



LAYDE ROSANE PAIM

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NO AUMENTO DO RISCO
CARDIOVASCULAR EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE LESÃO
DA MEDULA ESPINHAL**

***MECHANISMS INVOLVED IN INCREASED CARDIOVASCULAR
RISK IN PATIENTS WITH SPINAL CORD INJURY***

Campinas

2014



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

LAYDE ROSANE PAIM

MECANISMOS ENVOLVIDOS NO AUMENTO DO RISCO
CARDIOVASCULAR EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE LESÃO DA
MEDULA ESPINHAL

*MECHANISMS INVOLVED IN INCREASED CARDIOVASCULAR RISK IN
SPINAL CORD INJURED SUBJECTS*

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Mestra em Ciências na área de concentração Clínica Médica.

Master's thesis presented to the Internal Medicine Postgraduate Program of the School of Medical Sciences, State University of Campinas, for the obtainment of Master of Science degree, specialization in Internal Medicine.

Orientação: Prof. Wilson Nadruz Junior

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR
LAYDE ROSANE PAIM E ORIENTADA PELO
PROF. DR. WILSON NADRUZ JUNIOR

Assinatura do Orientador

Campinas

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

P159m Paim, Layde Rosane, 1983-
Mecanismos envolvidos no aumento do risco cardiovascular em indivíduos portadores de lesão da medula espinhal / Layde Rosane Paim. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Wilson Nadruz junior.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Aterosclerose. 2. Traumatismos da medula espinhal. 3. Ultrassonografia. 4. Lipoproteína de baixa densidade oxidada. I. Nadruz Junior, Wilson, 1973-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Mechanisms involved in the increased cardiovascular risk in individual with spinal cord injury

Palavras-chave em inglês:

Atherosclerosis

Spinal cord injury

Ultrasound

Oxidized low density lipoprotein

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Clínica Médica

Banca examinadora:

Wilson Nadruz junior [Orientador]

Marcos Ferreira Minicucci

Alessandro Gonzales Salerno

Data de defesa: 18-06-2014

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

LAYDE ROSANE PAIM

ORIENTADOR: PROF. DR. WILSON NADRUZ JUNIOR

MEMBROS:

1. PROF. DR. WILSON NADRUZ JUNIOR



2. PROF. DR. MARCOS FERREIRA MINICUCCI



3. PROF. DR. ALESSANDRO GONZALEZ SALERNO



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 18 de junho de 2014

“O sucesso nasce do querer, da
determinação e persistência em se chegar a um
objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca
e vence obstáculos, no mínimo fará coisas
admiráveis.” (José de Alencar)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois sem Ele não somos nada.

Ao professor Wilson Nadruz pela oportunidade que me deu em seu laboratório, pelo incentivo a sempre seguir em frente, por toda ajuda apoio durante o processo.

A minha querida mãe por sempre estar ao meu lado me apoiando e incentivando em todas as fases da minha vida.

A minha tia Marilda e primas Karla e Bruna que sempre estiveram ao meu lado apoiando as minhas decisões.

As minhas amigas Naegele e Tamiris por me ajudar em todos os sentidos e sempre estarem ao meu lado.

Ao Roberto Schreiber pelo auxilio, explicações e apoio, desde o começo sempre me incentivando e encorajando.

Ao professor Kleber Gomes Franchini pela disponibilidade de seu laboratório e a suas alunas pelo auxilio.

A todos que sempre torceram por mim não só nesta etapa, mas em todas da minha vida, mesmo não sendo citados aqui e que de certo modo me influenciaram e ajudaram.

A Fundação de amparo a pesquisa do estado de São Paulo – FAPESP, pelo financiamento e concessão da bolsa referente ao projeto 2012/20025/5.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
I. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Lesão Medular.....	16
1.2. Aterosclerose.....	17
1.3. Lesão Medular e Risco Cardiovascular.....	22
1.4. Lesão Medular e Aterosclerose.....	23
1.5. JUSTIFICATIVA.....	25
II. OBJETIVOS.....	27
III. METODOLOGIA E RESULTADOS.....	29
IV. DISCUSSÃO.....	56
V. CONCLUSÃO.....	63
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

