

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO - ALFENAS

DÊNIS BUENO DA SILVA

**PRÓPOLIS E NATAÇÃO NA PREVENÇÃO DA
ATEROGÊNESE E HIPERTROFIA VENTRICULAR
ESQUERDA DE CAMUNDONGOS
HIPERCOLESTEROLÊMICOS.**

ALFENAS – MG

2012

DÊNIS BUENO DA SILVA

**PRÓPOLIS E NATAÇÃO NA PREVENÇÃO DA
ATEROGÊNESE E HIPERTROFIA VENTRICULAR
ESQUERDA DE CAMUNDONGOS
HIPERCOLESTEROLÊMICOS.**

Dissertação apresentada à Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, como parte das exigências para conclusão do Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* e obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Adélia Pereira Miranda

ALFENAS - MG

2012

Silva, Dênis Bueno da

Própolis e natação na prevenção da aterogênese e hipertrofia ventricular esquerda de camundongos hipercolesterolêmicos/.—Dênis Bueno da Silva.-- Alfenas, 2012.

60 f.

Orientadora : Prof^a Adélia Pereira Miranda

Dissertação (Mestrado em ciência animal)-
Universidade José do Rosário Vellano

1.Dislipidemia 2. Hipertrofia ventricular esquerda 3.
Própolis 4.Camundongos LDLr/- I. Título

CDU: 616.12:638.135(043)

DÊNIS BUENO DA SILVA

**PRÓPOLIS E NATAÇÃO NA PREVENÇÃO DA ATEROGÊNESE E HIPERTROFIA
VENTRICULAR ESQUERDA EM COMUNDONGOS
HIPERCOLESTEROLÊMICOS.**

Dissertação apresentada como parte das exigências para conclusão do Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* e obtenção de título de Mestre em Ciência Animal da Universidade José do Rosário Vellano - UNIFENAS.

Aprovado em: _____

Prof^a. Orientadora Dra. Adélia Pereira Miranda
UNIFENAS

Prof^o. Dr. Renato Aparecido de Souza
IFSULDEMINAS

Prof. Dr. José Antonio Dias Garcia
UNIFENAS

ALFENAS – MG

2012

Dedico este trabalho à minha amada família, Daniela, Thaís e Thiago pelo apoio, incentivo, confiança e torcida por uma caminhada de sucesso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, porque **“TUDO POSSO NAQUELE QUE ME FORTALECE”**.
Filipense 4:13

Aos meus pais Afonso (*in memoriam*) e Conceição pela dedicação, incentivo e oração. Grato pelo apoio e preocupação. Amo vocês.

A minha esposa Daniela, agradeço a DEUS por colocá-la em meu caminho e ao meu lado, pois você é minha fortaleza terrena. Você é imprescindível na minha vida e seu exemplo foi determinante para que eu pudesse concluir este trabalho. Te amo.

Aos meus filhos Thaís e Thiago, obrigado pela amizade, incentivo e pelo exemplo de determinação e força. Vocês me fizeram acreditar neste sonho. Meu amor incondicional por vocês.

Aos meus familiares, pelo apoio e confiança, vocês sempre serão o meu porto seguro. Amo todos vocês.

Ao meu irmão Dr. Douglas Bueno da Silva e filhos, pelos livros, explicações e moradia no período da realização do projeto.

A Prof^a Dr^a Adélia Pereira Miranda, minha querida orientadora, por me acolher como orientado e pela paciência, dedicação, simplicidade e profissionalismo na condução do trabalho. Descobri uma amiga neste processo.

Ao Prof^o Dr. José Antônio Dias Garcia, meu amigo e co-orientador, por acreditar em mim e neste projeto. Sua participação foi norteadora para a conclusão deste trabalho.

Ao Prof^o Dr. Délcio Bueno da Silva, meu irmão e co-orientador, pela idéia inicial e apoio nas horas difíceis e ajuda na conclusão do trabalho.

Aos professores da pós-graduação, pelo convívio e pela partilha de suas experiências e conhecimentos ao longo do curso.

Aos colegas de turma, pelo convívio e amizade. Novos amigos engrandecem nossa trajetória de vida.

A aluna da UNIFENAS Leticia Romanna B. D'Angelo, pela dedicação, disponibilidade e compromisso na realização prática e apresentação do projeto.

Ao Paulo César Garcia Naves, técnico responsável pelo biotério da Unifenas, pela amizade, ajuda e ensinamentos práticos.

Aos alunos da UNIFENAS Bruno Barbosa e Jefferson Gabriel, pela ajuda e convívio durante o experimento.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais pela oportunidade para realização do curso.

RESUMO

Silva, Dênis Bueno. **Própolis e natação na prevenção da aterogênese e hipertrofia ventricular esquerda de camundongos hipercolesterolêmicos**. 2012. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). UNIFENAS, Alfenas, 2012.

O processo inflamatório, a disfunção do endotélio e o estresse oxidativo no ambiente cardiovascular decorrente das dislipidemias são as condições que promovem e sustentam a aterosclerose e a hipertrofia cardíaca. O presente estudo verificou o efeito da própolis isolada e da sua associação com a natação na dislipidemia, na hipertrofia ventricular esquerda e na aterogênese de camundongos hipercolesterolêmicos que já recebiam dieta hiperlipídica. Foram utilizados 40 camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica (20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5% de ácido fólico) *ad libitum* por 75 dias. Os animais foram divididos em 4 grupos (n=10): grupo hiperlipídico (HL), sedentário, submetido ao estresse aquático; grupo hiperlipídico + natação (HL NAT), submetido a um protocolo de natação (1 hora por dia, 5 vezes por semana) a partir do 16º dia do experimento; grupo hiperlipídico/própolis (HL PRO), sedentário, submetido ao estresse aquático e que recebeu própolis via oral (70 µL do extrato alcoólico de própolis a 85,71% todos os dias da semana) a partir do 16º dia do experimento; grupo HL NAT PRO, submetido a um protocolo de natação (1 hora por dia, 5 vezes por semana) a partir do 16º dia do experimento e que recebeu própolis via oral (70 µL do extrato alcoólico de própolis a 85,71% todos os dias da semana) a partir do 16º dia do experimento. Após os 75 dias de experimento, os animais foram pesados e anestesiados. O sangue foi coletado e foram realizadas as análises laboratoriais de colesterol total e frações, e triglicerídeos. Após a toracotomia, o coração e a artéria aorta foram removidos. O coração foi pesado e dissecado, o ventrículo esquerdo isolado, calculou-se a razão entre peso ventricular (mg) e peso animal (g), e, em seguida, foi processado histologicamente. Lâminas do ventrículo e aorta foram coradas com hematoxina e eosina (HE) e picrosírius red para análise histológica e histoquímica; outras lâminas foram tratadas imunohistoquimicamente com anticorpos antiproteína pró-inflamatória (CD40L) para avaliar o processo inflamatório. Os animais HL apresentaram dislipidemia severa, aterogênese e hipertrofia ventricular esquerda associada a uma diminuição dos níveis séricos da lipoproteína de alta densidade (HDL) e consequente desenvolvimento de processo anti-inflamatório cardiovascular caracterizado pelo aumento da expressão CD40L no ventrículo esquerdo e na aorta. A natação e a própolis separadas e/ou associadas preveniu a hipertrofia ventricular esquerda (HVE), a aterogênese, a inflamação ventricular e arterial, diminuindo a expressão de CD40L e aumentando os níveis plasmáticos da HDLc. A própolis isolada ou associada com uma atividade física regular é benéfica na proteção cardiovascular por ação anti-inflamatória.

Palavras chaves: Dislipidemia, hipertrofia ventricular esquerda, própolis, camundongos LDLr^{-/-}.

ABSTRACT

Silva, Dênis Bueno. **Própolis and swimming in the prevention of atherogenesis and left ventricular hypertrophy in hypercholesterolemic mice**. 2012. 60 f. Dissertation (Dais in Animal Science). UNIFENAS. Alfenas, 2012.

Inflammatory process, endothelial dysfunction and oxidative stress in cardiovascular environment resulting from dyslipidemia are the conditions that promote and sustain atherosclerosis and cardiac hypertrophy. The present study verified the effect of propolis alone and its association with swimming in dyslipidemia, left ventricular hypertrophy and atherogenesis of hypercholesterolemic mice that were receiving a high-fat diet. 40 LDLr^{-/-} mice, fed with high fat diet (20% total fat, 1.25% cholesterol and 0.5% cholic acid) ad libitum for 75 days, were used in the study. The animals were divided into 4 groups (n=10): hyperlipidic group (HL), sedentary, subjected to aquatic stress; hyperlipidic + swimming group (HL+NAT), submitted to a swimming protocol (1 hour per day, 5 times per week) from the 16th day of the experiment; hyperlipidic + propolis group (HL+PRO), sedentary, submitted to aquatic stress and which received oral propolis (70 µL of the propolis alcoholic extract of 85,71% every weekday) from the 16th day of the experiment; HL+NAT+PRO group, submitted to swimming protocol (1 hour per day, 5 times per week) from the 16th day of the experiment and which received oral propolis (70 µL of the propolis alcoholic extract of 85,71% every weekday) from the 16th day of the experiment. After 75 days of the experiment, the animals were weighed and anesthetized. Blood was collected and laboratory analyzes were performed for total cholesterol and fractions, and triglycerides. After thoracotomy, heart and aorta were removed. The heart was weighed and dissected, the left ventricle isolated, the ratio between the ventricular weight (mg) and the animal weight (g), was calculated and after, it was histologically processed. Ventricle and aorta slides were stained with hematoxina and eosin (HE) and picosirius red for histological and histochemical analyzes; other slides were treated immunohistochemically with anti-protein proinflammatory CD40L antibodies to evaluate the inflammatory process. The HL animals showed severe dyslipidemia, atherogenesis and left ventricular hypertrophy, associated with a decrease in serum high density lipoprotein (HDL) levels and subsequent development of cardiovascular anti-inflammatory process, characterized by increased expression of CD40L in the left ventricle and aorta. Swimming and propolis separated and / or associated prevented left ventricular hypertrophy (HVE), atherogenesis, ventricular and arterial inflammation, decreasing the expression of CD40L and increased plasma levels of HDL-C. A propolis alone or associated with regular physical activity is beneficial in cardiovascular protection by anti-inflammatory action.

Keywords: Dyslipidemia, left ventricular hypertrophy, propolis, LDLr^{-/-} mice.

LISTA DE FIGURA E TABELA

- FIGURA 1** Esquema representativo da lipoproteína. 19
- FIGURA 2** Tradução do estímulo hipertrófico do cardiomiócito. 25
- FIGURA 3** Diferenciação da hipertrofia excêntrica e concêntrica. 27
- TABELA 1** Níveis séricos de colesterol total (CT) e suas frações HDLc, LDLc e 40
VLDLc, triglicerídeos (TG) e as relações CT/HDL, LDL/HDL, TG/HDL
entre camundongos HL (hiperlipidêmicos), HL+NAT (hiperlipidêmicos
submetidos a natação), HL+PRO (hiperlipidêmicos tratados com
própolis) e HL+NAT+PRO (hiperlipidêmicos submetidos à natação e
tratados com própolis).
- TABELA 2** Área de lesão aterosclerótica na aorta, porcentagem da área 41
imunorreativa para CD40L na aorta e no miocárdio/endocárdio, da
proporção peso ventricular (PV)/ peso animal (PA) e do diâmetro dos
cardiomiócitos entre camundongos HL (hiperlipidêmicos), HL+NAT
(hiperlipidêmicos submetidos à natação), HL+PRO (hiperlipidêmicos
tratados com própolis) e HL+NAT+PRO (hiperlipidêmicos submetidos à
natação e tratados com própolis).
- FIGURA 4** Fotomicrografias de cortes histológicos da aorta (painel A- corados com 42
HE mostrando área de lesão aterosclerótica); Fotomicrografias de cortes
histológicos transversais da aorta (painel B- área imunorreativa para
CD40L); Fotomicrografias de cortes histológicos do
miocárdio/endocárdio (painel C- corados com *picrosírius red* mostrando
depósito de colágeno intersticial); Fotomicrografias de cortes
histológicos do miocárdio/endocárdio (painel D- área imunorreativa para
CD40L em camundongos HL (hiperlipidêmicos), HL+NAT
(hiperlipidêmicos submetidos a natação), HL+PRO (hiperlipidêmicos
tratados com própolis) e HL+NAT+PRO (hiperlipidêmicos submetidos a
natação e tratados com própolis).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
ACSM	American College of Sports Medicine
AHA	American Heart Association
ANOVA	Análise de Variância
Apo AI	Apolipoproteína AI
ATPK	Adenosina Trifosfato Kinase (Canais de Potássio)
CD40	Proteína receptora de membrana CD40
CD40L	Proteína Pró-inflamatória CD40 Ligante
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CE	Colesterol Esterificado
CL	Colesterol Livre
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro Quadrado
CT	Colesterol Total
CT/HDL	Relação Colesterol Total por Lipoproteína de Alta Densidade
DEPA	Departamento de Estudos e Pesquisa em Aterosclerose
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
dL	Decilitros
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
EPM	Erro Padrão da Média
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FL	Fosfolípidos
g	Gramas
GMPc	Guanosina Monofosfato Cíclico
HE	Hematoxina e Eosina
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDLc	Lipoproteína de Alta Densidade Colesterol
HL	Hiperlipidêmico
HL+NAT	Hiperlipidêmicos submetidos a natação
HL+NAT+PRO	Hiperlipidêmicos submetidos à natação e tratados com própolis
HL+PRO	Hiperlipidêmicos tratados com própolis
HVE	Hipertrofia Ventricular Esquerda
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular-1
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IKK	Inibidor Kappa β quinase
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzida
IP	Intraperitonal
Kg	Quilogramas
LCAT	Lecitina Colesterol Aciltransferase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL/HDL	Relação Lipoproteína de Baixa Densidade por Lipoproteína de Alta Densidade
LDLc	Lipoproteína de Baixa Densidade Colesterol
LDLox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LDLr ^{-/-}	Deficiência para o gene que expressa o receptor de LDL

LLP	Lipase Lipoprotéica
M-CSF	Fator Estimulante da Colônia de Macrófagos
mg	Miligramas
Mm	Massa Molecular
mmLDL	Lipoproteína de Baixa Densidade minimamente modificada
MPO	Mieloperoxidase
NAT	Natação
NFkappaβ	fator nuclear Kappaβ
NIH	National Institutes of Health
NO	Oxido Nítrico
PA	Peso Animal
PBS	Fosfato Salino Tamponado
PCAM-1	Molécula de Adesão Plaqueta Endotelial-1
pH	Potencial Hidrogeniônico
PRO	Própolis
PV	Peso Ventricular
QM	Quilomicrons
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
SOD	Superóxido Desmutase
TG	Triglicerídeos
TG/HDL	Relação Triglicerídeos por Lipoproteína de Alta Densidade
USSG	Surgeon General
VCAM1	Molécula de Adesão Vascular-1
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
VLDLc	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade Colesterol
WT	Wide Type (Animais Selvagens)
μL	Microlitros
μm ²	Micrômetro quadrado
15-LO	15-lipoxigenase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 DISLIPIDEMIA	17
3.1.1 LIPOPROTEÍNAS	17
3.1.2 DIAGNÓSTICO DA DISLIPIDEMIA	20
3.2 ATEROSCLEROSE	20
3.3 HIPERTROFIA CARDÍACA	24
3.3.1 CLASSIFICAÇÃO DA HIPERTROFIA	26
3.4 EXERCÍCIO FÍSICO	27
3.4.1 EXERCÍCIO FÍSICO E O PERFIL LIPÍDICO	29
3.4.2 EXERCÍCIO FÍSICO E A HIPERTROFIA CARDÍACA	30
3.5 PRÓPOLIS	31
3.5.1 AÇÃO ANTIOXIDANTE DA PRÓPOLIS	32
3.6 MODELO ANIMAL	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 CUIDADOS ÉTICOS	35
4.2 LOCAL	35
4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	35
4.4 AMOSTRAS PARA ANÁLISES	36
4.5 ANÁLISES DAS AMOSTRAS DE SANGUE	37
4.5.1 ANÁLISES SÉRICAS DO TRIGLICÉRIDES	37
4.5.2 ANÁLISE SÉRICA DO COLESTEROL TOTAL	37
4.5.3 ANÁLISE SÉRICA DA LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE	38
4.5.4 ANÁLISES SÉRICAS DO VLDL E LDL	38
4.5.5 PROCEDIMENTO HISTOLÓGICO E IMUNOISTOQUÍMICO	38
4.5.6 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E MORFOMÉTRICAS	39

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
5 RESULTADOS	40
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÃO	46
REFERENCIAIS	47

INTRODUÇÃO

O processo inflamatório (KAI *et al.*, 2005), a disfunção do endotélio (AUBIN *et al.*, 2006) e o estresse oxidativo (LANG *et al.*, 2000), no ambiente cardiovascular decorrente das dislipidemias, são as condições que promovem e sustentam a aterosclerose e a hipertrofia cardíaca.

