanto sem diferenças estatísticas entre os grupos experimentais no tecido renal (Figuras de 18 a 21).

Uma possível explicação para o efeito do exercício físico na peroxidação lipídica seria que quando realizado regularmente produz adaptações corporais que poderiam aumentar a capacidade antioxidante (GREATHOUSE et al, 2005; LAUFS et al., 2005). O moderado estresse oxidativo, induzido pelo exercício gradativo, regular, de intensidade moderada e predominantemente aeróbico, pode ser responsável por benefícios na aterosclerose, talvez por induzir defesas antioxidantes vasculares (NAPOLI et al., 2004). Como observado por NAKAO et al. (2000) que demonstraram o aumento do conteúdo de superóxido dismutase extracelular no fígado e no rim e a Mn-superóxido dismutase no pulmão e no rim e no músculo esquelético após treinamento, em camundongos C57Bl/6J (natação, 1 hora por dia, 5 dias por semana, durante 6 semanas); e por NAPOLI et al

(2004) que observaram que o exercício físico estimulou o aumento da atividade das enzimas catalase, glutathione peroxidase e Mn-superóxido dismutase em artérias de camundongos LDLr^{-/-} treinados em relação aos sedentários (natação, 60 minutos duas vezes por dia, 5 dias por semana, dieta hipercolesterolêmica, durante 18 semanas).

No que diz respeito aos possíveis mecanismos de ação da soja na redução da peroxidação lipídica e na progressão da lesão aterosclerótica na válvula aórtica, deve-se primeiramente, à sua possível ação antioxidante, ou seja, a genisteína e a daidzeína da soja agindo como removedores de radicais livres (ARORA et al., 1998; TIKKANEN et al., 1998). Devido à estrutura química polifenólica, estes componentes da soja podem doar átomos de hidrogênio para radicais livres e formar radicais menos reativos (ARORA et al., 1998). Uma segunda possibilidade está relacionada ao fato que esta mesma estrutura confere às isoflavonas a habilidade de quelar íons metálicos (ARORA et al., 1998; TIKKANEN et al., 1998). No estudo de ARORA et al. (1998) foi observado que o potencial antioxidante das isoflavonas (daidzeína, genisteína e alguns de seus metabólicos) é influenciado pela estrutura química das mesmas, constatando que, embora todos os isoflavonóides estudados tenham exercido efeito inibitório sobre a peroxidação lipídica induzida por ferro II, a eficiência destes componentes como antioxidantes foi influenciada pela posição do grupo hidroxila das estruturas químicas das isoflavonas, sendo a genisteína mais efetiva que a daidzeína.

Dos parâmetros analisados em nosso estudo, o papel do exercício físico na redução do tamanho das lesões ateroscleróticas foi devido apenas à diminuição da peroxidação lipídica no tecido hepático, pois sua ação nos outros marcadores ocorreu apenas quando associado à soja e não isoladamente. Por outro lado, a soja além de diminuir a peroxidação lipídica no tecido hepático melhorou o perfil lipídico.

Portanto, pode-se concluir que no tecido hepático a ação do extrato de soja e do exercício físico poderiam estar relacionados aos mecanismos antioxidantes citados acima. Entretanto, atuaram de forma favorável, na fase de latência, apenas quando os tratamentos foram administrados em conjunto. No rim estes tratamentos não foram suficientes para reduzir a peroxidação lipídica, demonstrando que as respostas são diferentes de acordo com o local estudado.

Na literatura foram encontrados trabalhos que estudaram a peroxidação lipídica em outros tecidos, confirmando diferentes efeitos de acordo com o local e os métodos utilizados. Como o estudo de GREATHOUSE et al. (2005) no qual os hidroperóxidos lipídicos, em músculo esquelético, foram reduzidos em ratos Sprague – dawley treinados quando comparados aos sedentários (corrida, 1 vez por dia, 20m/min, 35 min/sessão, 4

dias/semana, durante 4,5 semanas). Entretanto, THIRUNAVUKKARASU et al. (2003) não observaram diferenças nos hidroperóxidos hepáticos entre ratos Wistar alimentados com dieta comercial treinados e sedentários (corrida, 5 dias por semana, velocidade, tempo e inclinação da esteira aumentando gradativamente de 6 a 24 m/min, de 10 a 20 min e de 0 a 5° respectivamente, durante 6 semanas).

Com relação aos efeitos da soja sobre o estresse oxidativo, HODGSON et al. (1996) demonstraram o efeito da genisteína, daidzeína e de alguns de seus metabólitos na oxidação induzida por cobre (fase de latência) *in vitro* em lipoproteínas séricas. Três concentrações de cada componente foram testadas para avaliar a atividade antioxidante em amostras séricas de seis voluntários. Todos os componentes e todas as concentrações inibiram a oxidação da lipoproteína.

Os resultados deste trabalho, relacionados ao peso corporal e ao consumo alimentar dos camundongos LDLr^{-/-}, mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos durante as seis semanas de experimento (Figuras 8 e 9). Porém, houve aumento do peso ao longo das seis semanas de experimento, representando o crescimento dos animais.