ASIA - American Spinal Injury Association

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade

LDL_{ox} – LDL oxidada

LM – Lesão da Medula Espinhal

MMP – Metaloproteinase

TIMP – Inibidor Tecidual das Metaloproteinases

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características clínicas, laboratoriais e carotídeas dos indivíduos estudados.....	47
Tabela 2: Níveis plasmáticos de LDLox, MMPs e TIMPs nos indivíduos estudados.....	48
Tabela 3: Coeficientes de correlação bivariada entre LDLox, MMPs e TIMPs e marcadores de aterosclerose carotídea em indivíduos com lesão medular (n=42).....	49
Tabela 4: Regressão linear tipo <i>stepwise</i> de medidas de aterosclerose carotídea em indivíduos com lesão medular (n=42).....	50

RESUMO

Estudos prévios mostram que indivíduos com lesão crônica na medula espinhal (LM) apresentam maior risco cardiovascular em comparação com indivíduos fisicamente normais. O presente estudo investigou a relação entre os níveis plasmáticos da lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDLox), as metaloproteinases de matriz (MMP) e seus inibidores teciduais (TIMPs) e o remodelamento vascular em pacientes com LM, e o papel da atividade física nesta relação. Foram estudados 42 homens com LM (≥ 2 anos), [18 sedentários (S-LM) e 24 fisicamente ativos (A-LM)] e 16 homens fisicamente saudáveis por meio de análise clínica, antropométrica, laboratorial e de espessura íntima-média da carótida (EIM). Todos os participantes estudados eram normotensos, não diabéticos, não fumantes e normolipêmicos. As concentrações plasmáticas de LDLox, MMP-2, MMP-8, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 foram determinados por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados mostraram que a EIM da carótida, razão EIM/diâmetro e as concentrações de LDLox dos A-LM e dos indivíduos fisicamente normais não foram diferentes estatisticamente. Por outro lado, indivíduos com S-LM apresentaram maior EIM, razão EIM/diâmetro e concentrações aumentadas de LDLox em comparação com A-LM ($p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p = 0,01$, respectivamente) e indivíduos controles ($p < 0,001$ para todos). Os resultados da análise de correlação bivariada, incluindo todos os indivíduos com LM, demonstrou que o EIM de carótida e a razão EIM/diâmetro se correlacionaram apenas com LDLox, MMP-8 e com a relação MMP-8/TIMP-1. Além disso, a análise de regressão ajustada para a presença ou não de atividade

física e idade mostrou que a LDLox foi associada à EIM carotídea e com a relação EIM/diâmetro, enquanto que MMP-8 foi associado com o índice EIM/diâmetro em indivíduos com LM. Em conclusão, as concentrações plasmáticas de LDLox e MMP-8 estão associados com aterosclerose carotídea e há interação entre a inatividade física, aterosclerose e LDLox em indivíduos com LM.

Palavras-chave: Lesão da medula espinhal; aterosclerose; ultrassonografia, LDLoxidada.

ABSTRACT

Previous reports have indicated that subjects with chronic spinal cord injury (SCI) exhibit increased cardiovascular risk compared to able-bodied individuals. This study investigated the relationship between plasmatic oxidized low-density lipoprotein (OxLDL), matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs (TIMPs) levels and vascular remodeling in SCI subjects and the role of physical activity in this regard. We studied 42 men with chronic (≥ 2 years) SCI [18 sedentary (S-SCI) and 24 physically active (PA-SCI)] and 16 able-bodied men by clinical, anthropometric, laboratory, and carotid intima-media thickness (IMT) analysis. All enrolled subjects were normotensive, non-diabetics, non-smokers and normolipemic. Plasmatic OxLDL, MMP-2, MMP-8, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. The results showed that carotid IMT, IMT/diameter ratio and OxLDL levels of PA-SCI and able-bodied subjects were statistically similar. Conversely, S-SCI subjects exhibited higher IMT, IMT/diameter ratio and OxLDL levels compared to PA-SCI ($p < 0.01$, $p < 0.001$ and $p = 0.01$, respectively) and able-bodied ($p < 0.001$ for all) individuals. Results of bivariate correlation analysis including all injured subjects showed that carotid IMT and IMT/diameter ratio only correlated with OxLDL, MMP-8 and MMP-8/TIMP-1 ratio. Further stepwise regression analysis adjusted for the presence or not of physical activity and age showed that OxLDL was associated with carotid IMT and IMT/diameter ratio, while MMP-8 was associated with IMT/diameter ratio in SCI individuals. In conclusion, plasmatic OxLDL and MMP-8 levels are

associated with carotid atherosclerosis and there is an interaction among physical inactivity, atherosclerosis and OxLDL in SCI individuals.