A aterosclerose é uma doença inflamatória (LUSIS, 2000) e as principais hipóteses da aterogênese descritas nas últimas décadas são a do transporte reverso do colesterol (ZHANG *et al.*, 2003) e da oxidação da LDL (NAVAB *et al.*, 2004). Ambas as hipóteses apontam o papel central da lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL ox), como iniciadora e da lipoproteína de alta densidade (HDL), como protetor da aterogênese (NAVAB *et al.*, 2004). Evidências suportam um papel central da interação entre a proteína pró-inflamatória CD40 ligante (CD40L) e CD40 (seu receptor de membrana) na patogênese da aterosclerose (LUTGENS, 2002; ANDRÉ *et al.*, 2002). A expressão de CD40L correlaciona-se com a gravidade dos processos inflamatórios. Vários estudos têm demonstrado que CD40L afeta as funções endoteliais. A interação CD40L-CD40 pode desencadear a produção de várias citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (THIENEL, 1999; CHAKRABARTI, 2007) e expressão da metaloproteinase de matriz, e fator de crescimento endotelial vascular (MACH *et al.*, 1999; FLAXENBURG *et al.*, 2004). A inibição da sinalização CD40-CD40L pode efetivamente reduzir a aterosclerose em ratos (MACH, 1998).

Estudos de Garcia *et al.* (2008) mostraram que a hipercolesterolemia induziu a hipertrofia ventricular esquerda via CD40L-CD40. A interação entre CD40 e CD40L ativa a via fator nuclear Kappa β (Nfkappa β) (GELBMANN *et al.*, 2003) e promove a fosforilação do IKK (inibidor Kappa β quinase), resultando na translocação do fator nuclear Kappa β (NFKappa β) para o núcleo, onde ativa genes envolvidos na inflamação e no crescimento celular (VELLAICHAMY *et al.*, 2005). A ativação do NFKappa β participa do desenvolvimento da hipertrofia cardíaca em camundongos, caracterizada por aumento do depósito de colágeno (VELLAICHAMY *et al.*, 2005). Estudos mostraram também que a prevenção da hipertrofia ventricular esquerda e a resistência ao desenvolvimento de lesões neointimais em camundongos LDLr^{-/-} (deficiência para o gene que expressa o receptor de LDL) alimentados com dietas padrões podem estar relacionadas com a menor atividade da via CD40/CD40L em decorrência do aumento dos níveis de plasmáticos HDL (GARCIA *et al.*, 2011).

A regulação do metabolismo lipídico com drogas, alimentos naturais e atividade física é um alvo importante para diminuir o risco de doenças cardiovasculares. Estes tratamentos têm sido utilizados de forma empírica, carecendo de metodologia de estudo que permita conclusões mais confiáveis. Nas últimas décadas, a associação da atividade física com fitoterápicos na prevenção de doenças cardiovasculares vem crescendo. A atividade física realizada por indivíduos de variadas faixas etárias e níveis de aptidão cardiorrespiratória foi benéfica nas modificações dos níveis e composição química das frações e subfrações da HDLc-colesterol e LDLc-colesterol, transformação de LDL-colesterol pequenas e densas, consideradas mais aterogênicas, em grandes e menos densas. Poucos foram aqueles que não encontraram mudanças significativas nos níveis de HDL-colesterol e LDL-colesterol com o exercício aeróbio (HURLEY, 1989).

A própolis, um produto das abelhas (*Apis mellifera*, L.) apresenta na sua composição principalmente flavonóides (BANKOVA, 2000; MARCUCCI, 2001) e tem sido utilizada em medicina popular em muitos países desde os tempos antigos, porque apresenta propriedades antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória (WANG, 1993; MARCUCCI, 1995; BANSKOTA, 2002; MENEZES, 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar o efeito da própolis e da natação na concentração plasmática dos lipídeos, nas alterações histológicas ventriculares e na imunorreatividade da CD40L arteriais em camundongos (LDLr^{-/-}) alimentados com dieta hiperlipídica.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificar a concentração sérica do colesterol total (CT), suas frações e triglicérides (TG) em camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica submetidos à natação e/ou tratados com própolis.

- Determinar a proporção peso ventricular esquerdo (mg)/peso do animal (g) e o diâmetro dos cardiomiócitos e avaliar o depósito de colágeno no tecido cardíaco em camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica submetidos à natação e/ou tratados com própolis.

- Quantificar a área de lesão aterosclerótica na aorta em camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica submetidos à natação e/ou tratados com própolis.

- Quantificar a área imunorreativa de CD40L no miocárdio e na aorta em camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica submetidos à natação e/ou tratados com própolis.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Dislipidemia

A dislipidemia são distúrbios do metabolismo lipídico, em geral caracterizados por modificação no conteúdo das lipoproteínas. Quando os níveis sanguíneos das lipoproteínas estão acima ou abaixo dos valores de referência, a dislipidemia é denominada hiperlipidemia ou hipolipidemia, respectivamente. A dislipidemia também pode ser classificada em primária ou secundária. A primeira decorre de fatores genéticos ou de interação ambiental, e a última em consequência do uso de medicamentos ou devida a alguma doença de base (FONSECA *et al.*, 2002).

O Departamento de Estudos e Pesquisa em Aterosclerose (DEPA) da Sociedade Brasileira de Cardiologia classifica as dislipidemias de acordo com os níveis séricos dos lipídeos ou das lipoproteínas circulantes. Assim, quatro tipos de dislipidemias podem ocorrer: hipercolesterolemia isolada; hipertrigliceridemia isolada; dislipidemia mista; hipoalfalipoproteinemia (HDL-c abaixo de 35mg/dL) isolada ou associada à hipercolesterolemia ou à hipertrigliceridemia. Evidentemente esta classificação simplifica o diagnóstico, mas ainda não identifica a causa genética ou secundária, entretanto, tem a vantagem de facilitar a orientação terapêutica, e representa um ponto de partida para uma investigação etiológica (FONSECA *et al.*, 2002).

Santos, Guimarães e Diament (1999) concordam com as subdivisões acima citadas, porém, ressaltam que esta classificação é válida para indivíduos em dieta livre e sem medicação hipolipemiante há pelo menos três semanas.

3.1.1 Lipoproteínas

Os lipídeos são importantes e com funções essenciais para as células, pois revestem as membranas celulares, participam da síntese de hormônios, formação da bile e ainda atuam como fonte de energia. Estes não podem circular no plasma sanguíneo, e por isso necessitam de uma estrutura própria para o seu transporte, as lipoproteínas. Desta forma, as gorduras se ligam a proteínas, promovendo um arranjo molecular que torna hidrofílica a parte externa da partícula formada. A presença de proteína na camada externa da lipoproteína tem grande importância no metabolismo lipídico, participando ativamente como componente estrutural, e ainda, como co-fator de várias reações, direcionando o caminho metabólico destas partículas. Estas proteínas são chamadas de apolipoproteínas ou apenas apoproteínas (FONSECA *et al.*, 2002; SANTOS, GUIMARÃES, DIAMENT, 1999).

Fonseca, Izar (1999) e Siqueira, Abdalla, Ferreira (2006) apresentaram as apolipoproteínas ou apoproteína e sua presença varia de acordo com o tipo de lipoproteína (apo AI, AII, AIV, B48, B100, CI, CII, CIII, E entre outras). Apresentam também os diferentes lípidos que constituem as lipoproteínas: os triglicérides (TG), os fosfolípidos (FL), o colesterol livre (CL) e o colesterol esterificado (CE). 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 fosfolípidos e o colesterol esterificado e livre os principais para o ser humano (ALVAREZ-LEITE, OLIVEIRA, 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 fosfolípidos 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). Com natureza hidrofóbica, os lípidos são transportados no plasma sob a forma de aglomerados denominados lipoproteínas, que são constituídas por uma capa hidrofílica composta por fosfolípidos, colesterol livre e proteínas, envolvendo um núcleo hidrofóbico que contém triacilgliceróis, colesterol esterificado e algumas vitaminas lipossolúveis - Figura 1 (GENEST, 2003).

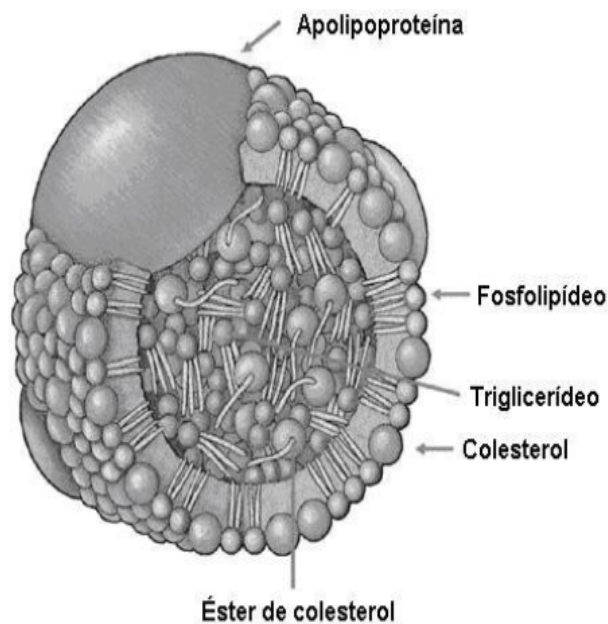


Figura 1 - Esquema representativo de uma lipoproteína (modificada de GENEST, 2003).

As lipoproteínas são classificadas pela sua densidade: quilomicrons, remanescentes dos quilomicrons, lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL) (FONSECA *et al.*, 2002; SANTOS, GUIMARÃES, DIAMENT, 1999).

Os quilomicrons são sintetizados no intestino e são responsáveis pelo transporte da gordura proveniente dos alimentos ingeridos. As VLDLs são formadas e sintetizadas no fígado, transportando os triglicérides endógenos, com quantidades menores de colesterol. Sofrem a ação da lipase lipoprotéica (LLP) nos capilares periféricos, que hidrolisam os triglicérides e reduzem o seu tamanho de partícula, formando as IDLs. As IDLs derivam das VLDLs formando partículas intermediárias na constituição das LDLs. Estas são formadas a partir da hidrólise das VLDLs pela enzima lipase lipoprotéica (LLP) dando origem as LDLs. As LDLs são formadas pelo metabolismo das IDLs e representam a maior forma de transporte de colesterol para os tecidos periféricos (adipócitos e músculos). Estas podem sofrer modificações estruturais (oxidação) e serem captadas por macrófagos presentes na camada íntima vascular. As LDLs oxidadas formam as células espumosas que alteram a morfologia da LDL, iniciando a aterosclerose (inflamação do ateroma). As HDLs são sintetizadas no fígado e intestino delgado. Inicia-se pela HDL nascente, que remove colesterol livre dos tecidos periféricos através da enzima lecitina colesterol aciltransferase (LCAT) e seu co-fator (Apo AI). Este colesterol é levado para o fígado podendo ser reutilizado ou eliminado pela bile.

Este processo é conhecido por transporte reverso do colesterol (FONSECA *et al.*, 2002; SANTOS, GUIMARÃES, DIAMENT, 1999; ROZMAN, 1999).

3.1.2 Diagnósticos da dislipidemia

O diagnóstico da dislipidemia é basicamente laboratorial, pois grande parte dos pacientes não apresenta sinais clínicos, mas através de uma análise de antecedentes familiares, estilo de vida e uso de medicamentos pesquisados durante a anamnese é possível identificar o tipo da dislipidemia. Segundo o III Congresso Brasileiro sobre Dislipidemias (2001), devem ter o perfil lipídico avaliado: portadores de doença arterial coronariana, homens após vinte anos, mulheres na pós-menopausa, mulheres reprodutivas com um ou mais fatores de risco. Crianças e adolescentes com parente de primeiro grau que apresente dislipidemia ou doença aterosclerótica precoce (FONSECA *et al.*, 2002).

Os lipídeos são comumente medidos por beta-quantificação: níveis de colesterol total, triglicerídeos e HDLc são medidos diretamente; os níveis de LDLc são estimados pela equação de Friedewald, Levy, Fredrickson (1972) ($LDLc = \text{colesterol total} - HDLc - [\text{triglicerídeos}/5]$). A medida do LDLc é útil para a monitorização da terapia lipídica e para avaliar o risco de um paciente para um evento coronariano.

3.2 Aterosclerose

A aterosclerose consiste em uma complexa e crônica inflamação que ocorre nas artérias de médio e grande calibre (BERLINER *et al.*, 1995; 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), sedentarismo (KATZMARZYK *et al.*, 2001), tabagismo (ROSS, GLOMSET, 1973; KATZMARZYK *et al.*, 2001; BINDER *et al.*, 2002), obesidade (KATZMARZYK *et al.*, 2001; SMITH, 2001), dentre outros. Esta doença é caracterizada pela formação de placas na parede de médias e grandes artérias. Essas placas ateroscleróticas, ou ateromas, são formados por um núcleo rico em gordura e debris celulares, com graus variáveis de deposição de cálcio, envoltos por uma capa fibrosa composta de células musculares lisas vasculares e colágenas, recobertas por uma camada de células endoteliais (LIBBY, RIDKER, MASERI, 2002).

Em condições fisiológicas, o endotélio contribui com a homeostase vascular por promover alterações funcionais adaptativas. O endotélio libera várias substâncias autócrinas e parácrinas com atividades pró e anticoagulantes, capazes de promover adesão celular e com

ações vasoativas. A homeostase vascular é o resultado da regulação dinâmica dessas funções (GROSS, AIRD, 2000).

Dentre estas patologias, destacam-se a aterosclerose, hipertensão arterial, hiperlipidemia (LIBBY, RIDKER, MASERI, 2002) associadas à baixa concentração plasmática da lipoproteína de alta densidade (HDL), aumento da concentração da lipoproteína de baixa densidade (LDL), disfunção endotelial (LUSIS, 2000) e diabetes (ZIRLIK *et al.*, 2007), as quais apresentaram como denominador comum o processo inflamatório e a resistência insulínica.

A hipercolesterolemia e outras doenças lipidêmicas que levam à aterosclerose têm sido associadas à redução na biodisponibilidade de NO devido ao aumento de estresse oxidativo, prejuízo na taxa de “turnover” da oxido nítrico sintase endotelial (eNOS), além de um aumento da presença dos níveis de dimetilarginina assimétrica (ADMA) (VANHOUTTE *et al.*, 2009). Em animais e humanos, a hipercolesterolemia reduz a dilatação/relaxamento dependente do endotélio (JAIN, RIDKER, 2005; MICHEL, VANHOUTTE, 2010) e o início do processo de aterogênese pode ser percebido após apenas uma semana de exposição à dieta hipercolesterolêmica, com monócitos aderidos à superfície endotelial e, subsequentemente, atingindo a íntima vascular. A aderência dos monócitos ao endotélio pode ser reduzida pelo estímulo à maior produção de NO (TSAO *et al.*, 1994). Assim, a manutenção da biodisponibilidade de NO adequada no ambiente vascular cria condições que inibem o desenvolvimento do ateroma, uma vez que irá promover a inibição (CHANNON *et al.*, 2000) de:

- Adesão, agregação e ativação das plaquetas induzida pela trombina;
- Proliferação, migração de células da musculatura lisa e síntese de matriz extracelular;
- Adesão e ativação de neutrófilos e monócitos, apresentando efeitos inflamatórios;
- Formação de LDL oxidada que é altamente aterogênica, apresentando efeitos antioxidantes.