Nossos resultados estão concordantes com o de SONG et al. (1996) que avaliaram o efeito do exercício (corrida, 60 minutos a 25 m/min, 5 dias por semana, durante 12 semanas) e da soja em ratos Wistar, também não obtendo diferenças no peso corporal e no consumo alimentar entre os grupos experimentais. No entanto, MEILHAC et al. (2001) mostraram que camundongos LDLr^{-/-} que realizaram exercício, tanto os alimentados com dieta normal quanto os com dieta aterogênica, obtiveram redução de peso em relação aos animais sem exercício (corrida, 30 minutos por dia a 15 m/min, 5 dias por semana, durante 12 semanas).

O exercício físico crônico em humanos, de acordo com KEMI et al. (2002), é acompanhado pelo aumento da captação máxima de oxigênio (VO_{2máx}). Em indivíduos saudáveis, o aumento da capacidade de realizar exercício físico é dependente de adaptações estruturais e funcionais em músculos esqueléticos, vasos sanguíneos e no coração. A adaptação cardíaca inclui: aumento do volume e peso da câmara ventricular, hipertrofia dos cardiomiócitos e melhora da função contrátil.

KEMI et al. (2002) relataram aumento da massa ventricular esquerda e direita em camundongos C57BL/6J machos e fêmeas treinados em relação aos destreinados (corrida, 2 horas por dia, 5 dias por semana, durante 8 semanas). Da mesma forma, PELLEGRIN et al. (2007) observaram aumento no peso relativo dos corações dos camundongos APOE^{-/-} do grupo de exercício físico em relação aos sedentários (natação,

começando com 30 min da semana 1; terminando com 45 min na semana 3 e das semanas 4 a 9 nadaram por 50 min; 5 dias por semana; durante 9 semanas; com dieta acrescida de colesterol).

Nós avaliamos o efeito da natação no peso relativo do coração (hipertrofia) e verificamos que o exercício físico utilizado não exerceu influência significativa sobre este parâmetro (Figura 17). A magnitude das respostas ao treinamento depende da duração, da intensidade, da freqüência e ao tempo total de treinamento, assim podendo justificar, em parte, o fato da diferença de resultados encontrados entre a literatura e o nosso estudo (JONES & CARTER, 2000), em especial podemos destacar em relação aos dois estudos citados, os tempos totais de treinamento que foram de oito e nove semanas em relação à seis semanas do nosso trabalho.

Entretanto, OH-SHI et al. (1996) e NAKAO et al. (2000) observaram que seis semanas de exercício físico aumentaram a atividade da enzima citrato sintase nos camundongos que realizaram o mesmo protocolo de natação do nosso estudo. Deste modo, estas seis semanas de exercício físico não influenciaram na hipertrofia cardíaca, mas podem aumentar o metabolismo oxidativo no músculo esquelético e no diafragma.

A variabilidade dos diversos resultados encontrados na literatura para o peso corporal, o perfil lipídico, o estresse oxidativo e na aterosclerose, no que diz respeito ao exercício físico, pode estar relacionado à variabilidade de intensidade, duração, freqüência e do tipo de exercício (SONG et al., 1996) e com relação à soja, pode ser devido às variações na composição das dietas contendo soja e seus componentes (proteínas de soja, isoflavonas e seus metabólitos) (DEWELL et al., 2006).

Concluindo, o exercício físico e o extrato de soja reduziram a área da lesão aterosclerótica na raiz aórtica. Podendo ser explicado, em parte, pelas alterações no perfil lipídico pela soja e na peroxidação lipídica no fígado e no soro por ambos.

No entanto, há outros possíveis mecanismos relatados na literatura, que não foram analisados neste trabalho, mas que poderiam justificar o papel exercido, de ambos, na diminuição da área da lesão aterosclerótica.

O exercício está também associado a modificações favoráveis nos fatores de riscos para doenças cardiovasculares, como, a redução da pressão sangüínea, o aumento da sensibilidade à insulina e da tolerância à glicose. Além disso, estudos relatam que quando de intensidade moderada, regular e crônico, o exercício físico pode reduzir a agregação plaquetária e desempenhar papel importante na regulação do tônus arterial, melhorando a função endotelial (SHEPHARD & BALADY, 1999), por meio do aumento da produção local de óxido nítrico (FUKAI et al., 2002).

No que diz respeito à soja, além de poder agir como antioxidante e melhorar o perfil lipídico, evidências sugerem que a proteína da soja, a isoflavona ou ambos poderiam reduzir a pressão sangüínea, melhorar a função celular endotelial e vascular, por inibir a ativação plaquetária, a migração e a proliferação de células musculares lisas e possivelmente efeitos diretos na inibição da aterosclerose mediado pelo receptor ER β (ANDERSON et al., 1995; CROUSE et al., 1999; ANTHONY, 2000).

6. CONCLUSÃO

A ingestão de extrato de soja, por seis semanas em camundongos LDLr^{-/-}, melhorou o perfil lipídico, uma vez que acarretou o aumento do HDLc e a redução das frações aterogênicas destes animais. O exercício físico não exerceu efeito nesses parâmetros.

O exercício físico e o extrato de soja foram capazes de reduzir as concentrações de hidroperóxidos e de TBARS em tecido hepático, diminuindo o estresse oxidativo nesse órgão.

Foi observado um efeito aditivo do extrato de soja e do exercício físico sobre a fase de latência sérica, em camundongos LDLr^{-/-}, prolongando o tempo de resistência à peroxidação lipídica.