Keywords: Spinal cord injury, atherosclerosis; ultrasound, oxidized-LDL.



I. INTRODUÇÃO

1.1. Lesão Medular

A medula espinhal é um condutor de impulsos sensitivos e elétricos entre o cérebro e demais regiões no organismo (DELFINO, 1999), formando um sistema neural complexo, responsável pela transmissão, modificação e coordenação das funções motora, sensitiva e autonômica do indivíduo (STAAS et al. 2002). A lesão da medula espinhal se dá pela perda da conectividade dos axônios, ruptura dos vasos sanguíneos e perda celular, levando à interrupção, parcial ou completa, dos impulsos gerados por esse complexo sistema (DELFINO, 1999).

É esperado que a prevalência de indivíduos com lesão medular (LM) aumente substancialmente nas próximas décadas, principalmente devido a avanços na área médica, os quais têm assegurado que um número maior de indivíduos sobreviva ao período agudo pós-traumático (BLUMER & QUINE, 1996).

Nos Estados Unidos da América, há estimativa de 40 novos casos por milhão de habitantes/ano, enquanto que na Austrália, os registros foram de 12,5 casos por milhão de habitantes/ano (NSCISC, 2008). No Brasil, os índices estatísticos relacionados ao trauma raquimedular são desconhecidos e não existem dados precisos a respeito de sua incidência e prevalência, porém estima-se que ocorram 71 novos casos por milhão de habitantes/ano (CAMPOS et al, 2008). As causas traumáticas da LM são as mais comuns, sendo acidente automobilístico a principal causa, seguido por violência, quedas, mergulho em águas rasas e participação em esportes recreacionais (YEO et al, 1998). Por este motivo, a maior incidência de lesão ocorre em indivíduos do sexo masculino com idade entre 15 e 35 anos.

O grau de comprometimento do trauma tem como seus principais determinantes o nível e a extensão da lesão. A paraplegia é definida pela perda da função motora e/ou sensitiva nos segmentos torácico, lombar e sacral da medula espinhal e a tetraplegia é caracterizada pelo comprometimento a partir do segmento cervical. Não obstante, a forma mais utilizada para se classificar o paciente com lesão medular é através da escala da Associação Americana de Lesão Medular (*American Spinal Injury Association – ASIA*) (MAYNARD et al, 2007). Esse instrumento avalia, através dos dermatômos, o nível sensitivo de lesão e, através do exame de força muscular, o nível motor de lesão. A extensão da lesão é dividida em 5 níveis, sendo o indivíduo classificado como: ASIA A: lesão completa, ou seja, sem preservação das funções motoras e sensoriais abaixo do nível de lesão; ASIA B: sem preservação da função motora e com preservação sensorial abaixo do nível de lesão; ASIA C: manutenção da função motora abaixo do nível de lesão, porém com força muscular menor que grau 3; ASIA D: função motora preservada abaixo do nível de lesão, porém com força muscular igual ou maior que 3; e ASIA E: funções sensoriais e motoras preservadas abaixo do nível de lesão.

1.2. Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença inflamatória multifatorial, lenta e progressiva, que está associada ao acúmulo de lipídios e elementos fibróticos na camada íntima-media das artérias, podendo levar ao desenvolvimento de placas no lúmen do vaso, causando seu estreitamento (DESSI et al, 2013).

O endotélio vascular é uma camada única e continua de células que separa o sangue da parede vascular e do interstício, sendo considerado um órgão heterogêneo e dinâmico que possui funções secretoras, sintéticas, metabólicas e imunológicas, responsável pelo bom funcionamento do fluxo sanguíneo (DAVIGNON et al, 2004). O endotélio vascular produz várias substâncias benéficas para o organismo como fatores antioxidantes, substâncias antiinflamatórias e anticoagulantes, as quais inibem a adesão e migração de células inflamatórias para o espaço sub-intimal, assim como a migração e proliferação anormal de células musculares lisas (BAHIA et al, 2006; ANDO et al, 2009).