Na presença de fatores inflamatórios e dos fatores de risco cardiovasculares mais frequentes, há perda da ação protetora do endotélio, com aumento da propensão à vasoconstrição, trombose, inflamação e proliferação celular na parede do vaso (GIMBRONE JR, 1995). Assim, a perda da atividade biológica do NO, denominada de disfunção endotelial, pode ser o evento desencadeante da doença aterosclerótica vascular em humanos (GANZ, VITA, 2003) e a sua avaliação é um marcador precoce de risco de aterosclerose.

Segundo Lusic (2000) a aterosclerose é uma patologia com desenvolvimento dinâmico e com presença de elementos característicos nas diferentes fases do processo. Desta forma há um enorme interesse em se determinarem marcadores ou fatores indicadores para as

diferentes fases, tanto em humanos, como em diferentes modelos de estudo como, por exemplo, os camundongos transgênicos e “knockout”. Estes diferentes estágios são caracterizados por evidências estruturais e expressão de fatores indicadores ou marcadores nas lesões (LUSIS, 2000; LUSIS *et al.*, 2004).

As lesões ateroscleróticas podem ser classificadas em:

- **Lesão tipo I (Inicial):** Caracterizada pela infiltração de LDL na íntima, através das junções endoteliais. O local de maior ocorrência da lesão é em regiões das artérias expostas a fluxo sanguíneo turbulento, baixos fluxos ou ambos (BARAKAT e LIEU, 2003) e nas áreas onde o estresse de cisalhamento fluxo-induzido é baixo (KONOWLES e MAEDA, 2000). Sua retenção na parede do vaso envolve interações entre a fração Apo B (apolipoproteína B) da LDL e proteoglicanos da matriz extracelular. Neste ambiente diferente do plasmático a LDL sofre modificação, incluindo oxidação, lipólise, proteólise e agregação. As modificações iniciais são caracterizadas pela formação da mmLDL (lipoproteína de baixa densidade minimamente modificadas). Enzimas envolvidas nesta modificação incluem: 15-LO (15-lipoxigenase), iNOS (óxido nítrico sintase induzida), MPO (mieloperoxidase) e várias lipases.

- **Lesão tipo II (Inflamação):** As mmLDL (LDL minimamente modificadas) têm atividade pró-inflamatória, mas não são suficientemente modificadas a ponto de serem reconhecidas pelos receptores responsáveis pela remoção da oxLDL (LDL oxidada). Contudo, são eficientes no estímulo às células endoteliais em produzir numerosas moléculas pró-inflamatórias, incluindo moléculas de adesão como ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1), VCAM1 (molécula de adesão vascular-1), PCAM-1 (molécula de adesão plaqueta endotelial-1) e P selectina, as quais exercem efeito quimiotático para monócitos e células T, bem como os fatores de crescimento como o M-CSF (fator estimulante da colônia de macrófagos).

- **Lesão tipo III (Formação das células espumosas):** Agregados de LDLs altamente oxidadas são formados no vaso como resultado da ação das ROS (espécies reativas de oxigênio) e das enzimas como SMase (esfingomielinase), sPLA2 (fosfolipase secretória 2), outras lipases e MPO (mieloperoxidase). Este agregado é reconhecido pelos receptores *scavenger* dos macrófagos (SR-A – receptor *scavenger* tipo A, CD36 e CD68). A expressão destes receptores é mediada por citocinas como TNF- α (fator de necrose tumoral- α) e IFN- γ (interferon- γ).

- **Lesão Tipo IV (Formação da placa e fibrose):** Caracterizada pelo aumento da massa lipídica extracelular, em sua maioria colesterol e seus ésteres, e pelo acúmulo de SMCs (células musculares lisas). Citocinas e fatores de crescimento secretado pelos macrófagos e células T são importantes para migração e proliferação das SMCs. A interação do CD40 com seu ligante CD40L (CD154) tem um importante papel no desenvolvimento de lesões avançadas. O produto desta interação constitui-se de citocinas inflamatórias, proteases como MMP-1 (matriz metaloproteinase -1), MMP-3 e MMP-9, responsáveis pela degradação de matriz, além de moléculas de adesão como VCAM-1, E-selectin e ICAM-1.

- **Lesão Tipo V (Lesões complexas e trombose):** Este estágio é caracterizado pelo ateroma com múltiplos núcleos de lipídeos e centros necróticos na íntima. Evidencia-se tecido altamente desorganizado pela apoptose e presença de áreas de calcificação resultando na placa de fibroateroma com áreas calcificadas. Quando há presença de cápsula fibrosa delgada devido à ação de degradação de matriz por várias proteinases, tem sido denominada de placa vulnerável e apresenta aumento de células inflamatórias com frequente ruptura do endotélio subjacente à lesão. Assim, com frequência verificam-se vestígios de ruptura da placa e presença de plaquetas e fibrina. Tal ruptura expõe o colágeno e fatores teciduais, formando os trombos, que podem ser visualizados na base da membrana da íntima. Muitos fatores determinam e desestabilizam o ateroma promovendo a trombose, dentre eles a inflamação e as respostas por ela desencadeadas parecem ser as mais relevantes.

Neste contexto, tem sido verificado o papel do receptor CD40 e seu ligante CD40L em vários estágios da aterosclerose, compreendendo fases de início, evolução e complicações agudas após a ruptura da placa. Uma série de estudos mostrou esta interação por meio de sua expressão em uma ampla variedade de células, e foi demonstrada em artérias carótida e aorta de humanos, a presença de CD40-CD40L em sítios de inflamação crônica, incluindo lesões ateroscleróticas (REUL *et al.*, 1997; MACH *et al.*, 1997; GAWECO *et al.*, 1999; AFFORD *et al.*, 1999). Foi demonstrado que a ligação entre CD40 e CD40L induz a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais (KARMANN *et al.*, 1995; HOLLENBAUGH *et al.*, 1995; YELLIN *et al.*, 1995) e estimula a liberação de quimiocinas, como IL-8 (interleucina 8) e MIP-1-a (proteína inflamatória de macrófago 1a) (KIENER *et al.*, 1995; HENN *et al.*, 1998; KORNBLUTH *et al.*, 1998), e que tais moléculas participam localmente nas fases iniciais da aterosclerose.

3.3 Hipertrofia cardíaca

A hipertrofia cardíaca refere-se a um mecanismo compensatório ao aumento de sobrecarga imposta ao coração, ocorrendo pela necessidade do órgão de ajuste para suportar novas cargas de trabalho (URHAUSEN, KINDERMANN, 1999; PLUIM *et al.*, 2000; DORN, 2007).

De forma harmônica ocorre o crescimento fisiológico do coração e seus constituintes (miócitos, vasos e matriz intersticial colágena), sem prejuízo para as características funcionais do músculo cardíaco (CRESSONI *et al.*, 2008). O miocárdio dos mamíferos passa por um crescimento hipertrófico durante a maturação pós-nascimento, que é caracterizado por aumento no tamanho individual dos cardiomiócitos sem divisão celular (LORELL, CARABELLO, 2000). Esse desenvolvimento hipertrófico pode ser reiniciado no coração adulto em resposta a alterações hemodinâmicas e/ou neuro-hormonais (HUNTER, CHIEN, 1999).

De acordo com Garcia e Incerpi (2008) quando o cardiomiócito recebe um estímulo hipertrófico, esse é traduzido no interior da célula, como alterações bioquímicas que levam à ativação de segundos (citossólicos) e terceiros (nucleares) mensageiros que irão agir no núcleo da célula, regulando a transcrição e, finalmente, determinarão a expressão gênica que induz a hipertrofia ventricular esquerda (HVE) (Figura 2).

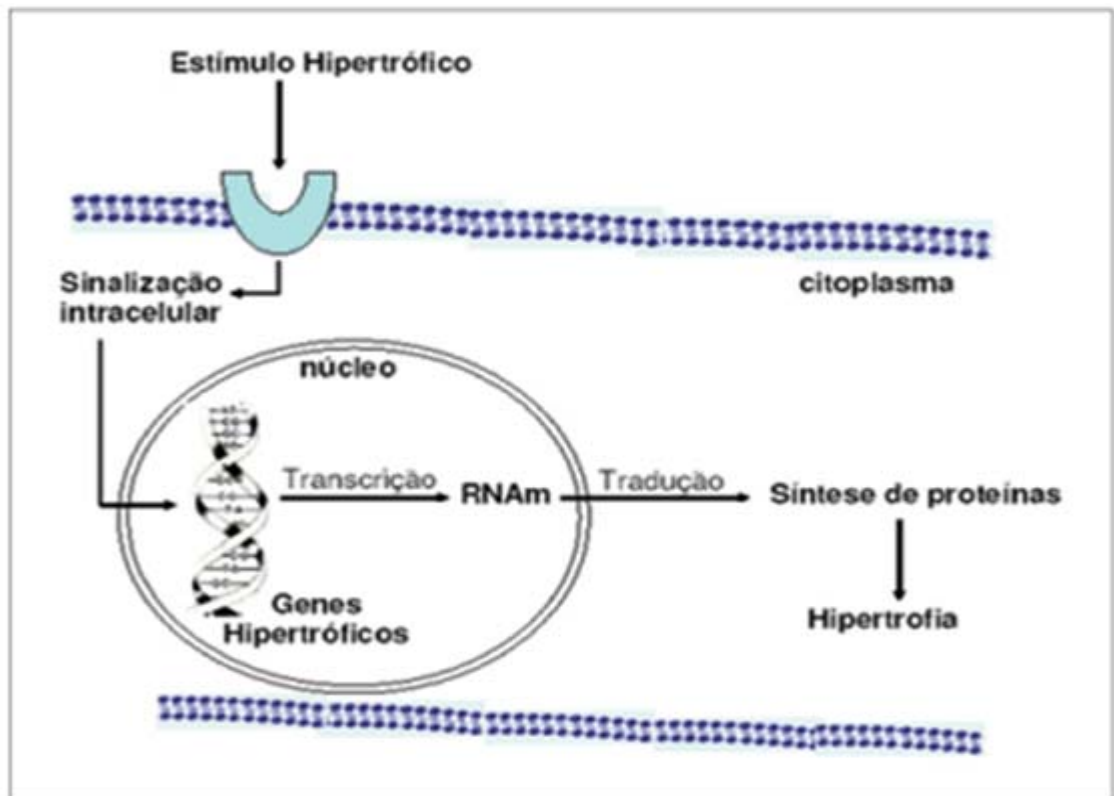


Figura 2 - Tradução do estímulo hipertrófico no interior do cardiomiócito (Garcia e Incerpi, 2008.)

O crescimento dos cardiomiócitos na hipertrofia ventricular esquerda pode ocorrer pela adição de sarcômeros em série (sobrecarga de volume) ou em paralelo (sobrecarga de pressão), permitindo que a célula aumente em comprimento ou em diâmetro, levando à hipertrofia excêntrica ou concêntrica, respectivamente (KEMPF, WOLLERT, 2004). Exercícios aeróbios promovem sobrecarga de volume ou aumento de pré-carga sobre o miocárdio, induzindo a hipertrofia excêntrica. Ocorrendo a adição de sarcômeros em série resulta em aumento da câmara cardíaca sem prejuízo de função (STEDING *et al.*, 2010). Exercícios resistidos, como o levantamento de peso, levam à sobrecarga pressórica ou aumento de pós-carga, desenvolvendo hipertrofia concêntrica, aumentando a espessura da parede do ventrículo esquerdo (VE) e adição de sarcômeros em paralelo, sem alteração do tamanho da câmara cardíaca ou prejuízo da função (STEDING *et al.*, 2010). Uma das diferenças entre a hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica pode consistir no tempo de estímulo. Na patologia o coração trabalha continuamente contra uma sobrecarga pressórica ou volumétrica aumentada, e no exercício físico esse estímulo ocorre de forma intermitente (IEMITSU *et al.*, 2001; MCMULLEN, JENNINGS, 2007).

3.3.1 Classificação da Hipertrofia

Situações patológicas e fisiológicas promovem adaptações hipertróficas do miocárdio com características fenotípicas e funcionais diferentes entre si, podendo ser classificadas, de modo geral, como hipertrofia concêntrica e excêntrica (OLIVEIRA, KRIEGER, 2002; CARREÑO *et al.*, 2006; BARAÚNA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2009; LAUSCHKE, MAISCH, 2009; BERNARDO *et al.*, 2010; FERNANDES, SOCI, OLIVEIRA, 2011).

O crescimento dos cardiomiócitos na hipertrofia ventricular esquerda pode ocorrer pela adição de sarcômeros em série (sobrecarga de volume) ou em paralelo (sobrecarga de pressão), permitindo que a célula aumente em comprimento ou em diâmetro, levando à hipertrofia excêntrica ou concêntrica, respectivamente (Figura 3) (KEMPF, WOLLERT, 2004).

A hipertrofia cardíaca concêntrica é caracterizada pelo crescimento do cardiomiócito com inserção de sarcômeros em paralelo (Figura 3) e proliferação da matriz intersticial seguida de fibrose que, em conjunto, levam à disfunção sistólica e diastólica (SCHAPER, 1998). Nas hipertrofias concêntricas ocorre aumento de massa ventricular decorrente de aumento da espessura da parede e redução dos diâmetros cavitários. Tal condição surge em decorrência de um aumento de resistência à ejeção ou à sobrecarga de pressão (MILL, VASSALLO, 2001). A complacência da parede ventricular depende da quantidade, da

distribuição e da composição do colágeno que forma o estroma conjuntivo (MILANEZ, 1995; SARAIVA, 1997; FRIMM, 1998). Considerando que as fibras colágenas de maior rigidez podem aumentar em hipertrofias concêntricas, essa condição pode provocar deficiência no processo de relaxamento do miocárdio, levando ao aparecimento da insuficiência diastólica (WEBER, BRILLA, JANICKI, 1991; WOODWISS, OOSTHUYSE, NORTON, 1998).

A hipertrofia cardíaca excêntrica caracteriza-se pelo crescimento do cardiomiócito com a inserção de sarcômeros em série (Figura 3) e poucas alterações da matriz intersticial. Ocorre um aumento da massa ventricular com manutenção ou aumento dos diâmetros cavitários. Esta condição surge em decorrência da sobrecarga de volume (MILL, VASSALLO, 2001).

Atualmente estudos sugerem que o estiramento muscular imposto pela sobrecarga de volume favorece a degradação do colágeno, num processo provavelmente envolvendo a degranulação de mastócitos, favorecendo a função diastólica (CRESSONI *et al.*, 2008). Neste caso as características do estroma não se alteram e, conseqüentemente, não ocorre prejuízo funcional (WEBER, BRILLA, JANICKI, 1991; WOODWISS, OOSTHUYSE, NORTON, 1998).