Em relação à aterogênese, tanto o exercício físico quanto a ingestão do extrato de soja, por seis semanas, reduziram a evolução da aterosclerose em camundongos LDLr^{-/-}.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M.R.; GOLDEN, D.L.; ANTHONY, M.S.; REGISTER, T.C.; WILLIAMS J.K. The inhibitory effect of soy protein isolate on atherosclerosis in mice does not require the presence of LDL receptors or alteration of plasma lipoproteins. *J. Nutr.*, v. 132, p. 43-49, 2002.
- ADAMS, M.R.; GOLDEN, D.L.; REGISTER, T.C.; ANTHONY, M.S.; HODGIN, J.B.; MAEDA, N.; WILLIAMS J.K. The atheroprotective effect of dietary soy isoflavones in apolipoprotein E-/- mice requires the presence of estrogen receptor- α . *Arterioscler. Thromb. Vasc.Biol.*, v. 22, p. 1859-1864, 2002.
- ADAMS, M.R.; GOLDEN, D.L.; FRANKE, A.A.; POTTER, S.M.; SMITH, H.S.; ANTHONY, M.S. Dietary soy Beta-conglycinin (7S globulin) inhibits atherosclerosis in mice. *J. Nutr.*, v. 134, p. 511-516, 2004.
- ALENZI, M.Y.; MARCIL, M.; GENEST, J. High-density lipoproteins: target for cardiovascular disease prevention. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, v. 1, p. 159-164, 2004.
- ALLAIN, C.C.; POON, L.S.; CHAN, C.S.G.; RICHMOND, W.; FU, P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.*, v. 20, p. 470-475, 1974.
- ALVAREZ-LEITE, J.I. e PELUZIO, M.C.G. Lípidos. In: NETO, F. (Ed.). *Nutrição Clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 7-19 p.
- ALVAREZ-LEITE, J.I.; OLIVEIRA, D.R.; PELUZIO, M.C.G. Dislipidemias. In: Neto, F. (Ed.). *Nutrição clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 196-211 p.
- ANDERSON, J.W.; JOHNSTONE, B.M.; COOK-NEWLL, M.E. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N. Engl. J. Med.*, v. 333, n. 5, p. 276-282, 1995.
- ANTHONY, M.S. Soy and cardiovascular disease: cholesterol lowering and beyond. *J Nutr.*, v. 130, n. 3, p.662S-663S, 2000.

- ARNTZENIUS, A.C. Regression of atherosclerosis benefict can be expected from LDL-C and High HDL-C levels. *Acta Cardiol.*, v. 4, p. 431-438, 1991.
- ARAÚJO, J.M.A. Química de alimentos. 2.ed. Viçosa: editora UFV, 2001. 62-63 p.
- ARORA, A.; NAIR, M.G; STRASBURG, G.M. Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 356, n. 2, p. 133-41, 1998.
- ASHE, M.C.; KHAN, K.M. Exercise prescription. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.*, v. 12, p. 21-27, 2004.
- ASSMANN, G.; GOTTO, A.M., JR. HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation*. v. 109, p. III8-III14, 2004.
- BALADY, G.J.; BERRA, K.A.; GOLDING, L.A.; GORDON, N.F.; MAHLER, D.A.; MYERS, J.N.; SHELDAHL, L.M. Diretrizes do ACSM para os testes de esforço e sua prescrição. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 99-100 p.
- BANERJEE, D.; KUMAR P.A.; KUMAR, B.; MADHUSOODANAN, U.K.; NAYAK, S.; JACOB, J. Determination of absolute hydrogen peroxide concentration by spectrophotometric method. *Current. Science.*, v. 83, n. 10, p. 1193-1194, 2002.
- BENÍTEZ, S.; QUESADA, J.L.S.; LUCERO, L.; ARCELUS, R.; RIBAS, V.; JORBA, O.; CASTELLVÍ, A.; ALONSO, E.; VACA, F.B.; LLANOS, J.O. Changes in low-density lipoprotein electronegativity and oxidizability after aerobic exercise are related to the increase in associated non-esterified fatty acids. *Atheroscler.*, v. 160, p. 223-232, 2002.
- BERLINER, J.A.; NAVAB,M.; FOGELMAN, A.M.; FRANK, J.S.; DEMER, L.L.; EDWARDS, P.A.; WATSON, A.W.; LUSIS, A.J. Atherosclerosis: basis mechanisms. *Circulation*, v. 91, p. 2488- 2496, 1995.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. Nutr.*, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