As funções vasculares são reguladas pela pressão e o fluxo sanguíneo. Assim, uma vez que esse dois parâmetros estejam normais, a força de cisalhamento induz ativação de uma cascata de eventos responsável pela manutenção do tônus vascular, através da produção de substâncias vasoativas como a angiotensina II (vasoconstritora) e o oxido nítrico (vasodilatador) (ANDO et al, 2009). A disfunção endotelial ocorre quando há aumento dos efeitos vasoconstritores em relação aos efeitos vasodilatadores, levando ao desequilíbrio na homeostase vascular por consequência da diminuição do oxido nítrico causada por lesões nas células vasculares (DAVIGNON et al, 2004; ANDO et al, 2009).

Em locais onde o fluxo sanguíneo se apresenta alterado, há redução nos níveis de oxido nítrico e consequente aumento na expressão de moléculas de adesão, dentre elas a molécula de adesão de célula vascular-1, a molécula de adesão intercelular -1, e a E-selectina, dentre outras. A expressão dessas moléculas é induzida por algumas citocinas, como a interleucina-6, interleucina-1,

interleucina-4 e fator de necrose tumoral-alfa, favorecendo o recrutamento de células inflamatórias e monócitos ao local (LIBBY et al, 2002; DESSI et al, 2013).

As modificações oxidativas também exercem um papel na aterosclerose e tem participação das mieloperoxidases, que são enzimas expressas especialmente por leucócitos. Estas enzimas podem converter a lipoproteína de baixa densidade (LDL) em LDL-oxidada (LDLox), a qual exhibe afinidade a certos receptores dos macrófagos como, por exemplo, o CD36 (PODREZ et al, 2000). As mudanças ocorridas na LDL, resultantes das modificações oxidativas, contribuem para a formação da placa aterosclerótica por permitirem a perda de reconhecimento pelo receptor de LDL e o reconhecimento pelos receptores “scavenger” dos macrófagos, o que resulta na formação das células espumosas (BERLINER et al, 1995).

A LDLox se liga aos receptores dos macrófagos e células musculares lisas. O alto consumo de LDLox pelos macrófagos os transforma em células espumosas, precursoras da formação da placa de ateroma. Fatores de crescimento e a diminuição de óxido nítrico favorecem a proliferação de células musculares lisas, que secretam matriz extracelular formando a capa fibrosa. Após um tempo, as células espumosas morrem causando necrose no local deixando a placa de ateroma instável. Além disto, os macrófagos produzem enzimas de degradação da matriz (as metaloproteinases de matriz ou MMPs) que atacam a capa fibrosa, permitindo a saída do conteúdo lipídico para a corrente sanguínea, instabilizando a placa. Este evento causa a agregação plaquetária, ativação da cascata de coagulação e formação de trombos, que podem culminar com o desenvolvimento de eventos cardiovasculares agudos (LIBBY et al, 2002).

As MMPs são enzimas zinco-dependentes com capacidade de degradar a matriz extracelular, pertencentes à família das metaloendopeptidases. Existem mais de 25 tipos de metaloproteinases que são classificadas de acordo com o substrato que degradam em collagenases (MMP 1, 8, 13 e 18), gelatinases (MMP 2 e 9), estromelisinases (MMP 3, 10 e 11), matrilisinas (MMP 7, 11 e 26) e as tipo membranas (MMP 14, 15, 16 e 17), entre outras. (GONÇALVES et al, 2009).

As MMPs têm importante participação em processos fisiológicos como, por exemplo, no desenvolvimento embrionário, reprodução e remodelamento arterial, assim como em processos patológicos como artrite reumatoide, aterosclerose, metástase tumoral e outros (GALES et al, 2002). Sua atividade é regulada por vários fatores como citocinas, fatores de crescimento, estresse oxidativo, força de cisalhamento e a interação com seus inibidores.