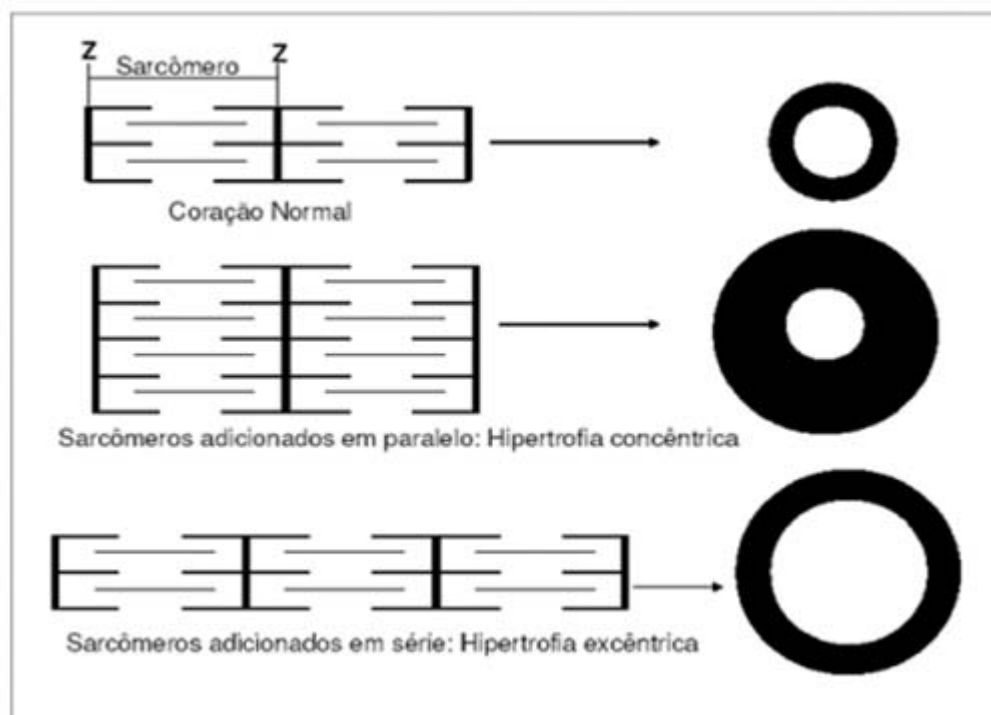


Figura 3 - Diferenciação da hipertrofia excêntrica e concêntrica (Garcia e Incerpi, 2008).

3.4 Exercício físico

Com o avanço da tecnologia, os indivíduos passaram a adotar modos de vida mais sedentários, tornando-se mais inativos fisicamente. Estudos epidemiológicos demonstram expressiva associação entre estilo de vida ativo, menor possibilidade de morte e melhor qualidade de vida. A atividade física e o exercício previnem efetivamente a ocorrência de eventos cardíacos, reduzem a incidência de acidente vascular cerebral, hipertensão, diabetes *mellitus* do tipo 2, dislipidemias, cânceres de cólon e mama, fraturas osteoporóticas, doença vesicular, obesidade, depressão e ansiedade, além de retardarem a mortalidade (ACSM, 2007).

Atualmente, diferentes associações de saúde no mundo, como "American College of Sports Medicine" (ACSM), "American Heart Association" (AHA), "Centers for Disease Control and Prevention" (CDC), "National Institutes of Health" (NIH), "US Surgeon General" (USSG) e Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) tem indicado a atividade física visando à prevenção e a reabilitação de doenças cardiovasculares e outras doenças crônicas. Alguns estudos têm demonstrado uma grande relação entre inatividade física e presença de vários fatores de risco, como os encontrados na síndrome metabólica. Estes têm demonstrado efeitos benéficos do exercício físico sobre a hipertensão arterial, a resistência à insulina, o diabetes, a dislipidemia e a obesidade. Atentas a estas evidências, diversos órgãos de saúde, objetivando a massificação da prática regular de atividade física, têm diversificado sua abordagem tradicional na prescrição de exercício físico para a manutenção da saúde (CARLET *et al.*, 2006).

Considerando a alta prevalência do sedentarismo aliada ao significativo risco referente às doenças crônico-degenerativas, o aumento da atividade física de uma população influencia na qualidade da saúde da coletividade, minimizando custos com tratamentos, inclusive hospitalares, o que reflete seus consideráveis benefícios sociais (CARVALHO *et al.*, 1996).

Segundo o American College of Sports Medicine (ACSM, 2007), a atividade física é definida como qualquer movimento corporal produzido pela contração da musculatura esquelética que eleva substancialmente o gasto de energia através de um exercício físico. Shephard e Balady (1999) e Thompson *et al.* (2003) corroboram a citação acima, dizendo que a atividade física pode ser definida como um movimento físico produzido pelos músculos esqueléticos que resulta em gasto energético pelo organismo. Enquanto que o exercício físico é uma subclasse da atividade física que é definido como o movimento planejado, estruturado e principalmente repetitivo, que visa à melhora e ou a manutenção do condicionamento cardiorrespiratório e físico, incluindo a força muscular, a composição corporal e a

flexibilidade (ACSM, 2007). A resposta ao exercício físico depende do tipo, frequência, intensidade e duração do mesmo (SHEPHARD, BALADY, 1999; JONES, CARTER, 2000).

Os exercícios físicos fazem com que as variáveis cardiorrespiratórias se alterem com a finalidade de aumentar o transporte de oxigênio e nutrientes aos músculos em atividade. 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 exige um suprimento constante de ATP, existem vias metabólicas celulares com capacidade de produção rápida: formação de ATP pela degradação da creatina fosfato; da glicose (denominada glicólise) ou do glicogênio (glicogenólise) e formação oxidativa da ATP. Nos dois primeiros processos não há utilização de oxigênio (O), sendo denominada via anaeróbica. Já na formação oxidativa o metabolismo é aeróbico (ASHE, KHAN, 2004).

Estudos mostram que o treinamento físico aeróbio promove benefícios tanto na prevenção como no tratamento de doenças cardiovasculares e endócrino-metabólicas, como a hipertensão arterial, o diabete *mellitus*, as dislipidemias e a aterosclerose (CHAKRAVARTHY *et al.*, 2002). Um dos mecanismos pelos quais o exercício físico promove esses efeitos está associado ao aumento do fluxo sanguíneo causado sobre a parede dos vasos, resultando em aumento na produção de óxido nítrico (NO) e/ou de sua biodisponibilidade para o músculo liso vascular (ZANESCO, ANTUNES, 2007; ZAGO, ZANESCO, 2006).

O óxido nítrico é o principal fator de relaxamento derivado do endotélio, encarregado de manter o tônus vascular e a reatividade endotelial. A resposta vasomotora do endotélio em situação de normalidade ocorre, enquanto no lúmen vascular, em função do fluxo sanguíneo e do estresse de cisalhamento que incide sobre a parede do vaso (GONZALES, SELWYN, 2003; MOYNA, TOMPSON, 2004). 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 se caracteriza por ser um dos primeiros passos para o início da aterosclerose (GREEN *et al.*, 2004; PRIOR *et al.*, 2004; MARSH, COOMBES, 2005). No entanto, progressivas adaptações ao exercício podem diminuí-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).

A natação tem sido utilizada em várias pesquisas por produzir respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares agudas ao exercício e adaptações ao exercício crônico. Apresenta as vantagens de recrutar um grande volume de massa muscular e promover extensivas

adaptações ao sistema cardiovascular e ao músculo esquelético (AMERICAN PHYSIOLOGY SOCIETY, 2006). É um exercício cuja prática tem-se acentuado, sendo prescrito como tratamento não farmacológico adjuvante em casos de hipertensão arterial, obesidade e cardiopatias, atenuando os efeitos dos fatores de risco cardiovasculares (MEDEIROS *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2007).

3.4.1 Exercício físico e o perfil lipídico

O treinamento físico aeróbio produz vários efeitos benéficos sobre a musculatura esquelética, o metabolismo e o coração, além dos efeitos sobre a circulação coronariana e periférica. Essas adaptações fisiológicas dependem da quantidade de treinamento físico, a qual é determinada pelo volume (tempo de treinamento), intensidade (nível de carga de treinamento) e frequência (número de sessões de treinamento em um determinado espaço de tempo) de treinamento físico (MATHEWS, FOX, 1976; WEINECK, 1986; O'TOOLE *et al.*, 1987). Estes apresentam uma inversa relação com o desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas, tanto por efeitos agudos quanto crônicos. O exercício físico pode contribuir indiretamente para melhorias do perfil lipídico, auxiliando na redução da massa corporal. Cada quilograma (Kg) de massa corporal perdida corresponde à redução de 1% nos níveis de CT e LDL, diminuição de 5-10% nos TG e aumento de 1-2% nas concentrações de HDL (DÂMASO, 2001).

O exercício físico praticado regularmente produz modificações no metabolismo lipídico e lipoprotéico (COUTINHO, CUNHA, 1989; VODAK *et al.*, 1980). A relação entre as alterações da HDL colesterol, LDL colesterol e o treinamento aeróbio parece estar bem definida. O efeito agudo ou crônico do exercício aeróbio, tanto de baixa como de alta intensidade e duração, pode melhorar o perfil lipoprotéico, estimulando o melhor funcionamento dos processos enzimáticos envolvidos no metabolismo lipídico (aumento da lipase lipoprotéica e lecitina colesterol acil-transferase; redução da lipase hepática), favorecendo principalmente aumentos dos níveis da HDL colesterol e da subfração HDL2-colesterol, assim como, modificando a composição química das LDL colesterol, tornando-as menos aterogênicas. A redução da atividade da proteína de transferência de colesterol esterificado também parece acontecer. Porém, o efeito agudo do exercício aeróbio é mais claro nos homens. Essas mudanças podem ser notadas tanto em indivíduos normolipidêmicos como dislipidêmicos (ZIOGAS *et al.*, 1997; VASANKARI *et al.*, 1998; GRANDJEAN *et al.*, 2000).

3.4.2 Exercício físico e a hipertrofia cardíaca

O exercício regular resulta no aumento da expectativa de vida e protege indivíduos saudáveis e cardiopatas contra eventos cardíacos (BUSCH *et al.*, 2002).

Muitos estudos procuram evidenciar a influência do exercício físico sobre a hipertrofia cardíaca (URHAUSEN, KINDERMANN, 1999). Como efeito do treinamento físico, também se observa o aumento de massa cardíaca em resposta à sobrecarga de trabalho nas sessões de exercício (BARBIER *et al.*, 2006; CARREÑO *et al.*, 2006). O treinamento físico aeróbio, como a natação, se intenso e prolongado, gera adaptações cardíacas tanto estruturais e funcionais (PETKOWICZ, 2004). Estudos mostraram que o exercício de baixa intensidade (50% VO₂máx) não gera hipertrofia cardíaca e alteração de contratilidade. Entretanto, o treinamento físico de média a alta intensidade (70-85% do VO₂máx) leva ao desenvolvimento da hipertrofia cardíaca (NUTTER, PRIEST, FULLER, 1981). O surgimento deste tipo de hipertrofia ocorre principalmente por um aumento da pré-carga com consequente aumento da tensão diastólica, sendo estes fatores determinantes para o desenvolvimento de sarcômeros em série e manutenção ou aumento do tamanho das câmaras cardíacas, gerando assim a hipertrofia cardíaca excêntrica (OLIVEIRA, KRIEGER, 2002). A hipertrofia cardíaca concêntrica decorrente do treinamento de força é gerada pela sobrecarga pressórica que ocorre no ventrículo esquerdo, ou seja, pelo aumento da pós-carga, que é caracterizado pelo elevado pico de tensão sistólica. Como resposta a essa sobrecarga hemodinâmica ocorre aumento no diâmetro dos miócitos, pela adição de novos sarcômeros em paralelo, o que leva a um aumento na espessura da parede do ventrículo esquerdo (COLAN, 1997; GROSSMAN *et al.*, 1975; SHAPIRO, 1997).

3.5 Própolis

A própolis é constituída de uma série de substâncias resinosas, balsâmicas e gomosas, com uma consistência viscosa. É extraída de brotos e cascas de árvores ou outras partes do tecido vegetal, pelas abelhas, as quais a transportam para a colmeia, onde modificam sua composição, com secreção própria como a cera e secreções salivar essencial, ou, ainda resultante do processo de digestão do pólen pelas abelhas (PARK *et al.*, 2002). Possui aroma característico, dependendo da origem botânica, cor variando desde a amarelada, esverdeada clara ao pardo escuro.

A origem do nome própolis vem do grego, onde *pro* (defesa) e *polis* (cidade) significa que as abelhas utilizam para a defesa da sua colméia contra predadores e microrganismo (PEREIRA *et al.*, 2002). A sua composição básica é de 50% de resinas vegetais, 30% de cera

de abelha, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen, 5% de microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e pequenas quantidades de vitaminas B1, B2, B6, C e E (PARK *et al.*, 2002; BURDOCK, 1998; FUNARI, FERRO, 2006; MENEZES 2005; WOISKY *et al.*, 1998). Estes valores são da própolis da espécie *Apis Mellifera*, L.. Esta vem sendo utilizada há milhares de anos em medicina popular e atualmente várias pesquisas são realizadas visando a confirmar as atividades antifúngicas, antiprotozoária, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antineoplásica e antioxidante (MENEZES, 2005).

A composição química da própolis inclui flavonoides (como a galangina, quercetina, pinocembrina e kaempferol), ácidos aromáticos e ésteres, aldeídos e cetonas, terpenoides e fenilpropanoides (como os ácidos cafeico e clorogênico), esteroides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos e vários outros compostos em pequenas quantidades (HU *et al.*, 2005; HAYACIBARA *et al.*, 2005; OZKUL *et al.*, 2004; MATSUDA *et al.*, 2002; ROCHA *et al.*, 2003). Há também na sua constituição elementos inorgânicos como o cobre, manganês, ferro, cálcio, alumínio, vanádio e silício (MARCUCCI, 1996). De todos esses grupos de compostos, certamente o que vem chamando mais atenção dos pesquisadores é o dos flavonoides (LIMA, 2007). A eles, bem como aos ácidos fenólicos, são atribuídas as propriedades antibacteriana, antiviral e antioxidante (VOLPI, BERGONZINI, 2006). Mais de 200 compostos foram identificados em diferentes amostras de própolis (MARCUCCI., 2001).

As própolis de áreas tropicais, especialmente as brasileiras, têm mostrado diferenças significantes nas suas composições químicas em relação à própolis da zona temperada. Por essa razão, a própolis brasileira têm se tornado objeto de grande interesse por parte dos cientistas (TRUSHEVA *et al.*, 2006). A própolis verde brasileira, produzida em Minas Gerais e São Paulo, possuem em sua composição química derivados prenilados do ácido *p*-cumárico e grande quantidade de flavonoides, muitos dos quais não estão presentes em própolis da Europa, América do Norte e Ásia (SIMÕES *et al.*, 2004).

3.5.1 Ação antioxidante da própolis

Os ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas das células podem ser oxidados por peroxidação enzimática ou auto-oxidativa, mediante reações que envolvam radicais livres. Um excesso desses radicais pode levar a reação em cadeia incontrolada e a peroxidação lipídica.

A peroxidação lipídica ocorre em três estágios: iniciação, propagação e terminação. No estágio de iniciação ocorre interação do ácido graxo insaturado com o oxigênio, formando um

radical lipídico. No estágio de propagação, o radical lipídico reage com oxigênio molecular, formando radical peroxila, que pode atacar outra molécula de lipídeo, formando mais radicais livres. No estágio de terminação, os radicais livres reagem com antioxidantes formando produtos inertes. A peroxidação lipídica pode ser suspensa por inativação enzimática dos radicais livres pelos antioxidantes que inibem o estágio de iniciação e/ou aceleram o estágio de terminação (COOK, SAMMAN, 1996).

Os flavonoides inibem a peroxidação lipídica *in vitro* no estágio de iniciação, por atuarem como antioxidantes, eliminando ânion superóxido e radicais hidroxilas. Propõe-se que flavonoides interrompam a reação em cadeia dos radicais livres, doando átomos de hidrogênio ao radical peroxila, formando um radical de flavonoide. O radical flavonoide, então, reage com o radical livre, terminando, assim, a propagação da reação em cadeia (COOK, SAMMAN, 1996).

3.6 Modelo Animal

Grandes dificuldades impedem o estudo dos mecanismos patogênicos da aterosclerose em humanos, por isso torna-se fundamental a presença de um modelo experimental bem caracterizado para tal patologia. Os camundongos selvagens são altamente resistentes ao desenvolvimento de aterosclerose pela grande concentração de HDLc (BRESLOW, 1996; JAWIEN *et al.*, 2004). A HDLc 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).