- BINDER, C.J.; CHANG, M-K.; SHAW, P.X.; MILLER, Y.I.; HARTVIGSEN, K.; DEWAN, A.; WITZTUM, J.L. Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nature Medic.*, v. 8, n. 11, p. 1218 – 1226, 2002.
- BARBOSA, A.C.L.; HASSIMOTTO, N.M.A.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Teores de isoflavonas e capacidade antioxidante da soja e produtos derivados. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 26, n. 4, p. 921-926, 2006.
- BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot. (Lond.)*, v. 91, p. 179-94, 2003.
- BORGGREVE, S.E.; VRIES, R.; DULLAART, R.P.F. Alterations in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: role of lipolytic enzymes, lecithin: cholesterol acyltransferase and lipid transfer proteins. *Eur. J. Clin. Invest.*, v. 33, 1051-1069, 2003.
- BRESLOW, J.L. Mouse models of atherosclerosis. *Science*, v. 272, p. 685-688, 1996.
- BUSBY, J.; NOTELOVITZ, M.; PUTNEY, K.; GROW, T. Exercise, high-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular function in climacteric women. *South Med. J.*, v. 78, p. 769-773, 1985.
- BURNEIKO, R.C.M.; DINIZ, Y.S.; GALHARDI, H.G.R.; EBAID, G.M.X.; FAINE, L.A.; PADOVANI, C.R.; CICOGNA, A.C.; NOVELLI, E.L.B. Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. *Food and Chemical Toxicolog.*, v. 44, n. 7, p. 1167-1172, 2006.
- CASSIDY, A.; HANLEY, B.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Isoflavones, lignans and stilbenes - origins, metabolism and potential importance to human health. *J. Sci. Food Agric.*, v. 80, p. 1044-1062, 2000.
- CASTRO, L.C.V.; FRANCESCHINI, S.C.C.; PRIORE, S.E.; PELÚZIO, M.C.G. Nutrição e doenças cardiovasculares: os marcadores de risco em adultos. *Rev. Nutr.*, v. 17, n. 3, p. 369-377, 2004.

- CESQUINI, M. Efeito de flavonóides no eritrócito de indivíduos normais e portadores de anemia falciforme. Campinas: Instituto de Biologia da UNICAMP, 2001, 119 p. (Dissertação, Mestrado em Biologia Funcional e Molecular na área de Bioquímica).
- COHEN, G.; KIM, M.; OGWU, V. A modified catalase assay suitable for a plate reader and for analysis of brain cell cultures. *J. Neurosci. Methods.*, v. 67, p. 53-56, 1996.
- COOPER, C.E., VOLLAARD, N.B.; CHOUEIRI, T.; WILSON, M.T. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc. Trans.*, v. 30, p. 280-285, 2002.
- CROUSE, JR; MORGAN, T.; TERRY, JG.; ELLIS, J.; VITOLINS, M.; BURKE, GL. A randomized trial comparing the effects of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentrations of lipids and lipoprotein. *Arch. Intern. Med.* v. 159, p. 2070-2076, 1999.
- CYBULSKY, M.I. e GIMBRONE, M.A., JR. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*, v. 251, n. 4995, p. 788-791, 1991.
- DAVIES, M.J., RICHARDSON, P.D., WOOLF, N., KATZ, D.R. e MANN, J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br. Heart J.*, v. 69, n. 5, p. 377-381, 1993.
- DEWELL, A.; HOLLENBECK, P.L.; HOLLENBECK, C.B. Clinical review: a critical evaluation of the role of soy protein and isoflavone supplementation in the control of plasma cholesterol concentrations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 91, n. 3, p. 772-780, 2006.
- DIRETRIZES brasileiras sobre dislipidemias e diretriz de prevenção da aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia – III. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 77 (supl. III), 2001. 48 p.
- DONG, Z.M.; CHAPMAN, S.M.; BROWN, A.A.; FRENETTE, P.S.; HYNES, R.O.; WAGNER, D.D. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J. Clin. Invest.*, v. 102, n. 1, p. 145-52. 1998.

- DUTHIE, G.G.; DUTHIE, S.J.; KYLE, J.A.M. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutr. Res. Rev.*, v. 13, p. 79-106, 2000.
- ECKARDSTEIN, A.V.; NOFER, J-R.; ASSMANN, G. High density lipoproteins and arteriosclerosis: role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 21, p. 13-27, 2001.
- ELIA, D.; STADLER, K.; HORVATH, V.; JAKUS, J. Effect of soy- and whey protein-isolate supplemented diet on the redox parameters of trained mice. *Eur. J. Nutr.*, v. 45, n.5, p. 259-266, 2006.
- ENSIGN, W.Y.; MCNAMARA, D.J.; FERNANDEZ, M.F. Exercise improves plasma lipid profiles and modifies lipoprotein composition in guinea pigs. *J. Nutric. Biochem.*, v. 13, p. 747-753, 2002.
- ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr. Res*, v. 24, p. 851-874, 2004.
- FAZIO, S.; BABAEV, V.R.; MURRAY, A.B.; HASTY, A.H.; CARTER, K.J.; GLEAVES, L.A.; ATKINSON, J.B.; LINTON, M.F. Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v. 94, n. 9, p. 4647-4652, 1997.
- FAZIO, S.; LINTON, M.F. Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis. *Front. Biosci.* v. 6, p. D515-D525, 2001.
- FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin. Chem.*, v. 28, n. 10, p. 2077-2080. 1982.
- FUKAI, T.; FOLZ, R.J.; LANDMESSER, U.; HARRISON, D.G.; Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiov. Reas.*, v. 55, p. 239-249, 2002.
- GARCIA, R.W.D.; SPERANDIO, T.; PADEZZI, J.; LOPES, G.; ALVES, F.R.; DUARTE, T.O. Relação entre consumo alimentar, atividade física e características antropométricas e os