Os principais reguladores endógenos da atividade das MMPs são os TIMPs (inibidores teciduais das metaloproteinases), responsáveis pela inibição da forma ativa das MMPs. O equilíbrio entre as MMPs e seus inibidores previne a degradação da matriz extracelular (GALES et al, 2002; GUIMARÃES et al, 2010). Os TIMPs são divididos em: TIMP1, TIMP2, TIMP3 e TIMP4. O TIMP1 pode atuar junto como inibidor da MMP9 e MMP8, enquanto que o TIMP2 pode inibir a MMP2. Os TIMPs não atuam somente como inibidores das MMPs, como também no crescimento de vários tipos celulares e na apoptose (VISSE et al, 2003).

Dentre os grupos das MMPs, as gelatinases (MMP2 e MMP9) têm capacidade de degradar gelatina e desnaturar colágeno presentes na membrana basal (GALES et al, 2002). Esse grupo de MMPs tem grande participação nos processos patológicos que levam a doenças cardiovasculares como aterosclerose,

isquemia, infarto agudo do miocárdio e hipertensão, e também em certos casos facilita a ação tumoral, conduzindo a progressão do câncer (GUIMARÃES et al, 2010).

A MMP2 é expressa pelas células do tecido conjuntivo, epiteliais e endoteliais. Na sua forma ativa (72 kDa), tem a capacidade de degradar colágeno tipo I, IV e V e colágeno desnaturado (gelatina). Já a MMP9 é expressa, na maioria das vezes, por várias células inflamatórias. Sua forma ativa (92 kDa) tem grande participação no remodelamento e reparo de tecidos e na degradação de colágenos tipo IV, V e gelatina. A MMP8 presente nos macrófagos e em células musculares lisas tem participação em lesões ateroscleróticas, tanto na inflamação como no processo de remodelamento do colágeno, colaborando, também com a ruptura da placa. (GONÇALVES et al, 2009).

As MMP2, MMP8 e MMP9 têm participações importantes no processo de aterosclerose desde a iniciação até a rompimento das placas e podem ser expressas por monócitos, macrófagos, células endoteliais e células musculares lisas (ROMERO et al, 2008). Estas enzimas proteolíticas exercem papel importante na aterogênese, tanto por aumentar a instabilidade da placa aterosclerótica quanto por estimular o crescimento da camada íntima e o remodelamento arterial (NEWBY, 2005). Neste contexto, tem-se mostrado relevante correlação entre atividade/expressão plasmática de metaloproteinases e carga aterosclerótica em diversas situações clínicas (GAUBATZ et al, 2010).

1.3. Lesão Medular e Risco Cardiovascular

Nas últimas décadas, houve considerável melhora no suporte clínico fornecido aos indivíduos com LM, o que tem promovido redução da morbimortalidade por doenças respiratórias e infecciosas e incremento substancial da sobrevida (VAN DEN BERG et al, 2010). Indivíduos com LM tendem a ser sedentários, o que pode predispor o desenvolvimento de doenças crônicas, como hipertensão, diabetes mellitus e distúrbios metabólicos (BURR et al, 2012). Estas condições, por sua vez, colaborariam para aumento na prevalência de doenças cardiovasculares, tais como doença arterial coronária, doença cerebrovascular e arritmias, sendo a incidência significativamente maior em indivíduos com LM em comparação com sujeitos saudáveis (MYERS et al, 2007).

A doença arterial coronária tende a ocorrer mais precocemente em pacientes lesados (PHILLIPS et al, 1988; DEVIVO et al, 1992; GARSHICK et al, 2005), indicando que estes indivíduos apresentam aceleração da aterogênese. Estas características fazem com que as doenças cardiovasculares já sejam apontadas como as principais causas de morte em algumas populações de indivíduos portadores de LM crônica (GARSHICK et al, 2005; MYERS et al, 2007).