Segundo Smithies e Maeda (1995), os camundongos naturalmente apresentam níveis de HDL elevados enquanto que níveis de LDL são baixos em relação aos níveis encontrados em humanos, sendo que tais condições exercem um papel protetor fundamental contra a aterosclerose. Este modelo animal apresenta a ausência da lipoproteína A, uma lipoproteína pró-aterogênica presente em humanos. Embora existam diferenças no transporte e no metabolismo de lipídios entre camundongos e humanos, alterações em partes específicas das vias tornam as duas espécies similares.

Nas décadas de 60 e 70, foram elaboradas algumas dietas capazes de induzir uma hiperlipidemia leve em camundongos (VESSELINOVITCH, WISSILER, 1968). Uma vez alimentadas por vários meses com tais dietas, certas cepas desenvolveram lesões com estrias de gordura na aorta proximal (ROBERTS, THOMPSON, 1976). Na década de 1980, vários pesquisadores caracterizaram as lipoproteínas e demonstraram as diferenças nos níveis destas

associadas às diferentes cepas de camundongos (LEBOEUF *et al.*, 1983; LUSIS *et al.*, 1983). Paigen *et al.* (1987) desenvolveram um método que permitiu quantificar lesões ateroscleróticas em camundongos.

Na década de 1990, com a engenharia genética, desenvolveram-se modelos de camundongos transgênicos que desenvolvem lesões avançadas em contraste com as discretas lesões observadas em camundongos selvagens alimentados com dietas aterogênicas (BRESLOW, 1996). Apesar das diferenças, estes animais possuem, com poucas exceções, o mesmo conjunto de genes que controlam o metabolismo de lipoproteínas em seres humanos, e diante de facilidades, como rápida reprodução, conhecimento amplo da sua genética, formação relativamente rápida das lesões ateroscleróticas e o seu pequeno tamanho, os camundongos emergiram, ao longo das décadas, como os melhores modelos experimentais para o estudo da aterosclerose (VANDERLAAN *et al.*, 2004; HOFKER *et al.*, 1998).

Há concordância de que camundongos “knockout” para Apo E (apolipoproteína E) ou para o receptor de LDL (LDL r^{-/-}) podem desenvolver lesões aterogênicas que compartilham aspectos semelhantes às lesões humanas avançadas (ROSENFELD *et al.*, 2000; CALARA *et al.*, 2001; JOHNSON, JACKSON, 2001; SONG, LEUNG, SCHINDLER, 2001; FERNANDES *et al.*, 2006).

A deficiência dos receptores para a LDL em humanos leva à hipercolesterolemia familiar homozigótica, onde os níveis de LDL no plasma se aproximam de 1000 mg/dL, podendo causar um quadro de infarto agudo do miocárdio durante a segunda década de vida (FAZIO, LINTON, 2001). Já em camundongos a deficiência para o receptor de LDLr^{-/-}, provoca apenas uma modesta hipercolesterolemia de aproximadamente 250 mg/dL, com aumento dos níveis séricos das lipoproteínas aterogênicas LDL e IDL, não ocorrendo o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas quando alimentados com dieta comercial (DAUGHERTY, 2002). 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).

Camundongos machos e fêmeas LDLr^{-/-} são férteis, possuem os níveis de colesterol total no plasma 35 vezes maior que nos animais selvagens (WT), apresentam um aumento de 7 a 8 vezes na quantidade de IDL sem apresentar mudanças significativas no HDL, e os níveis de triacilgliceróis são normais (ISHIBASHI *et al.*, 1994).

Estudos recentes mostram que camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica por 15 dias desenvolvem a aterosclerose, aumento de 4,7 e 1,2 vezes na concentração plasmática de colesterol e triglicérides, respectivamente, em relação aos

camundongos LDLr^{-/-} com dieta padrão (KRIEGER *et al.*, 2006). Garcia *et al.* (2008) confirmam que estes camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica por 15 dias, apresentaram aumento de 30% no diâmetro dos cardiomiócitos quando comparados aos camundongos alimentados com dieta padrão, além do aumento do colágeno intersticial e perivascular, fato importante que indica presença de hipertrofia cardíaca nestes camundongos.

Garcia *et al.* (2011) mostraram que os camundongos LDLr^{-/-} desenvolveram hiperlipidemia espontânea moderada, apresentando níveis séricos da HDL elevados, o que os tornam mais resistentes ao desenvolvimento de lesões ateroscleróticas e estresse oxidativo, comparados aos camundongos Wide Type.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cuidados Éticos

Os procedimentos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, nº do parecer: 04A/2011.

4.2 Local

O trabalho experimental foi realizado na Universidade José do Rosário Vellano, em Alfenas - MG, no biotério da Pós-graduação da Unifenas.

4.3 Protocolo experimental

Os experimentos foram realizados em camundongos homocigotos para a ausência do gene do receptor de LDL (LDLr^{-/-}) gerados no “background” C57BL6, machos com 3 meses de idade, pesando 23 ± 3 g. Os animais foram obtidos do Jackson Laboratories (EUA) e criados no biotério da pós-graduação da UNIFENAS com controle de temperatura e controle de 12 horas no ciclo claro/escuro.

Os camundongos permaneceram em ambientes climatizados em 20°C, por 75 dias e controle de 12 horas no ciclo claro/escuro. As gaiolas tinham piso com maravalha e eram trocadas sempre que necessário evitando o excesso de umidade e mau cheiro. Estes animais ficaram em jejum por 12 horas e foram pesados em balança de precisão. Após a pesagem os camundongos foram divididos aleatoriamente em grupos e receberam ração hiperlipídica e água à vontade iniciando o projeto.

Os camundongos foram divididos em quatro grupos experimentais sendo o grupo controle (HL, n° = 10), grupo HL NAT (n° = 10), grupo HL PRO (n° = 10), grupo HL PRO NAT (n° = 10).

Na primeira quinzena, os camundongos não realizaram nenhuma atividade e foram induzidos à hipercolesterolemia pela ingestão da ração hiperlipídica (KRIEGER *et al.*, 2006).

No grupo controle, denominado HL, os animais receberam ração hiperlipídica com 20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5% ácido cólico por 75 dias e foram submetidos ao estresse aquático (protocolo adaptado de EVANGELISTA *et al.*, 2003). No grupo denominado HL NAT, os animais receberam ração hiperlipídica com 20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5% ácido cólico por 75 dias e foram submetidos ao protocolo de

natação 5 dias por semana, 1 hora por dia, durante 60 dias (protocolo adaptado de EVANGELISTA *et al.*, 2003). No grupo denominado HL PRO, os animais receberam ração hiperlipídica com 20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5% ácido cólico por 75 dias. Foi administrado via oral 70 µL de extrato alcoólico de própolis a 85,7%/animal/dia, durante 60 dias e foram submetidos ao estresse aquático (protocolo adaptado de EVANGELISTA *et al.*, 2003). No grupo denominado HL NAT PRO, os animais receberam ração hiperlipídica com 20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5% ácido cólico por 75 dias e foram administrados via oral 70 µL de extrato alcoólico de própolis a 85,7%/animal/dia, durante 60 dias e foram submetidos ao protocolo de natação 5 dias por semana, 1 hora por dia, durante 60 dias (protocolo adaptado de EVANGELISTA *et al.*, 2003).

Os camundongos dos grupos que tiveram o estresse aquático (manejo, temperatura da água, umidade) foram submetidos à natação por 5 minutos, seguindo os dias e sessões progressivas dos grupos que foram submetidos ao treinamento da natação.

A própolis foi administrada por via oral, utilizando-se uma micropipeta volumétrica monocanal de volume variável de 10 a 100 µL e cada animal dos grupos HL PRO e HL NAT PRO recebeu a dose 70 µL. A administração da própolis aconteceu diariamente durante 60 dias, sempre às 8 horas, e iniciaram após 15 dias do início do experimento.

A natação foi realizada em piscina individual, com 30 cm de profundidade e 15 x 15 cm de largura, água potável trocada a cada sessão, com temperatura de 32 a 36°C. As sessões de treinamento de natação aconteceram sempre às 12 horas e iniciaram após 15 dias do início do experimento. A frequência e o tempo de execução da natação foram progressivos:

- 1ª semana de treinamento (16º ao 22º dia): foram realizadas 3 sessões semanais de 30 minutos por sessão, em dias alternados: segunda-feira, quarta-feira e sexta-feira.
- 2ª semana de treinamento (23º ao 29º dia): foram realizadas 4 sessões semanais de 45 minutos por sessão, em dias alternados: segunda-feira, terça-feira, quinta-feira e sexta-feira.
- 3ª semana em diante (30º ao 75º dia): foram realizadas 5 sessões semanais, de 60 minutos por sessão nos dias: segunda-feira, terça-feira, quarta-feira, quinta-feira e sexta-feira, com descanso no sábado e domingo até o final do experimento.

4.4 Amostras para análises

Após 75 dias de experimento, os camundongos permaneceram por jejum de 12 horas e, em seguida, foram pesados e anestesiados por via intraperitoneal (IP), utilizando-se Xilazina/ Ketamina (Bayer AS* e Parke-Davis*) nas concentrações de 6 e 40 mg/Kg,

respectivamente. O sangue foi colhido por punção do plexo venoso retro-orbital, utilizando capilares heparinizados, e o soro foi obtido para análises bioquímicas de triglicérides, colesterol total e suas frações HDL, LDL e VLDL.

Em seguida à toracotomia, o coração e a artéria aorta foram removidos. O coração de cada animal foi pesado em balança de precisão, modelo HR 202 e o coração foi dissecado, retirando-se os átrios e o ventrículo direito, isolando-se o ventrículo esquerdo. Este foi novamente pesado e colocado junto com a aorta, sendo ambos fixados em formalina a 10%. Em seguida foram incluídos em parafina para cortes histológicos de quatro micrômetros de espessura, segundo Junqueira *et al.* (1979).

4.5 Análises das amostras de sangue

O soro sanguíneo foi enviado ao Laboratório Louis Pasteur de análises clínicas, situado em Alfenas, Minas Gerais, para as seguintes análises: colesterol total (CT) e suas frações: os lipídeos séricos (triglicérides, colesterol total e HDLc) foram mensurados por métodos enzimáticos colorimétricos, utilizando-se protocolos descritos nos “kits” comerciais (In Vitro®) por automação (HEDRICK *et al.*, 2001). O VLDLc foi calculado pela divisão dos níveis plasmáticos de triglicérides por 5 (TIAN *et al.*, 2006). O LDLc foi determinado pela fórmula: $LDLc = \text{Colesterol total} - (\text{HDLc} + \text{VLDLc})$ (FRIEDEWALD, LEVY, FREDRICKSON, 1972). Foram empregados sistemas colorimétricos e enzimáticos, cujos procedimentos técnicos utilizados seguiram os protocolos descritos nos “kits” comerciais.

4.5.1 Análises séricas das triglicérides

A triglicerolemia foi determinada pelo método enzimático colorimétrico que utiliza quatro enzimas, conforme o “kit” triacilgliceróis GPO-ANA da Labtest. O glicerol liberado pela hidrólise do triacilglicerol contido no soro, catalisada pela lipase da lipoproteína, é convertido pela ação da glicerolquinase em glicerol-3-fosfato, que é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença de glicerolfosfato oxidase. A reação de acoplamento entre o peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e ESPAS é catalisada pela peroxidase, produzindo a quinoneimina, que tem máximo de absorbância em 540nm (TRINDER, 1969). O Kit é composto de: solução tampão 50mmol/L, pH 6,5; acetado de Mg 5mmol/L, ESPAS 1 mmol/L, 4-aminoantipirina 0,7 mmol/L, ATP 0,3 mmol/L, glicerolquinase $\geq 800U/L$, glicerolfosfato $\geq 2500U/L$, lipase da lipoproteína $\geq 100KU/L$, peroxidase $\geq 350U/L$, azida sódica 1,54mmol/L. As amostras foram preparadas de acordo

com as instruções do fabricante, e, após a leitura da absorvância em 540nm, a concentração de triglicérides foi calculada em mg/dL.

4.5.2 Análise sérica do colesterol total

A colesterolemia foi determinada pelo método enzimático, conforme kit colesterol Liquiform da Labtest, utilizando-se associação da reação de oxidação catalisada pelo colesterol oxidase, após hidrólise dos ésteres de colesterol, com leitura de absorvância em 500 nm (TRINDER, 1969). O “Kit” de dosagem é composto: tampão 50 mmol/L contendo 0,01g/dL, pH 7.0, colesterol esterase (>150U/L), colesterol oxidase (>175U/L), peroxidase (>1000U/L), 4-aminoantipirina 0,5nmol/L, fenol 2,4mmol/L, solução padrão 200mg/dL, preservativos e conservantes. As amostras foram preparadas de acordo com as instruções do fabricante do “kit”, e, após a leitura da absorvância em 500 nm, foi calculada a concentração de colesterol em mg/dL.

4.5.3 Análises séricas do HDL

Foi utilizado o sistema enzimático do “kit” colesterol HDL da Labtest para precipitação das lipoproteínas de baixa e de alta densidade (LDL e VLDL) e determinação do colesterol HDL no sobrenadante após centrifugação (WARNICK, NAUCK, RIFAI, 2001). O kit contém: precipitante com ácido fosfotúngstico 1,5nmol/L e cloreto de magnésio 54 mmol/L, solução padrão 20mg/dL de HDL e reagente de cor - colesterol Liquiform Labtest. Após a medida da absorvância das amostras em 500nm, foi calculada a concentração de colesterol HDL em mg/dL.

4.5.4 Análises séricas do VLDL e LDL

Os valores das concentrações do colesterol VLDL foram obtidos pela divisão dos valores de triglicérides por 5 e os valores do colesterol LDL pela subtração de colesterol HDL e VLDL do colesterol total, de acordo com Friedewald, Levy e Fredrickson (1972).

4.5.5 Procedimento histológico e imunoistoquímico

Logo após a remoção, o coração foi dissecado e o ventrículo esquerdo foi isolado, pesado e calculou-se a proporção do peso ventricular esquerdo (mg) pelo peso do animal (g). Estes foram incluídos em parafina para cortes histológicos de quatro micrômetros de espessura, segundo Junqueira *et al.* (1979). Na avaliação imunoistoquímica, os cortes

histológicos da aorta e do ventrículo esquerdo foram tratados com peróxido de hidrogênio a 3% para bloquear a atividade da peroxidase endógena. Foi feito o bloqueio dos sítios inespecíficos com leite desnatado 2% diluído em PBS (*phosphate-buffered saline*) 10 Mm pH 7,4. As lâminas foram incubadas por 12 horas com anticorpo policlonal produzido em coelho anti-CD40L (Santa Cruz[®] 1:50) em câmara úmida. Após a incubação com o anticorpo primário, foi feita a incubação com anticorpo secundário biotinizado (kit Dako[®] LSAB+), durante uma hora a 37 °C. Para evidenciar as áreas imunorreativas, os cortes foram incubados com o complexo conjugado com peroxidase (Dako[®] LSAB+), durante 45 minutos a 37 °C e colocados em solução de cromógeno (50 mg de DAB em 50 ml de PBS com 3 ml de água oxigenada 10%) por três minutos.

Após contracoloração com hematoxilina de Harris (Sigma[®]) por 25 segundos, as lâminas foram montadas e analisadas em microscópio óptico. As fotomicrografias foram analisadas pelo software LGMC-image versão 1.0 e as porcentagens fracionais da área imunorreativa para o CD40L do miocárdio foram adquiridas (ARMSTRONG *et al.*, 1998).