- lipídios séricos em pacientes com dislipidemias. *Rev. Bras. Nutr. Clin.*, v. 17, p. 99-106, 2002.
- GENEST, J. Lipoprotein disorders and cardiovascular risk. *J. Inherit. Metab. Dis.*, n. 26, p. 267-287, 2003.
- GIESEG, S.P.; ESTERBAUER, H. Low density lipoprotein is saturable by prooxidant copper. *Febs. Letters*, v. 343, p. 188-194, 1994.
- GIORDANO, F.J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J. Clin. Invest.*, v. 115, n. 3, p. 500-508, 2005.
- GLASS, C.K.; WITZTUM, J.L. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell*, v. 104, p. 503-516, 2001.
- GÓES-FAVONI, S.P.; BELÉIA, A.D.P.; CARRÃO-PANIZZI, M.C.; MANDARINO, J.M.G. Isoflavonas em produtos comerciais de soja. *Ciênc. Tecnol. Aliment* v .24, n. 4, p. 582-586, 2004.
- GREATHOUSE, K.L.; SAMUELS, M.; DIMARCO, N.M.; CRISWELL, D.S. Effects of increased dietary fat and exercise on skeletal muscle lipid peroxidation and antioxidant capacity in male rats. *Eur. J. Nutr.*, v. 44, n. 7, p. 429-435, 2005.
- GREEN, D.J.; MAIORANA, A.; O'DRISCOLL, G.; TAYLOR, R. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *J. Physiol.*, v. 561, p. 1-25, 2004.
- HALLIWELL, B. Antioxidants in Human Health and disease. *Annu. Rev. Nutr.*, v. 16, p. 33-50, 1996.
- HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 57, suppl. 5, p. 715S-724S, 1993.
- HANSSON, G.K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.*, v. 352, n. 16, p. 1685-1695, 2005.

- HANSSON, G.K.; LIBBY, P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 6, n. 7, p. 508-519, 2006.
- HASLER, C.M. The cardiovascular effects of soy products. *J. Cardiovasc. Nurs.*, v. 16, n. 4, p. 50-63, 2002.
- HERMSDORFF, H.H.M.; PELÚZIO, M.C.G.; FRANCESCHINI, S.C.C.; PRIORE, E. Evolução histórica dos valores de referência para perfil lipídico: o que mudou e por que. *Rev. Bras. Nutr. Clin.*, v. 19, p. 86-93, 2004
- HERRON, K.L.; LOFGREN, I.E.; SHARMAN, M.; VOLEK, J.S.; FERNANDEZ, M.L. High intake of cholesterol results in less atherogenic low-density lipoprotein particles in men and women independent of response classification. *Metab.*, v. 53, n. 6, p. 823-830, 2004.
- HODGSON, J.M.; CROFT, K.D.; PUDDEY, I.B.; MORI, T.A.; BEILIN, L.J. Soybean isoflavonoids and their metabolic products inhibit in vitro lipoprotein oxidation in serum. *J. Nutr. Biochem.*, v. 7, n. 12, p. 664-669, 1996.
- HOFKER, M.H.; VAN VLIJMEN, B.J.; HAVEKES, L.M. Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, v. 137, n. 1, p. 1-11. 1998.
- ISHIBASHI, S.; BROWN, M.S.; GOLSTEIN, J.L.; GERARD, R.D.; HAMMER, R.E.; HERZ, J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J. Clin. Invest.*, v. 92, p. 883-893, 1993.
- ISHIBASHI, S.; GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S.; HERZ, J.; BURNS, D.K. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J. Clin. Invest.*, v. 93, p. 1885-1893, 1994.
- JAWIEN, J.; NASTALEK, P.; KORBUT, R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J. Physiol. And Pharmac.*, v. 55, n. 3, p. 503-517, 2004.
- JEON, H.; BLACKLOW, S.C. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu. Rev. Biochem.* v. 74, p. 535-562, 2005.

JONES, A.M.; CARTER, H. The effect of endurance training on parameters of aerobic fitness. *Sports Medic.*, v. 29, n. 6, p. 373-386, 2000.

KATZMARZYK, P.T.; LEON, A.S.; RANKINEM, T.; GAGNON, J.; SKINNER, J.S.; WILMORE, J.H.; RAO, D.C.; BOUCHARD, C. Changes in blood lipids consequent to aerobic exercise training related to changes in body fatness and aerobic fitness. *Metabolism*, v. 50, n. 7 , p. 841-848 , 2001.

KEMI, O.J.; LOENNECHEN, J.P.; WISLOFF, U.; ELLINGSEN, O. Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy. *J. Appl. Physiol.*, v. 93, p. 1301-1309, 2002.

KIRK, E.A.; SUTHERLAND, P.; WANG, S.A.; CHAIT, A.; LEBOEUF, R.C. Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor-deficient mice. *J Nutr.*, v. 128, n. 6, p. 954-959, 1998.

KWON, H.M.; SHOI, Y.J.; JEONG, Y.J.; KANG, S.W.; KANG, I.J.; LIM, S.S.; KANG, Y.H. Anti-inflammatory inhibition of endothelial cell adhesion molecule expression by flavone derivatives. *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, p. 5150-5157, 2005.

LAMON-FAVA, S.; ORDOVAS, J.M.; SCHAEFER, E.J. Estrogen increases apolipoprotein (Apo) A-I secretion in Hep G2 cells by modulating transcription of the Apo A-I gene promoter. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 19, p. 2960-2965, 1999.

LAUFS, U.; WASSMANN, S.; CZECH, T.; MUNZEL, T.; EISENHAEUER, M.; BOHM, M.; NICKENIG, G. Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 25, n. 4, p. 809-814, 2005.