Estimativas precisas da prevalência de doenças cardiovasculares em pacientes com LM são comprometidas pela alta frequência de doença arterial coronária assintomática (BAUMAN et al, 1993; BAUMAN et al, 1994). Apesar desta limitação, alguns estudos mostraram que as doenças cardiovasculares ocorrem em 30-50% dos pacientes com mais de uma década de LM, enquanto que em indivíduos fisicamente saudáveis a prevalência de doenças

cardiovasculares é estimada em torno de 5-10% (PHILLIPS et al, 1988; LEVI et al, 1995; GROAH et al, 2001; GARSHICK et al, 2005; MYERS et al, 2007). Por outro lado, nosso grupo demonstrou que pacientes com média de aproximadamente 7 anos de LM já apresentam aumento substancial da espessura íntima-média carotídea e pior função diastólica do ventrículo esquerdo (MATOS-SOUZA et al, 2009; MATOS-SOUZA et al, 2011), sugerindo que o desenvolvimento de doenças cardiovasculares pode ser um evento precoce pós-LM.

1.4. Lesão Medular e Aterosclerose

A LM crônica pode se acompanhar de maior prevalência de dislipidemias, obesidade e diabetes mellitus, provavelmente induzida pela extrema inatividade física por ela imposta (YEKUTEIL et al, 1989; DEMIREL et al, 2001; GARSHICK et al, 2005; LEE et al, 2005). Estes fatos poderiam justificar a maior frequência de doenças cardiovasculares nos pacientes com LM. Entretanto, o aumento da espessura íntima-média associado à LM ocorre independentemente de fatores de risco tradicionais, como idade, índice de massa corpórea, dislipidemias, diabetes mellitus, hipertensão arterial, tabagismo e níveis séricos de marcadores inflamatórios (MATOS-SOUZA et al, 2009; MATOS-SOUZA et al, 2010). Em concordância com estas observações, ORAKZAI et al (2007) mostraram maior escore de cálcio coronário em pacientes lesados, o qual também foi independente de fatores de risco tradicionais. Estes dados, em conjunto, reforçam a idéia de que mecanismos alternativos estão envolvidos na aterogênese relacionada à lesão medular.

Em 2008, JAE et al mostraram que atletas paraplégicos apresentam espessura íntima-média carotídea similar a de indivíduos fisicamente saudáveis. Esta observação e o fato de que a doença aterosclerótica é mais comum em tetraplégicos do que em paraplégicos (MYERS et al, 2007; MATOS-SOUZA et al, 2010) apontam para um papel crucial da inatividade física na aterogênese relacionada à LM crônica. É importante ressaltar que a aterosclerose associada à inatividade física tem sido classicamente explicada por alterações no perfil metabólico e inflamatório e pelo desenvolvimento de obesidade e hipertensão arterial (LEUNG et al, 2008). Entretanto, conforme descrito anteriormente, estes fatores parecem não exercer papel essencial na aterogênese induzida por LM crônica, sugerindo que a LM em humanos possa ser um modelo singular de aterosclerose induzida por inatividade física, cujo estudo pode expandir a compreensão da fisiopatologia da doença aterosclerótica. Em concordância com estas observações, dados recentes de nosso grupo mostraram que atletas portadores de LM apresentam redução significativa da espessura íntima-média carotídea quando comparados com indivíduos com LM sedentários (MATOS-SOUZA et al, 2013). Curiosamente, neste estudo supracitado, a menor carga aterosclerótica nos atletas com LM em relação aos indivíduos com LM sedentários não foi explicada por variações nos fatores de risco tradicionais, como idade, índice de massa corpórea, dislipidemias, diabetes mellitus, hipertensão arterial, tabagismo e níveis séricos de proteína C-reativa. Em conjunto, estes dados indicam que mecanismos alternativos podem modular a aterogênese nos indivíduos com LM.

Candidatos potenciais para explicar o desenvolvimento de aterosclerose em pacientes com LM ainda incluem aumento do estresse oxidativo e ativação de MMPs. Evidências prévias revelaram que o nível de atividade física em indivíduos com LM apresenta correlação inversa com o grau de estresse oxidativo (VAN DUIJNHOFEN et al, 2010). Visto que o estresse oxidativo e a oxidação de lipoproteínas estão envolvidos no desenvolvimento de aterosclerose (ISHIGAKI et al, 2009), é possível que estes fatores também estejam envolvidos na aterogênese relacionada à LM. Por outro lado, alguns estudos têm mostrado que o exercício físico pode trazer o equilíbrio entre as MMPs e seus inibidores em indivíduos sem LM, inibindo assim a inflamação presente na aterosclerose (KADOGLU et al, 2010). Contudo, até o momento, não se sabe como está a expressão de MMPs e TIMPs no plasma dos indivíduos lesados e qual a sua correlação com o grau de aterosclerose.