4.5.6 Análise das alterações morfológicas e morfometria

Para análises das alterações morfológicas e morfométricas, os cortes histológicos da aorta e do ventrículo esquerdo foram corados com hematoxilina/eosina e *picrosírius* red para análise qualitativa do colágeno na parede ventricular esquerda. Foram obtidas quatro fotomicrografias, a partir de um mesmo ponto pré-fixado dos cortes transversais das aortas de cada animal, utilizando-se a câmara digital acoplada ao programa Leica IM50 (versão 1.20). Os cortes corados com *picrosírius* red foram analisados com luz não polarizada. Cada fotomicrografia foi analisada e áreas marcadas em vermelho pelo *picrosírius* red foram analisadas qualitativamente. Todas as análises histológicas foram executadas por um único examinador, utilizando o método duplo cego.

4.6 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm Erro Padrão da Média (EPM). A análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey foi utilizada para comparar as médias entre diferentes grupos. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de $p < 0,05$ (software GraphPad InStat).

5 RESULTADOS

Na Tabela 1 estão apresentados os dados relacionados ao perfil lipídico e não foram observadas diferenças significativas dos níveis colesterol total (CT) e da fração LDLc nos animais dos 4 grupos experimentais. Entretanto, observou-se um aumento dos níveis séricos do HDLc nos camundongos dos grupos HL NAT, HL PRO e HL NAT PRO quando comparados com os do grupo HL. Contudo, os camundongos do grupo HL PRO apresentaram maiores níveis séricos desta fração em relação aos camundongos do grupo HL NAT PRO. Os camundongos deste último grupo apresentaram níveis séricos de HDLc maior que os camundongos do grupo HL NAT. Com relação aos níveis séricos da fração VLDLc e TG observou-se diminuição nos camundongos dos grupos HL NAT e HL PRO em relação aos dos grupos HL e HL NAT PRO. Porém, as relações CT/HDL, LDL/HDL e TG/HDL foram menores no grupo HL PRO e HL NAT PRO quando comparados ao grupo HL.

TABELA 1 - Níveis séricos de colesterol total (CT) e suas frações HDLc, LDLc e VLDLc, triglicerídeos (TG) e as relações CT/HDL, LDL/HDL, TG/HDL entre camundongos HL (hiperlipidêmicos), HL NAT (hiperlipidêmicos submetidos à natação), HL PRO (hiperlipidêmicos tratados com própolis) e HL NAT PRO (hiperlipidêmicos submetidos à natação e tratados com própolis).

Parâmetros	Grupo HL	Grupo HL NAT	Grupo HL PRO	Grupo HL NAT PRO
N	10	10	10	10
Colesterol total (mg/dL)	869±15 ^a	868±23 ^a	882±25 ^a	918±11 ^a
HDLc (mg/dL)	20±1 ^d	36±6 ^c	75±5 ^a	57±7 ^b
LDLc (mg/dL)	814±29 ^a	793±21 ^a	763±64 ^a	840±20 ^a
VLDLc (mg/dL)	54±4 ^a	34±2 ^b	31±2 ^b	46±5 ^a
TG (mg/dL)	271±22 ^a	169±11 ^b	156±11 ^b	244 ±27 ^a
CT/HDLc	44±2 ^a	31±4 ^b	13±1 ^c	17±2 ^c
LDL/HDLc	38±2 ^a	31±4 ^a	11±1 ^b	16±2 ^b
TG/HDLc	14±2 ^a	5±1 ^b	2±0,2 ^b	4,5±0,5 ^b

Os dados foram expressos como média ± Erro Padrão da Média (EPM). Letras iguais, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). (ANOVA + Tukey test).

Na análise morfológica e morfométrica da aorta verificou-se que os animais do grupo HL apresentaram área de lesão aterosclerótica de estágio IV (Figura 4). A natação e a própolis isoladas ou associadas nos camundongos dos grupos HL NAT, HL PRO e HL NAT PRO,

respectivamente, preveniram o desenvolvimento da lesão aterosclerótica, impedindo o aumento da área de lesão quando comparados com os do grupo HL (Tabela 2 e Figura 4), com área de lesão aterosclerótica de estágio I e II. Isto foi seguido também da prevenção do processo inflamatório na aorta, em que a aorta dos camundongos dos grupos HL NAT e HL PRO apresentaram menor área imunorreativa para CD40L quando comparados com os do grupo HL (Tabela 2 e Figura 4). Os camundongos que foram submetidos à natação e tratados com própolis, grupo HL NAT PRO, apresentaram área de lesão semelhante ao dos grupos HL NAT e HL PRO, entretanto apresentaram menor área imunorreativa para CD 40L quando comparados com os grupos HL NAT e HL PRO (Tabela 2 e Figura 4).

TABELA 2 – Área de lesão aterosclerótica na aorta, porcentagem da área imunorreativa para CD40L na aorta e no miocárdio/endocárdio, da proporção peso ventricular (PV)/ peso animal (PA) e do diâmetro dos cardiomiócitos entre camundongos HL (hiperlipidêmicos), HL NAT (hiperlipidêmicos submetidos à natação), HL PRO (hiperlipidêmicos tratados com própolis) e HL+NAT+PRO (hiperlipidêmicos submetidos à natação e tratados com própolis).

Parâmetros	Grupo HL	Grupo HL NAT	Grupo HL PRO	Grupo HL NAT PRO
N	10	10	10	10
Área de lesão aterosclerótica (μm^2)	5552 \pm 1643 ^a	484 \pm 398 ^b	195 \pm 167 ^b	109 \pm 109 ^b
% de área imunorreativa para CD40L na aorta	7,3 \pm 0,4 ^a	4,3 \pm 0,8 ^b	3,3 \pm 0,2 ^b	1,8 \pm 0,4 ^c
% de área imunorreativa para CD40L no miocárdio/endocárdio	5,2 \pm 0,4 ^a	1,8 \pm 0,2 ^b	2,4 \pm 0,5 ^b	0,5 \pm 0,1 ^c
PV/PA	4,5 \pm 0,1 ^a	3 \pm 0,1 ^b	2,9 \pm 0,1 ^b	3,2 \pm 0,1 ^b
Diâmetro dos cardiomiócitos (μm)	25 \pm 0,6 ^a	23 \pm 0,7 ^{a,b}	20 \pm 0,8 ^b	21 \pm 1 ^b

Os dados foram expressos como média \pm Erro Padrão da Média (EPM). Letras iguais, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). (ANOVA + Tukey test).

Na análise morfológica e morfométrica do ventrículo esquerdo verificou-se que a natação e a própolis isoladas nos camundongos dos grupos HL NAT e HL PRO, respectivamente, preveniram o desenvolvimento da hipertrofia ventricular esquerda quando comparados com os do grupo HL (Tabela 2 e Figura 4), prevenindo o depósito de colágeno (Figura 4) sem alterar o diâmetro dos cardiomiócitos no grupo HL NAT (Tabela 2). Entretanto, os diâmetros dos cardiomiócitos dos ventrículos dos camundongos dos grupos HL

PRO e HL NAT PRO (Tabela 2) não tiveram aumento quando comparados entre si. O grupo NAT retardou em 8% o aumento do diâmetro do cardiomiócito, o grupo PRO retardou em 20% e o grupo NAT PRO retardou em 16% quando comparado com o grupo HL. Os camundongos dos grupos HL NAT e HL PRO apresentaram menor área imunorreativa para CD40L quando comparados com os do grupo HL, mostrando um efeito preventivo no processo inflamatório do miocárdio/endocárdio em condições isoladas. Contudo, quando em condições associadas no grupo HL NAT PRO este efeito foi mais exacerbado, apresentando menor área imunorreativa, nestes camundongos, quando comparados com os do grupo HL NAT e HL PRO (Tabela 2 e Figura 4).

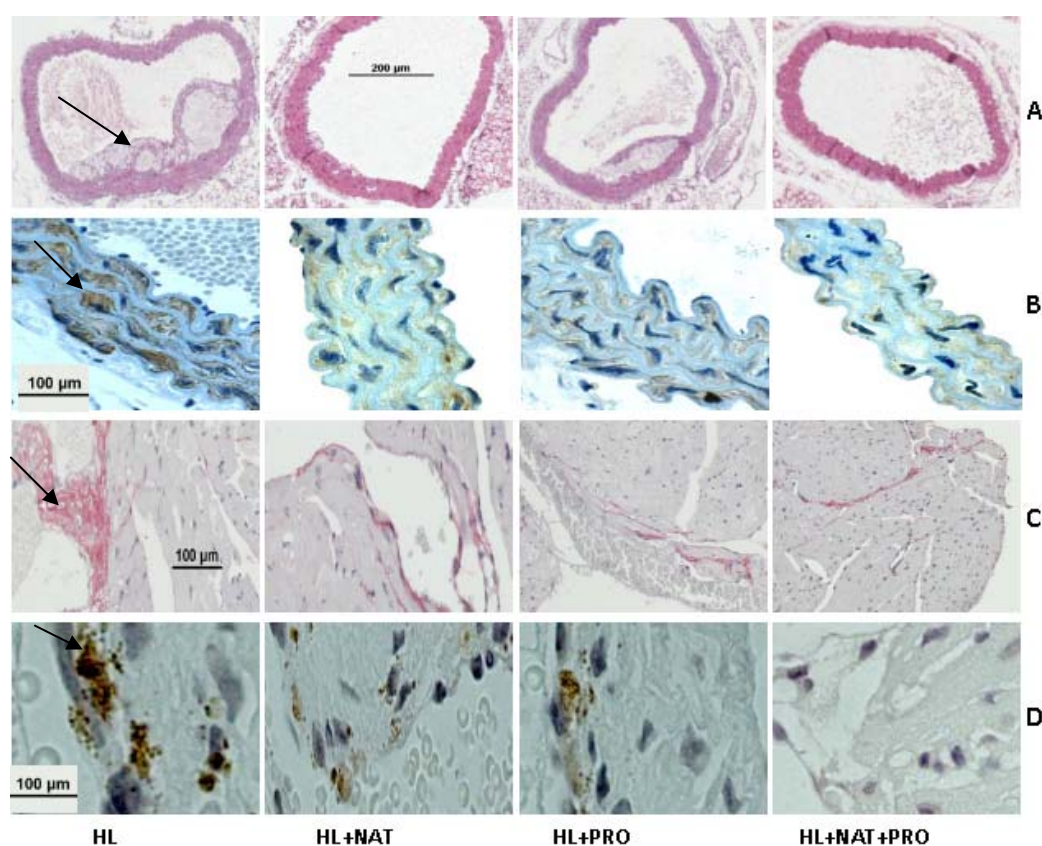


Figura 4- Fotomicrografias de cortes histológicos da aorta (painel A- corados com HE mostrando área de lesão aterosclerótica indicada pela seta); Fotomicrografias de cortes histológicos transversais da aorta (painel B- área imunorreativa para CD40L indicado pela seta e coloração marrom); Fotomicrografias de cortes histológicos do miocárdio/endocárdio (painel C- corados com *picrosirius* red mostrando depósito de colágeno intersticial conforme seta indicativa e cor vermelha); Fotomicrografias de cortes histológicos do miocárdio/endocárdio (painel D- área imunorreativa para CD40L em camundongos HL (hiperlipidêmicos), HL NAT (hiperlipidêmicos submetidos à natação), HL PRO (hiperlipidêmicos tratados com própolis) e HL NAT PRO (hiperlipidêmicos submetidos à natação e tratados com própolis conforme seta e coloração marrom).

6 DISCUSSÃO

No presente estudo observou-se que a própolis isoladamente e/ou associada à natação aumentou os níveis séricos de HDL, prevenindo o processo inflamatório cardiovascular, a hipertrofia ventricular esquerda (HVE) e o desenvolvimento da lesão aterosclerótica, diminuindo as relações CT/HDLc, LDL/HDLc e TG/HDLc nos camundongos LDLr/- alimentados com dieta hiperlipídica. Entretanto, a própolis isoladamente e/ou associada à natação não interferiu nos níveis séricos do CT e do LDLc. Contudo, a própolis isoladamente preveniu a hipetrigliceridemia e o aumento do VLDL. Além disso, induziu um aumento no nível sérico de HDL mais pronunciado do que quando associada à natação. A natação isoladamente no presente estudo foi benéfica no controle da dislipidemia, mas não na mesma proporção quando comparada com associação da própolis.

GARCIA *et al.* (2011) observaram que os camundongos LDLr/- alimentados com dieta padrão para roedores apresentaram aumento dos níveis séricos de HDL, quando comparados com seu “background” C57Bl6, o que preveniu o processo inflamatório e a resistência insulínica, e consequentemente apresentaram resistência ao desenvolvimento das lesões ateroscleróticas. No presente estudo, o camundongos LDLr/- alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram dislipidemia severa associada com pronunciada diminuição dos níveis séricos do HDL e, consequente, desenvolvimento de processo inflamatório cardiovascular, caracterizado pela marcada expressão do CD40L tanto no ventrículo esquerdo como na parede da aorta, formação de placa de ateroma e hipertrofia ventricular esquerda (HVE). A diminuição dos níveis séricos do HDL associados à hipercolesterolemia, à hipetrigliceridemia e ao processo inflamatório pode ser o denominador comum para aterogênese e hipertrofia ventricular esquerda (HVE) nos camundongos do grupo HL neste estudo. Além disso, camundongos LDLr/- alimentados com dietas hiperlipídicas apresentaram resistência insulínica (GARCIA *et al.*, 2011) e maior estresse oxidativo (KRIEGER *et al.*, 2006) os quais sustentam a aterogênese e a hipertrofia ventricular esquerda (HVE) neste estudo.

Com o surgimento da hipótese oxidativa para a aterosclerose (STEINBERG *et al.*, 1989; MEILHAC *et al.*, 2001), experimentos *in vitro*, em modelos animais e humanos, mostraram que os lipídeos oxidados exibem efeitos pró-aterogênicos (MEILHAC *et al.*, 2001). Nos eventos iniciais da aterogênese, a lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDLox) é rapidamente internalizada e acumulada nos macrófagos, formando assim, as

células espumosas, que se encontram e depositam no espaço subendotelial (LUSIS, 2000; 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 (NO) e desencadeando, assim, uma cascata de respostas inflamatórias (SMITH, 2001). De acordo com esta hipótese, o aumento na área de ateroma dos camundongos HL, no presente estudo, associada à dislipidemia severa, foi decorrente do processo inflamatório, determinado pelo aumento na expressão do CD40L, com conseqüente geração de espécie reativa de oxigênio (ERO) e menor biodisponibilidade do NO, que induziram um aumento da oxidação da LDL e a aterogênese.

O desequilíbrio entre a produção e a remoção de espécies reativas de oxigênio (ERO) é denominado estresse oxidativo. Várias situações fisiopatológicas e genéticas podem induzir o estresse oxidativo cardíaco, como hipercolesterolemia (SATO *et al.*, 2004), estresse mecânico no miocárdio (AIKAWA *et al.*, 2001) e processos inflamatórios (YAO *et al.*, 2006). Portanto, o marcado processo inflamatório cardíaco nos camundongos HL associado ao estresse oxidativo decorrente da maior expressão do CD40L no tecido cardíaco e conseqüente diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) sustentam a via da hipertrofia ventricular esquerda observada nos camundongos HL deste estudo, caracterizada pelo aumento do depósito de colágeno e dos diâmetros dos cardiomiócitos.

No presente estudo, a natação e a própolis separadas e/ou associadas preveniram a HVE, a aterogênese, a inflamação ventricular e arterial, diminuindo a expressão de CD40L e aumentando os níveis plasmáticos da HDLc.

Estudos mostraram que a atividade física regular promove a diminuição da inativação do óxido nítrico (FOGARTY *et al.*, 2004; TRAVERSE *et al.*, 2000), aumenta a produção de óxido nítrico (TAKAMURA *et al.*, 2002), aumenta a expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (GRIFFIN *et al.*, 2001) e promove angiogênese induzida pelo fator de crescimento endotelial vascular, além de ter como efeito final o aumento da biodisponibilidade do óxido nítrico. O aumento da biodisponibilidade do óxido nítrico em resposta à diminuição da expressão de CD40L no presente estudo pode ser o fator que preveniu a hipertrofia ventricular e a aterogênese nos camundongos do grupo HL NAT. Portanto, a HVE foi atenuada pelo efeito anti-inflamatório, decorrente do aumento sérico do HDLc, pela diminuição da superexpressão CD40L diminuindo a fibrose e desarranjos cardíacos e pela ação da atividade antioxidante e conseqüente diminuição do estresse oxidativo, o que resultou em efeitos anti-inflamatórios e retorno à homeostase. Além disso, a via NO/GMPc ativa os canais de K_{ATP} do sarcolema (BAKER *et al.*, 2001), com provável

inibição da 70-KDa S6 Kinase, atenuando a resposta hipertrófica em modelos hiperlipidêmicos (LEE *et al.*, 2004).