LEAF, D.A.; The effect of physical exercise on cholesterol transport. *Metabolism*, v. 52, n. 8, p. 950-957, 2003.

LEE, R.T.; LIBBY, P. The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* v.17, p.1859-1867, 1997.

- LEITE, H.P.; SARNI, S.S. Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição. *Rev. Bras. Nutr. Clin.*, v. 18, n. 2, p. 87-94, 2003.
- LEON, A.S. Exercise following myocardial infarction. *Sports Med.*, v. 29, n. 5, p. 301-311, 2000.
- LIBBY, P., AIKAWA, M., SCHONBECK, U. Cholesterol and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta*. v.1529, p.299-309, 2000.
- LIBBY, P. Atherosclerosis: the new view. *Scient. Americ.*, v. 5, n. 286, p. 46-55, 2002.
- LIU, R.H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 78, p. 517-520, 2003.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUSIS, A.J. Atherosclerosis. *Nature*, v. 407, n. 6801, p. 233-241, 2000.
- MADAMANCHI, N.R.; HAKIM, Z.S.; RUNGE, M.S. Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. *J. Thromb. Haemost.*, v. 3, n. 2, p. 254-267, 2005.
- MAFRA, D.; ABDALLA, D.S.P.; COZZOLINO, S.M.F. Peroxidação lipídica em pacientes com insuficiência renal crônica. *Rev. Nutr.*, v. 12, n. 3, p. 205-212, 1999.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food source and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 79, p. 727-747, 2004.
- MATÉS, J.M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; CASTRO, I.N. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochemist.*, v. 32, n.8, p.595-603, 1999.
- MATÉS, J.M.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front. Biosci.*, v. 4, p. 339-345, 1999.

- MARSH, S.A.; COOMBES, J.S. Exercise and the endothelial cell. *Intern. J. cardiology*, v. 99, p.165-169, 2005.
- MCCMAHON, S.; JENKINS, D. Factors affecting the rate of phosphocreatine resynthesis following intense exercise. *Sports Medic.*, v. 32, n. 12, 2002.
- MEILHAC, O.; RAMACHANDRAN, S.; CHIANG, K.; SANTANAM, N.; PARTHASARATHY, S. Role of arterial wall antioxidant defense in beneficial effects of exercise on atherosclerosis in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 21, p. 1681-1688, 2001.
- MEIR, K.S.; LEITERSDORF, E. Atherosclerosis in the apoprotein E-deficient mouse: a decade of progress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 24, p.1-9, 2004.
- MENG, Q.H.; LEWIS, P.; WAHALA, K.; ADLERCREUTZ, H.; TIKKANEN, M.J. Incorporation of esterified soybean isoflavones with antioxidant activity into low density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1438, n. 3, p. 369-376, 1999.
- MILLER, Y.I.; CHANG, M.K.; BINDER, C.J.; SHAW, P.X.; WITZTUM, J.L. Oxidized low density lipoprotein and innate immune receptors. *Curr. Opin. Lipidol.*, v. 14, n. 5, p. 437-45, 2003.
- MITCHINSON, M.J.; BALL, R.Y. Macrophages and atherogenesis. *Lancet*. v. 2, p.146-148, 1987.
- NAKAO, C.; OOKAWARA, T.; KIZAKI, T.; OH-ISHI, S.; MIYAZAKI, H.; HAGA, S.; SATO, Y.; JI, L.L.; OHNO, H. Effects of swimming training on three superoxide dismutase isoenzymes in mouse tissues. *J. Appl. Physiol.*, v. 88, p. 649-654, 2000.
- NAKASHIMA, Y.; RAINES, E.W.; PLUMP, A.S.; BRESLOW, J.L.; ROSS, R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 18, n. 5, p. 842-851, 1998.
- NAPOLI, C.; WILLIAMS-IGNARRO, S.; DE NIGRIS, F.; LERMAN, L.O.; D'ARMIENTO, F.P.; CRIMI, E.; BYNS, R.E.; CASAMASSIMI, A.; LANZA, A.; GOMBOS, F.; SICA, V.; IGNARRO, L.J. Physical training and metabolic supplementation reduce spontaneous

atherosclerotic plaque rupture and prolong survival in hypercholesterolemic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 103, n. 27, p. 10479-10484, 2006.

NAPOLI, C.; WILLIAMS-IGNARRO, S.; DE NIGRIS, F.; LERMAN, L.O.; ROSSI, L.; GUARINO, C.; MANSUETO, G.; DI TUORO, F.; PIGNALOSA, O.; DE ROSA, G.; Long-term combined beneficial effects of physical training and metabolic treatment on atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 101, n. 23, p. 8797-8802, 2004.

NELKEN, N.A.; COUGHLIN, S.R.; GORDON, D.; WILCOX, J.N. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest.*, v. 88, p. 1121-1127, 1991.

NEUZIL, J.; CHRISTISON, J.K.; IHEANACHO, E.; FRAGONAS, J.C.; ZAMMIT, V.; HUNT, N.H.; STOCKER, R. Radical-induced lipoprotein and plasma lipid oxidation in normal and apolipoprotein E gene knockout (apoE^{-/-}) mice: apoE^{-/-} mouse as a model for testing the role of tocopherol-mediated peroxidation in atherogenesis. *J. Lipid. Res.*, v. 39, p. 354-368, 1998.

NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SARMADI, J.; WOLFF, S.P. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal. Biochem.*, v. 220, n. 2, p. 403-409, 1994.

OH-ISHI, S.; TOSHINAI, K.; KIZAKI, T.; HAGA, S.; FUKUDA, K.; NAGATA, N.; OHNO, H. Effects of aging and/or training on antioxidant enzyme system in diaphragm of mice. *Respiration Physiol.*, v. 105, p. 195-202, 1996.

OMONI, A.O.; ALUKO, R.E. Soybean foods and their benefits: potential mechanisms of action. *Nutr Rev.* v. 63; n. 8; p. 272-83, 2005.

OPARA, E.C. Oxidative Stress. *Dis. Mon.*, v. 52, n. 5, p. 183-198, 2006.

PAIGEN, B.; MORROW, A.; HOLMES, P.A.; MITCHELL, D.; WILLIAMS, R.A. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis*. v. 68, p. 231-240, 1987.

PALINSKI, W.; ORD, V.; PLUMP, A.S.; BRESLOW, J.L.; STEINBERG, D.; WITZTUM, J.L. Apo E-deficient mice are model of lipoprotein oxidation in atherogenesis: demonstration of

oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arterioscler. Tromb.*; v. 14, p. 605-616, 1994.

PARTHASARATHY, S.; SANTANAM, N.; RAMACHANDRAN, S.; MEILHAC, O. Oxidants and antioxidants in atherogenesis: an appraisal. *J. Lipid. Res.*, v. 40, p. 2143-2157, 1999.

PATOCKOVA, J.; KRIAK, M.; MARHOL, P.; TUMOVA, E. Cerebrolysin inhibits lipid peroxidation induced by insulin hypoglycemia in the brain and heart of mice. *Physiol. Res.*, v. 52, p. 455-460, 2003.

PELLEGRIN, M.; BERTHELOT, A.; HOUDAYER, C.; GAUME, V.; DECKERT, V.; LAURANT, P. New insights into the vascular mechanisms underlying the beneficial effect of swimming training on the endothelial vasodilator function in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*, v. 190, n. 1, p. 35-42, 2007.

PINCHUK, I.; LICHTENBERG, D. The mechanism of action of antioxidants against lipoprotein peroxidation, evaluation based on kinetic experiments. *Prog. Lipid Res.*, v. 41, n. 4, p. 279-314, 2002.

PORTUGAL, L.R.; FERNADES, L.R.; CESAR, G.C.; SANTIAGO, H.C.; OLIVEIRA, D.R.; SILVA, N.M.; SILVA, A.A.; LANNES-VIEIRA, J.; ARANTES, R.M.E.; GAZZINELLI, R.T.; ALVAREZ-LEITE, J.I. Infection with toxoplasma gondii increases atherosclerotic lesion in ApoE-deficient mice. *Infection and Immunity*, v. 72, n.6, p. 3571-3576, 2004.

POWERS, S.K.; HOWLEY, E.T. Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho. 3. ed. São Paulo: Manole, 2000. 42 e 50 p.

PRIOR, B.M.; YANG, H.T.; TERJUNG, R.L. What makes vessels grow with exercise training? *J. Appl. Physiol.*, v. 97, p. 1119-1128, 2004.

PRIOR, R. L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 78, p. 570S-578S, 2003.

- PYNN, M.; SCHAFFER, K.; KONSTANTINIDES, S.; HALLE, M. Exercise training reduces neointimal growth and stabilizes vascular lesions developing after injury in apoprotein E-deficient mice. *Circulation*, v. 109, p. 386-392, 2004.
- RADER, D.J.; WILSON, J.M. Gene therapy for lipid disorders. In: HARBER, E. (Ed.). *Molecular cardiovascular medicine*. New York: Scientific American, 1995. 97-114 p.
- RAINES, E.W.; ROSS, R. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br Heart J.*, v. 69, p. S30-S37, 1993.
- REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C.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*, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.
- ROSS, R. Arteriosclerosis, an overview. In: HABER, E. (Ed.). *Molecular cardiovascular medicine*. New York: *Scientific American*, p. 11-30, 1995.
- ROSS, R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. In: EPSTEIN, F.H. *Mechanisms of Disease*. *The New Engl. J. of Medic.*, v. 340, n. 2, p. 115-126, 1999.
- ROSS, R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu. Rev. Physiol.*, v. 57, p. 791-804, 1995.
- ROSS, R.; GLOMSET, J.A. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell. *Science*, v. 180, n. 93, p.1332-1339, 1973.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2.ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2002. 198-199 p.
- SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.
- SCARTEZINI, M., LOPES, L.M., IHARA, S.S.M., PICHETH, G., LPOES, I.E.L. E MARTINEZ, T.L.R. Metabolismo de lípidos e lipoproteínas. In: MARTINEZ, T.L.R. (Ed.). *Conduas clínicas nas dislipidemias*. Belo Horizonte: Health, 1997. 25-40 p.