1.5. JUSTIFICATIVA

Indivíduos com LM apresentam maior carga aterosclerótica do que sujeitos fisicamente saudáveis. Estas características são independentes de fatores de risco tradicionais, como idade, hipertensão arterial, índice de massa corpórea, alterações metabólicas, tabagismo ou níveis séricos de fatores inflamatórios. Recentemente, nosso grupo mostrou que a atividade física regular se associa à redução de aterosclerose carotídea em indivíduos com LM independente de variações de fatores metabólicos e hemodinâmicos e dos níveis de proteína C-

reativa. Em conjunto, tais evidências apontam para a LM em humanos como um modelo com características cardiovasculares únicas, cujo estudo pode expandir a compreensão da fisiopatologia da doença aterosclerótica relacionada à inatividade física. Neste sentido, é possível que a ativação de MMPs e oxidação de lipoproteínas exerçam um papel relevante neste processo.



II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Investigar a concentração plasmática de LDLox, das MMPs 2, 8 e 9 e dos TIMPs 1 e 2 em indivíduos com LM sedentários, em atletas com LM e em indivíduos sem LM e avaliar a relação destas variáveis com a aterosclerose carotídea.



III. METODOLOGIA E RESULTADOS

III. METODOLOGIA E RESULTADOS

A metodologia e os resultados da presente tese estão apresentados no seguinte artigo: “**Oxidized low-density lipoprotein, matrix-metalloproteinase-8 and carotid atherosclerosis in spinal cord injured subjects**”, publicado no periódico *Atherosclerosis*.

OXIDIZED LOW-DENSITY LIPOPROTEIN, MATRIX-METALLOPROTEINASE-8 AND CAROTID ATHEROSCLEROSIS IN SPINAL CORD INJURED SUBJECTS

Layde R. Paim ^{*a}; Roberto Schreiber ^{*a}; José R. Matos-Souza ^a; Anselmo A. Silva ^b; Luis F. Campos ^b; Eliza R Azevedo ^c; Karina Alonso ^c; Guilherme de Rossi ^a; Maurício Etchebehere ^c; José I. Gorla ^b; Alberto Cliquet Jr. ^{c,d}; Wilson Nadruz Jr. ^a.

* Both authors contributed equally to this work

a - Department of Internal Medicine, University of Campinas, Campinas, Brazil

b - School of Physical Education, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

c - Department of Orthopaedics, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

d - Department of Electrical Engineering, University of São Paulo (USP), São Carlos, SP, Brazil

Running title: Spinal cord injury, carotid IMT, OxLDL and MMP8

Corresponding Author:

Wilson Nadruz Junior, MD, Ph.D.

Departamento de Clínica Médica,
Faculdade de Ciências Médicas,
Universidade de Campinas,
Cidade Universitária Zeferino Vaz,
13081-970, Campinas, SP. Brazil.
Phone/FAX: (55) (19) 3521 7836; E-Mail: wilnj@fcm.unicamp.br

Number of Tables: 4

Number of Figures: 0

Keywords: paraplegia; tetraplegia; intima-media thickness; oxidized LDL; metalloproteinases.

Abstract

Objective: Previous reports have indicated that subjects with chronic spinal cord injury (SCI) exhibit increased cardiovascular risk compared to able-bodied individuals. This study investigated the relationship between plasmatic oxidized low-density lipoprotein (OxLDL), matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs (TIMPs) levels and vascular remodeling in SCI subjects and the role of physical activity in this regard. **Methods:** We studied 42 men with chronic (≥ 2 years) SCI [18 sedentary (S-SCI) and 24 physically active (PA-SCI)] and 16 able-bodied men by clinical, anthropometric, laboratory, and carotid intima-media thickness (IMT) analysis. All enrolled subjects were normotensive, non-diabetics, non-smokers and normolipemic. Plasmatic OxLDL, MMP-2, MMP-8, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results:** Carotid IMT, IMT/diameter ratio and OxLDL levels of PA-SCI and able-bodied subjects were statistically similar. Conversely, S-SCI subjects exhibited higher IMT, IMT/diameter ratio and OxLDL levels compared to PA-SCI ($p < 0.01$, $p < 0.001$ and $p = 0.01$, respectively) and able-bodied ($p < 0.001$ for all) individuals. Results of bivariate correlation analysis including all injured subjects showed that carotid IMT and IMT/diameter ratio only correlated with OxLDL, MMP-8 and MMP-8/TIMP-1 ratio. Further stepwise regression analysis adjusted for the presence or not of physical activity and age showed that OxLDL was associated