A prevenção da aterogênese pela natação no presente estudo foi decorrente do menor estresse oxidativo e maior biodisponibilidade do NO em resposta à elevação da concentração de HDL sérica e aumento do estresse de cisalhamento (shear stress) sobre a parede vascular provocada pelo aumento do débito cardíaco durante a natação nos animais do grupo HL NAT. A HDLc é uma lipoproteína que realiza o transporte reverso do colesterol, retirando o excesso de colesterol livre não só de membranas celulares como do próprio subendotélio e transportando até o fígado para ser degradado (SHILS *et al.*, 2005), além do seu efeito anti-inflamatório e antioxidante (DA SILVA *et al.*, 2006). O

efeito anti-inflamatório e antioxidante da HDLc no grupo HL NAT foi visualizado pela diminuição da área imunoreativa para o CD40L na aorta e no miocárdio/endocárdio destes animais.

Em nossos estudos a própolis isolada ou associada com a natação aumentou os níveis plasmáticos de HDL e diminuiu a expressão do CD40L tanto no miocárdio quanto na parede da aorta, prevenindo a HVE e a aterogênese. Estudos mostraram que a própolis é um antioxidante natural composto basicamente por flavonoides e compostos fenólicos, que diminui a concentração e a atividade do superóxido desmutase (SOD), reduzindo a peroxidação lipídica (MARCUCCI, 1995; ISLA *et al.*, 2001; KROL, 1990) no estágio de iniciação, por atuarem como antioxidantes eliminando ânion superóxido e radicais hidroxilas. Propõe-se que flavonoides interrompam a reação em cadeia dos radicais livres, doando átomos de hidrogênio ao radical peroxila, formando um radical de flavonoide. O radical flavonoide, então, reage com o radical livre terminando, assim, a propagação da reação em cadeia (BOUZIOTAS *et al.*, 2004). O aumento do HDL que é um antioxidante e um anti-inflamatório (HOLVOET, 2008) nos camundongos dos grupos HL+PRO e HL+PRO+NAT no presente estudo explica o efeito protetor da própolis no sistema cardiovascular, reduzindo o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica, prevenindo a aterogênese e a HVE nestes animais.

7 CONCLUSÃO

A própolis isolada ou associada com uma atividade física regular foi benéfica na proteção cardiovascular por ação anti-inflamatória, determinada pela menor área imunorreativa para CD40L, prevenindo a hipertrofia ventricular esquerda e a aterogênese desencadeada pela dislipidemia dos camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica.

REFERENCIAS

- AFFORD, S.C. et al. CD40 activation induces apoptosis in cultured human hepatocytes via induction of cell surface fas ligand expression and amplifies fas-mediated hepatocyte death during allograft rejection. **J Exp Med.** , v.189, p.441-446, 1999.
- AKAIWA, R. et al. Reactive oxygen species in mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.289, p. 901-907, 2001.
- ALVAREZ-LEITE, J.I.; OLIVEIRA, D.R.; PELUZIO, M.C.G. Dislipidemias. In: Neto, F. (Ed.). **Nutrição clínica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 196-211 p. 2003.
- AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. **Diretrizes do ACSM para o teste de esforço e sua prescrição.** 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.
- AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY. **Resource book for the design of animals exercise protocols.** 152 p. Feb, 2006.
- ANDRÉ, P. et al. Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease. **Circulation**, v. 106, p.896-899, 2002.
- ARMSTRONG, A.T.; BINKLEY, P.F.; BAKER, P.B. Quantitative investigation of cardiomyocyte hypertrophy and myocardial fibrosis over 6 years after cardiac transplantation. **J Am Coll Cardiol.** , v.32, p.704-710, 1998.
- ASHE, M.C.; KHAN, K.M. Exercise prescription. **J. Am. Acad. Orthop. Surg.**, v. 12, p. 21-27, 2004.
- AUBIN, M.C. et al. Role of probucol on endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries associated with left ventricular hypertrophy. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v. 47, n.5, p. 702-710, 2006.
- BAKER, J.E. et al. Nitric oxide activates the sarcolemmal K(ATP) channel in normoxic and chronically hypoxic hearts by a cyclic GMP-dependent mechanism. **J Mol Cell Cardiol.** v. 33, n.2, p. 331-341, 2001.
- BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in research on chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, 3-15, 2000.
- BANSKOTA, A.H. et al. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. **J Ethnopharmacol.** , v.80, p.67-73, 2002.
- BARAKAT, A.I.; LIEU, D.K. Differential responsiveness of vascular endothelial cells to different types of fluid mechanical shear stress. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 38,p. 323-344, 2003.
- BARAUNA, V. G.et al.. Effects of resistance training on ventricular function and hypertrophy in a rat model. **Clin Med Res.** , v.5, n.2, p. 114-120, 2007.

BARBIER, J. et al. Relationships between sports-specific characteristics of athlete's heart and maximal oxygen uptake. **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.**, v.1,p. 115-121, 2006.

BERLINER, J.A. et al. Atherosclerosis: basis mechanisms. **Circulation.** v. 91, p. 2488-2496, 1995.

BERNARDO, B. C. et al. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. **Pharmacol Ther.** v.128, n.1, p. 191-227, 2010.

BINDER, C.J. et al. Innate and acquired immunity in atherogenesis. **Nature Medic.**, v. 8, n. 11, p. 1218 – 1226, 2002.

BOUZIOTAS, C. et al. Greek adolescents, fitness, fat intake, activity, and coronary heart disease risk. **Arch Dis Child.**, v. 89, p. 41-44, 2004.

BRESLOW, J.L. Mouse models of atherosclerosis. **Science.** v. 272, p. 685-688, 1996.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food Chem Toxicol** , v.3, p.347-363, 1998.

BUSCH, N.A.; COOTE, J.H.; TOWNEND, J.N. Mortality, cardiac vagal control and physical training – what's the link? **Exp Physiol.**, v. 87, p.423-435, 2002.

CALARA, F.; SILVESTRE, M.; CASANADA, F. et al. Spontaneous plaque rupture and secondary thrombosis in apolipoprotein E-deficient and LDL receptor-deficient mice. **J Pathol.** , v.195, 257-263, 2001.

CARLET, R. et al. Síndrome metabólica: a importância da atividade física. **EF Y DEPORTS Revista Digital** - Buenos Aires. Ano II N° 102. Noviembre de 2006. <<http://www.efdeports.com/efd102/af.htm>>. Acesso em: 28/07/2010.

CARRENO, J. E. et al.. Cardiac hypertrophy: molecular and cellular events. **Rev Esp Cardiol.** , v.59, n.5, p. 473-486, 2006.

CARVALHO, T. et al. Posição oficial da Sociedade Brasileira de Medicina do Esporte: atividade física e saúde. **Rev Bras Med Esportiva**, v. 2, n. 4, p. 79–81, 1996.

CHAKRABARTI, S.; BLAIR, P.; FREEDMAN, J.E. CD40-40L signaling in vascular inflammation. **J Biol Chem.** , v.282, p.18307-18317, 2007.

CHAKRAVARTHY, M.V.; JOYNER, M.J.; BOOTH, F.W. An obligation for primary care physicians to prescribe physical activity to sedentary patients to reduce the risk of chronic health conditions. **Mayo Clin Proc**, v. 77,p.165-173, 2002.

CHANNON, K.M.; QIAN, H.; GEORGE, S.E. Nitric oxide in atherosclerosis and vascular injury. **Arterioscler Throm Vasc Biol.**, v. 20, p.1873-1881, 2000.

COLAN, S.D. Mechanics of left ventricular systolic and diastolic function in physiologic hypertrophy of the athlete's heart. **Cardiology Clinics.** v. 15, n. 3, p. 355-372, Aug.1997.

COOK, N.C.; SAMMAN, S. Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources – review. **The Journal of Nutrition Biochemistry**. v.7, p.66-76, 1996.

COUTINHO, M.S.S.; CUNHA, G.P. Exercício físico e lipídios séricos. **Arq. Bras. Cardiol**. V.52, n.6, p.319-322, 1989.

CRESSONI, E.S. et al. Proteção miocárdica ao coração hipertrofiado: o eterno desafio. **Rev. Bras. Cirurgia Cardiovascular**, São José do Rio Preto, v.23, n.1, Jan./Mar. 2008.

DA SILVA, J.F.M et al. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food Chem**, v. 99, p. 431-435, 2006.

DÂMASO, A. **Nutrição e Exercício na Prevenção de Doenças**. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

DAUGHERTY, A. Mouse models of atherosclerosis. **American Journal of the Medical Sciences**. v. 323, p.3-10, 2002.

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 , 48 p, 2001.Suplemento III.

DORN, G.W. 2nd. The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. **Hypertension**. v.49, n.5, p.962-970, 2007.

EVANGELISTA, F.S.; BRUM, P.C.; KRIEGER, J.E. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.**, v.36, n.12, p.1751-1759, 2003.

FAZIO, S.; LINTON, M.F. Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis. **Front. Biosci**. v. 6, p. D515-D525, 2001.

FERNANDES, L.R. et al. Efeito da goma guar parcialmente hidrolisada no metabolismo de lipídeos e na aterogênese de camundongos. **Rev. Nutr**, Campinas, v.19, n.5 , Sept./Oct. 2006.

FERNANDES, T.; SOCI, U.P.; OLIVEIRA, E.M. Eccentric and concentric cardiac hypertrophy induced by exercise training: microRNAs and molecular determinants. **Braz J Med Biol Res.**, v. 44, n.9, p. 836-847, 2011.

FLAXENBURG, J.A. et al. The CD40-induced signaling pathway in endothelial cells resulting in the overexpression of vascular endothelial growth factor involves Ras and phosphatidylinositol 3-kinase. **J Immunol.**, v. 172, p.7503-7509, 2004.

FOGARTY, J.A. et al. Exercise training enhanced vasodilation responses to vascular endothelial growth factor in porcine coronary arterioles exposed to chronic coronary occlusion. **Circulation**, v. 109, p.664-670, 2004.

FONSECA, F.A.H. et al. Hipertensão e Dislipidemias. **Rev Bras Hipertens.** , v.9, p. 268-272, 2002.

FERREIRA, C.; PÓVOA, R. **Cardiologia para o Clínico Geral.** São Paulo: Editora Atheneu, 1999. p.165-183.

FRIEDEWALD WT, LEVY RI, FREDRICKSON DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of preparatory ultracentrifugation. **Clin Chem.**, v. 18, p.499-502, 1972.

FRIMM, C.C. Disfunção sistólica e diastólica na hipertensão arterial sistêmica com hipertrofia ventricular esquerda. **Hiper-Ativo**, v. 3, p. 189-94, 1998.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Análise de Própolis. **Ciênc Tecnol Aliment.**, v. 26, p.171-178, 2006.

GANZ, P.; VITA, J.A. Testing vasomotor function. Nitric oxide, a multipotent molecule. **Circulation**, v. 108, p.2049-53, 2003.

GARCIA, J.A.D. et al. S-Nitroso-N-Acetylcysteine (SNAC) Prevents Myocardial Alterations in Hypercholesterolemic LDL Receptor Knockout Mice by Antiinflammatory Action. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 51, n. 1, jan. 2008.

GARCIA, J.A.D. et al. Efeito anti-inflamatório da lipoproteína de alta densidade no sistema cardiovascular de camundongos hiperlipidêmicos. **Rev Port. Cardiol.**, v.30, n.10,p.763-769, 2011.

GAWECO, A.S. et al. CD40L (CD154) expression in human liver allografts during chronic ductopenic rejection. **Live Transpl Surg.** , v.5, p.1-7, 1999.

GELBMANN, C.M. et al. Inducible CD40 expression mediates NFkappaB activation and cytokine secretion in human colonic fibroblasts. **Gut**, v. 52, n.10, p. 1448-1456, 2003.

GENEST, J. Lipoprotein disorders and cardiovascular risk. **J. Inherit. Metab. Dis.** n. 26, p. 267-287, 2003.

GIMBRONE JR, M.A. Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. **Am J Cardiol.**, v. 75, p.67B-70B, 1995.

GONZALES, M.A.; SELWYN, A.P. Endothelial function, inflammation, and prognosis in cardiovascular disease. **Am J Med.** , v.115, n.8A, p.99S-106S, 2003.

GRANDJEAN, P.W.; CROUSE, S.F.; ROHACK, J.J. Influence of cholesterol status on blood lipid and lipoprotein enzyme responses to aerobic exercise. **J Appl Physiol.**, v. 89, p. 472-480, 2000.

GREEN, D.J. et al. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. **J. Physiol.**, v. 561, p. 1-25, 2004.

GRIFFIN, K.L. et al. Endothelium-mediated relaxation of porcine collateral-dependent arterioles is improved by exercise training. **Circulation**, v. 104, 1393-1398, 2001.

GROSS, P.L.; AIRD, W.C. The endothelium and thrombosis. **Sem Thromb Hemost**, v.26, p.463-477, 2000.

GROSSMAN, W.; JONES, D.; MCLAURIN, L.P. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. **The Journal of Clinical Investigation**. v.56, n. 1, p.56-64, Jul. 1975.

HAYACIBARA, M.F. et al. In vitro and vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **J Ethnopharmacol.** , v.101, p. 110-115, 2005.

HEDRICK, C.C. et al. In vivo interactions of apoA-II, apoA-I, and hepatic lipase contributing to HDL structure and antiatherogenic functions. **J. Lipid Res.**, v. 42, p.563-570, 2001.

HENN, V. et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. **Nature**, v. 391, p.591-594, 1998.

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.

HOLVOET, P. Relations between metabolic syndrome, oxidative stress and inflammation and cardiovascular disease. **Verh K Acad Geneesk Belg.**, v. 70, p.193-219, 2008.

HOLLENBAUGH, D. et al. The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity. **Embo J.** , v.11, p.4313-4321, 1992.

HU, F. et al. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. **J Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 276-283, 2005.

HUNTER, J.J.; CHIEN, K.R. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. **N Engl J Med.** , v.341, p. 1276-1283, 1999.

HURLEY, BF. Effects of resistive training on lipoprotein-lipid profiles: a comparison to aerobic exercise training. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 21, p. 689-693, 1989.

IEMITSU, M. et al. Physiological and pathological cardiac hypertrophy induce different molecular phenotypes in the rat. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 281, n.6, p.R2029-R2036, 2001.

ISHIBASHI, S. et al. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. **J. Clin. Invest.**, v.93, p. 1885-1893, 1994.

ISLA, M.; NIEVA, M.M.; SAMPIETRO, A. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. **J Ethnopharmacol.**, v. 76, p.165-170, 2001.