- SCHNITZER, E.; PINCHUK I.; BOR, A.; FAINARU, M.; SAMUNI, A.M.; LICHTENBERG, D. Lipid oxidation in unfracionated serum and plasma. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 92, p. 151-170, 1998.
- SCOTT, J. Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* v. 14, p. 271-279, 2004.
- SHEPHARD, R.J.; BALADY, G.J.; Exercise as cardiovascular therapy. *Circulation*, v. 99, p. 963-972, 1999.
- SHERN-BREWER, R.; SANTANAM, N.; WETZTEIN, C.; WHITE-WELKLEY, J.; PARTHASATHRATHY, S. Exercise and cardiovascular disease: a new perspective. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 18, p. 1181-1187, 1998.
- SJÖDIN, B.; WESTING, Y.H.; APPLE, F.S. Biochemical mechanisms for oxygen free radicals formation during exercise. *Sports Med.*, v. 10, n. 4, p. 236-254, 1990.
- SMITH, J.K. Exercise and atherogeneses. *Exerc. and Sports Sci. Rev.*, v. 29, n. 2, p. 49-53, 2001.
- SONG, Y.; IGAWA, S.; HORII, A. Antioxidant enzymes response to endurance exercise training and dietary proteins in rat skeletal muscle and liver. *Appl. Human Sci.*, v. 15, n. 5, p. 219-225, 1996.
- STEINBERG, D.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T.E.; KHOO, J.C.; WITZTUM, J.L. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.*, v. 320, p. 915-924, 1989.
- STEINBERG, D. A critical look at the evidence for the oxidation of LDL in atherogenesis. *Atherosclerosis*. v. 131, suppl, p. S5-S7, 1997.
- STEINBERG, D. Atherogenesis in perspective: hipercolesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nature Medic.*, v. 8, n. 11, 2002.
- STEFFENS, S.; MACH, F. Inflammation and atherosclerosis. *Herz*. v. 29, p. 741-748, 2004.

- STOCKER, R.; KEANEY, J.F.Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol. Rev.*, v. 84, n. 4., p. 1381-1478, 2004.
- SVILAAS, A.; SAKHI, A.K.; ANDERSEN, L.F.; SVILLAS, T.; STROM, E.C.; JACOBS, D.R.; OSE, L.; BLOMHOFF, R. Intakes of antioxidants in coffee, wine, and vegetables are correlated with plasma carotenoids in humans. *J. Nutr.*, v. 134, p. 562-567, 2004.
- THIRUNAVUKKARASU, V.; BALAKRISHNAN, S.D.; RAVICHANDRAN, M.K.; ANURADHA, C.V. Influence of 6-week exercise training on erythrocyte and liver antioxidant defense in hyperinsulinemic rats. *Comparative Bioq. and Phys. Part. C*, v. 135, p. 31-37, 2003.
- THOMPSON, P.D.; BUCHNER, D.; PIÑA, I.L.; BALADY, G.J.; WILLIAMS, M.A.; MARCUS, B.H.; BERRA, K.; BLAIR, S.N.; COSTA, F.; FRANKLIN, B.; FLETCHER, G.F.; GORDON, N.F.; PATE, R.R.; RODRIGUEZ, B.L. YANCEY, A.K.; WENGER, N.K. Exercise and physical activity in the prevention and exercise treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 23, p. e42-e49, 2003.
- TIKKANEN, M.J.; WAHALA, K.; OJALA, S.; VIHMA, V.; ADLERCREUTZ, H. Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 95, p. 3106-3110, 1998.
- TORRES, N.; TORRE-VILLALVAZO, I.; TOVAR, A.R. Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implication in diseases mediated by lipid disorders. *J. Nutr. Biochem.*, v. 17, n. 6, p. 365-373, 2006.
- ULBRICH, H.; ERIKSSON, E.E.; LINDBOM, L. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease. *Trends Pharmacol. Sci.* v. 24, p. 640-647, 2003.
- URSO, M.L.; CLARKSON, P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, v. 189, p. 41-54, 2003.
- VANDERLAAN, P.A.; REARDON, C.A.; GETZ, G.S. Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, n. 24, p. 12-22, 2004.

- WAGNER, J.D.; SCHWENKE, D.C.; GREAVES, K.A.; ZHANG, L.; ANTHONY, M.S.; BLAIR, R.M.; SHADOAN, M.K.; WILLIAMS, J.K. Soy protein with isoflavones, but not an isoflavone-rich supplement, improves arterial low-density lipoprotein metabolism and atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v.23, p. 2241-2246, 2003.
- WALLIN, B.; ROSENGREN, B.; SHERTZER, H.G.; CAMEJO, G. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. *Anal. Biochem.*, v. 208, p. 10-15, 1993.
- WITZTUM, J.L. Role of oxidised low density lipoprotein in atherogenesis. *Br. Heart J.*, v. 69, p. S12-S18, 1993.
- YANG, A-L.; CHEN, H-I. Chronic exercise reduces adhesion molecules/iNOS expression and partially reverses vascular responsiveness in hipercholesterolemic rabbit aortae. *Atheroscler.*, v. 169, p. 11-17, 2003.
- YANG, H.; ROBERTS, J.; SHI, M.J.; ZHOU, L.C.; BALLARD, B.R.; RICHARDSON, A.; GUO, Z.M. Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E. *Circ. Res.*, v. 95, p. 1075-1081, 2004.
- YANG, X.; GALEANO, N.F.; SZABOLCS, M.; SCIACCA, R.R.; CANNON, P.J. Oxidized low density lipoproteins alter macrophage lipid uptake, apoptosis, viability and nitric oxide synthesis. *J Nutr.*, v. 126, p. 1072S-1075S, 1996.