- JAIN, M.K.; RIDKER, P.M. Anti-inflammatory effects of statins: clinical evidence and basic mechanisms. **Nat Rev Drug Discov.** , v.4, n.12, p.977–987, 2005.
- JAWIEN, J.; NASTALEK, P.; KORBUT, R. Mouse models of experimental atherosclerosis. **J.Physiol. And Pharmac.**, v. 55, n. 3, p. 503-517, 2004.
- JOHNSON, J.L.; JACKSON, C.L. Atherosclerotic plaque rupture in the apolipoprotein E knockout mouse. **Atherosclerosis**, v. 154, p.399-406, 2001.
- 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.
- JUNQUEIRA, L.C.; BIGNOLAS, G., BRENTANI, R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem J.**, v. 11, p.447-455, 1979.
- KAI, H. et al. Diastolic dysfunction in hypertensive hearts: roles of perivascular inflammation and reactive myocardial fibrosis. **Hypertens Res.**, v. 28, n.6, p. 483-490, 2005.
- KARMANN, K. et al. CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 92, p.4342-4346, 1995.
- KATZMARZYK, P.T. et al. 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.
- KEMPF, T.; WOLLERT, K.C. Nitric oxide and the enigma of cardiac hypertrophy. **Bioessays**, v. 6, p.608-615, 2004.
- KIENER, P.A.; MORAN-DAVIS, P.; RANKIN, B.M.; WAHL, A.F.; ARUFFO, A.; HOLLENBAUGH, D. Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes. **J Exp Med.**v.155, p.4917-4925, 1995.
- KNOWLES, J.W.; MAEDA, N. Genetic modifiers of atherosclerosis in mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v.20, p. 2336-2345, 2000.
- KORNBLUTH, R.S.; KEE, K.; RICHMAN, D.D. CD40 ligand (CD154) stimulation of macrophages to produce HIV-1-suppressive beta-chemokines. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 95, p.5205-5210, 1998.
- KRIEGER, M.H.; et al. Anti-oxidant property of ethanolic extract of propolis (EEP) as evaluated by inhibiting the chemiluminescence oxidation of luminol. **Int Biochem.** v.21, n.4, p.593–597, 1990.
- LANG, D. et al. Coronary microvascular endothelial cell redox state in left ventricular hypertrophy: the role of angiotensin II. **Circ Res.**, v. 86, p. 463-469, 2000.
- LAUFS, U. et al. Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v. 25, n. 4, p. 809-814, 2005.

LAURINDO, F.R. Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. **Nitric Oxide**, v.14, p.12-20, 2006.

LAUSCHKE, J.; MAISCH, B. Athlete's heart or hypertrophic cardiomyopathy. **Clin Res Cardiol**. v.98, n.2, p. 80-88, 2009.

LEBOEUF, R.C. et al. Genetic control of lipid transport in mice. I: structural properties and polymorphism of plasma lipoproteins. **J Biol Chem**, v. 258, p.5063-5070, 1983.

LEE, T.M. et al. Effect of pravastatin on left ventricular mass by activation of myocardial KATP channels in hypercholesterolemic rabbits. **Atherosclerosis**, v. 176, p.273-278, 2004.

LIBBY, P. Atherosclerosis: the new view. **Scient. Americ**. v. 5, n. 286, p. 46-55, 2002.

LIBBY, P.; RIDKER, P.M.; MASERI, A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**, v.105, p.1135-1143, 2002.

LIMA, R.O.A. Mecanismos de ação da própolis na modulação de danos quimicamente induzidos no DNA. 2007. 67 f. Doctoral Thesis- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, São Paulo, 2007.

LORELL, B.H.; CARABELLO, B.A. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection and prognosis. **Circulation**, v. 102, p. 470-479, 2000.

LUSIS, A.J. Atherosclerosis. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 233-241, 2000.

LUSIS, A.J. et al. Genetic control of lipid transport in mice. II: genes controlling structure of high density lipoproteins. **J Biol Chem**., v. 258, p.5071-5078, 1983.

LUSIS, A.J.; MAR, R.; PAJUKANTA, P. Genetics of atherosclerosis. **Annu Rev Genomics Hum Genet.**, v. 5, p.189-218, 2004.

LUTGENS, E.; DAEMEN, M.J. CD40-CD40L interactions in atherosclerosis. **Trends Cardiovasc Med.**, v. 12, 27-33,2002.

MACH, F.; lymphocytes induce endothelial cell matrix metalloproteinase expression by a CD40L-dependent mechanism: implications for tubule formation. **Am J Pathol.**, v. 154, p.229-238, 1999.

MACH, F. et al. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signaling. **Nature**, v. 394, p.200-203, 1998.

MACH, F. et al. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. **Proc Natl Acad Sci.** , v.94, p.1931-1936, 1997.

MARCUCCI, M.C. et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **J Ethnopharmacol.**, v. 74, p.105–712, 2001.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, p.83–99, 1995.

MARSH, S.A.; COOMBES, J.S. Exercise and the endothelial cell. Intern. **J. cardiology**, v. 99, p.165-169, 2005.

MATHEWS, D. K.; FOX, E. L. **The physiological basis of physical education and athletics**. London, 1976.

MATSUDA, A.H.; MACHADO, L.B.; MASTRO, N.L. Thermal analysis applied to irradiated propolis. **Radiat Phys Chem.** , v. 63, p. 353-355, 2002.

MCMAHON, S.; JENKINS, D. Factors affecting the rate of phosphocreatine resynthesis following intense exercise. **Sports Medic.** , v. 32, n. 12, 2002.

MCMULLEN, J.R.; JENNINGS, G.L. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v. 34, n.4, p.255-262, 2007.

MEDEIROS, A. et al. Efeitos do treinamento físico com natação sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos. **Revista Paulista de Educação Física**, v. 14, p. 7-15, 2000.

MEILHAC, O. et al. 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.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 72, n. 3 , jul./set. 2005.

MICHEL, T.; VANHOUTTE, P.M. Cellular signaling and NO production. **Pflugers Arch.** , 14322013, 2010.

MILANEZ, M.C. **Efeitos do uso de captopril sobre o conteúdo de colágeno cardíaco e em parâmetros ponderais e hemodinâmicos após infarto do miocárdio em ratos**. 1995.128f. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, 1995.

MILL, J.G.; VASSALLO, D.V. Hipertrofia cardíaca. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.8, n.1, jan/mar. 2001.

MOYNA, N.M.; THOMPSON, P.D. The effect of physical activity on endothelial function in man. **Acta Physiol Scand.** , v.180, p.113-123, 2004.

NAVAB, M. et al. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. **J Lipid Res.**, v. 45, p.993-1007, 2004.

NUTTER, P.; PRIEST, R.; FULLER, E. Endurance training in the rat. Myocardial mechanics and biochemistry. **J. Appl. Physiol.**, n.4, p.934-940, 1981.

NEUZIL, J. et al. 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.

O'TOOLE, M. L. et al. Cardiovascular responses to prolonged cycling and running. **Annals Sports Medicine**, v. 3, p.124-130, 1987.

OLIVEIRA, E. M.; KRIEGER, J. E. Hipertrofia cardíaca e treinamento físico: Aspectos moleculares. **Hipertensão**, v.5, p. 73-78, 2002.

OLIVEIRA, E. M. et al. Local renin-angiotensin system regulates left ventricular hypertrophy induced by swimming training independent of circulating renin: a pharmacological study. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.**, v. 10, n.1, p. 15-23, 2009.

OZKUL, Y.; SILICI, S. ERÖGLU, E. The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. **Phytomedicine**, v. 12, p. 742-747, 2004.

PAIGEN, B. et al. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. **Atherosclerosis**, v. 68, p. 231-240, 1987.

PARK, Y.K. et al. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 2, p. 997-1003, 2002.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; NETO, F. R. A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Quím. Nova** , São Paulo, v. 25, n. 2 , Abr./May 2002.

PETKOWICZ, R.O. Coração de atleta e morte súbita. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul** , v. XIII , n. 01, Jan/Fev/Mar/Abr. 2004.

PLUIM, B.M. et al. The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. **Circulation**, v.101, n.3, p.336-344, 2000.

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.

REUL, R.M. et al. CD40 and CD40 ligand (CD154) are coexpressed on microvessels in vivo in human cardiac allograft rejection. **Transplantation**, v. 64, p.1765-1774, 1997.

ROBERTS, A.; THOMPSON, J.S. Inbred mice and their hybrids as an animal model for atherosclerosis research. **Adv Exp Med Biol.**, v. 67, p.313-327, 1976.

ROCHA, L. et al. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 13, p. 71-74, 2003.

ROSENFELD, M.E. et al. Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the apoE knockout mouse. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 20, p.2587-2592, 2000.

ROSS, R.; GLOMSET, J.A. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell. **Science.** v. 180, n. 93, p.1332-1339, 1973.

ROZMAN, C. **Compêndio de MEDICINA INTERNA** São Paulo: Editora Manole, 1999. 911 p.

RUNGE, M.S.; OHMAN E.M. **Cardiologia de Netter** Porto Alegre: Artmed, 2006. 688 p.

SANTOS, J.E.; GUIMARÃES, A.C.; DIAMENT, J. Consenso Brasileiro sobre dislipidemias, detecção, avaliação e tratamento, **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v. 43, n. 4, Aug. 1999.

SARAIVA, J.F.K. Doença cardíaca hipertensiva: da hipertrofia à insuficiência cardíaca. **HiperAtivo**, v. 2, p. 102-114, 1997.

SATO, K. et al. Hypercholesterolemia impairs transduction of vasodilator signals derived from ischemic myocardium: myocardium-microvessel cross-talk. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 24, n.11, p.2034-2039, 2004.

SCARTEZINI, M. et al. Metabolismo de lípidos e lipoproteínas. In: MARTINEZ, T.L.R. (Ed.). *Conduitas clínicas nas dislipidemias*. Belo Horizonte: **Health**, p.25-40, 1997.

SCHAPER, J. Effect of multiple ischemic events on human myocardium: an ultrastructural study. **Eur Heart J.**, v. 9, p. 141-149, 1998.

SHAPIRO, L.M. The morphologic consequences of systemic training. **Cardiology Clinics**. v.15, n. 3, p. 373-379, Aug. 1997.

SHEPHARD, R.J.; BALADY, G.J. Exercise as cardiovascular therapy. **Circulation**, v. 99, p.963-972, 1999.

SHILS, M.E.; SHIKE, M.; OLSON, J.A. *Modern Nutrition In Health and Disease*. 10 ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

SIQUEIRA, A.F.A.; ABDALLA, D.S.P.; FERREIRA, S.R.G. LDL: da síndrome metabólica a instabilização da placa aterosclerótica. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, São Paulo, v.50, n. 2, Apr. 2006.

SIMÕES, L.M.C. et al. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **J Ethnopharmacol.**, v. 94, p. 59-65, 2004.

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 atherogenesis. **Exerc. and Sports Sci. Rev.**, v. 29, n. 2, p. 49-53, 2001.

SMITHIES, O.; MAEDA, N. Gene targeting approaches to complex genetic diseases: atherosclerosis and essential hypertension. **Proc Natl Acad Sci.**, v.92, p.5266-5272, 1995.

SONG, L.; LEUNG, C.; SCHINDLER, C. Lymphocytes are important in early atherosclerosis. **J Clin Invest.**, v.108, p.251-259, 2001.

SOUZA, H. C. D. et al. Nitric Oxide Synthesis Blockade Increases Hypertrophy and Cardiac Fibrosis in Rats Submitted to Aerobic Training. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 89, n. 2, p. 99-104, 2007.

STEDING, K. et al. Relation between cardiac dimensions and peak oxygen uptake. **J Cardiovasc Magn Reson.** , v.12, p.8, 2010.

TAKAMURA, M.; PARENT, R.; LAVALLÉE, M. Enhanced contribution of NO to exercise-induced coronary responses after α -adrenergic receptor blockade. **Am J Physiol.**, v. 282, p.H508-H515, 2002.

THIENEL, U.; LOIKE, J.; YELLIN, M.J. CD154 (CD40L) induces human endothelial cell chemokine production and migration of leukocyte subsets. **Cell Immunol.**, v. 198, p.87-95, 1999.

THOMPSON, P.D. et al. Exercise and physical activity in the prevention and exercise treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 23, p. e42 - e49, 2003.

TIAN, J. et al. Hyperlipidemia is a major determinant of neointimal formation in LDL receptor-deficient mice. **Biochem Biophys Res Commun.** , v.345, p.1004-1009, 2006.

TRAVERSE, J.H. et al. Coronary nitric oxide production in response to exercise and endothelium-dependent agonists. **Circulation** , v.101, p.2526-2531, 2000.

TRINDER, R. Determination of glucose in blood using glucose with alternative oxygen acceptor. **Ann Clin Biochem**, v.6 , n.27, 1969.

TRUSHEVA, B. et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evid Based Complement Alternat Med.** , v.3, n.2, p. 249-254, 2006.

TSAO, P.S. et al. Enhanced endothelial adhesiveness in hypercholesterolemia is attenuated by L-arginine. **Circulation**, v. 89, n.5, p.2176-2182, 1994.

URHAUSEN, A.; KINDERMANN, W. Sports-specific adaptations and differentiation of the athlete's heart. **Sports Med.** , v.28, n.4, p.237-244, 1999.

VANHOUTTE, P.M. et al. Endothelial dysfunction and vascular disease. **Acta Physiol.** v.196, p.193-222, 2009.

VANDERLAAN, A.P.; REARDON, A.C.; GETZ, S.G. Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v.24, p.12-22, 2004.

VASANKARI, T.J. et al. Reduced oxidized LDL levels after a 10-month exercise program. **Med Sci Sports Exerc.** , v.30, p. 1496-1501, 1998.

VELLAICHAMY, E.; SOMMANA, N.K.; PANDEY, K.N. Reduced cGMP signaling activates NF- κ B in hypertrophied hearts of mice lacking natriuretic peptide receptor-A. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 327, n.1, p. 106-111, 2005.

VESSELINOVITCH, D.; WISSLER, R.W. Experimental production of atherosclerosis in mice. 2: effects of atherogenic and high-fat diets on vascular changes in chronically and acutely irradiated mice. **J Atheroscler Res.**, v. 8, p.497-523, 1968.

VODAK, P.A et al. HDL-cholesterol and other plasma lipid and lipoprotein concentrations in middle-aged male and female tennis players. **Metabolism.**, v. 29, n.8, p.745-752, 1980.

WANG, L.; WANG, A.N.; MINESHITA, S.; GA, I. Anti-inflammatory effects of propolis. **Jpn J Pharmacol Therapeut.**, v. 24, p.223-226, 1993.

WARNICK, G.R.; NAUCK, M.; RIFAI, N. Evolution of methods for measurement of HDL-cholesterol: from ultracentrifugation to homogeneous assays. **Clin Chem**, v.47, p.1579-1596, 2001.

WEBER, K.T.; BRILLA, C.G.; JANICKI, J.S. Myocardial remodeling and pathological hypertrophy. **Hospital Practice**, v. 26, p. 73- 80, 1991.

WEINECK. **Manual de treinamento esportivo**. São Paulo, 1986.

WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **J Apicult Res**, v. 37, p.99-105, 1998.

VOLPI, N.; BERGONZINI, G. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. **J Pharm Biomed Anal.**, v. 42, p. 354-361, 2006.

WOODWISS, A.J.; OOSTHUYSE, T.; NORTON, G.R. Reduced cardiac stiffness following exercise is associated with preserved myocardial collagen characteristics in the rat. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol.** , v.78, p. 148-154, 1998.

YAO, E.H.; YU, Y.; FUKUDA, N. Oxidative stress on progenitor and stem cells in cardiovascular diseases. **Curr Pharm Biotechnol.**, v. 7, p.101-108, 2006.

YELLIN, M.J. et al. Functional interactions of T cells with endothelial cells: the role of CD40LCD40-mediated signals. **J Exp Med.**, v. 182, p.1857-1864, 1995.

ZAGO, A.S.; ZANESCO, A. Nitric oxide: cardiovascular disease and physical exercise. **Arq Bras Cardiol.** , v.81, p.264-270, 2006.

ZANESCO, A.; ANTUNES, E. Effects of exercise training on the cardiovascular system: pharmacological approaches. **Pharmacol Ther.** , v.114, p.307-317, 2007.

ZHANG, Y. et al. Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo. **Circulation**, v.108, p.661-663, 2003.

ZIOGAS, G.G.; THOMAS, T.R.; HARRIS, W.S. Exercise training, postprandial hypertriglyceridemia, and LDL subfraction distribution. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 29, p. 986-991, 1997.

ZIRLIK, A. et al. Interleukin-18, the metabolic syndrome, and subclinical atherosclerosis: results from the Dallas Heart Study. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 27, p.2043-2049, 2007.