with carotid IMT and IMT/diameter ratio, while MMP-8 was associated with IMT/diameter ratio in SCI individuals. **Conclusions:** Plasmatic OxLDL and MMP-8 levels are associated with carotid atherosclerosis and there is an interaction among physical inactivity, atherosclerosis and OxLDL in SCI individuals.

Introduction

Cardiovascular diseases are commonly seen in subjects with spinal cord injury (SCI) and coronary heart disease is more prevalent in individuals with SCI than in the able-bodied population [1]. For long-term SCI, morbidity and mortality from cardiovascular causes now exceed those caused by renal and pulmonary conditions, the primary causes of mortality in previous decades [2].

Several reports have shown that subjects with SCI exhibit increased subclinical atherosclerosis in comparison with able-bodied individuals, independent of traditional cardiovascular risk factors [3-6]. In addition, other lines of evidence have indicated that regular physical activity is associated with decreased carotid intima-media thickness (IMT) in SCI individuals, independent of variation in hemodynamic, metabolic and inflammatory variables [7,8]. These data point toward chronic SCI as a potential condition for the study of the mechanisms underlying physical inactivity-induced atherogenesis.

The oxidatively modified form of low-density lipoprotein-cholesterol (OxLDL) as well as matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs (TIMPs) are known to play an important role in atherogenesis [9, 10]. In addition,

circulating concentrations of OxLDL, MMPs and TIMPs have been also related to atherosclerosis development and progression in human beings [9-11]. Former studies revealed that regular physical activity is associated with decreased levels of OxLDL and MMPs in able-bodied subjects, which might contribute to explain the beneficial effects of exercise on cardiovascular risk [12-14]. Therefore, the present study investigated the carotid arteries of physically active (PA-SCI) and sedentary (S-SCI) men with SCI and able-bodied men and evaluated the impact of OxLDL, MMPs and TIMPs in this regard.

Materials and methods

Study population

A total of 42 [18 S-SCI (age=32.3±1.8 years; time of injury=7.2±1.1 years) and 24 PA-SCI (age=30.1±1.3 years; time of injury=9.3±0.9 years)] men with at least two years of SCI and 16 sedentary able-bodied men (age=29.6±1.3 years) were cross-sectionally evaluated. S-SCI subjects were enrolled from the hospital of the University of Campinas, while able-bodied individuals were recruited from employees and students of the same university. PA-SCI subjects comprised competitive athletes who were regularly performing wheelchair rugby (n=12), basketball (n=11) and handball (n=1) for at least one year and were enrolled from the School of Physical Education of the University of Campinas. This latter group had been participating in physical activities in average 11.9±1.4 hours per week for 4.4±0.6 years. Enrolled able-bodied men did not perform sports or recreational

physical activity. Exclusion criteria for all groups included diabetes mellitus, systemic hypertension, hyperlipidemia [15], current or past smoking, known coronary artery, cardiac or pulmonary disease, cancer, regular medical therapy and clinical evidence of active infection. All enrolled SCI subjects presented no preserved motor function below the injury level.

Ethics Statement

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and the protocol was approved by the Institutional Review Board of the University of Campinas. All participants read and signed informed consent.

Clinical, laboratory and hemodynamic data

Clinical data included information on the participants' age and injury duration. Stature of SCI individuals was taken using a stadiometer (**WCS** model, Cardiomed, Curitiba, Brazil) in supine position. Body mass index was calculated as body weight divided by height squared. Blood samples were obtained on the morning after 12h of fasting for analysis of glucose, lipid fractions and C-reactive protein.

Office blood pressure was measured using validated digital oscillometric device with the subjects in the sitting position (Omron HEM-705CP, Omron Corp, Kyoto, Japan). Two readings were averaged and if they differed by more than 5mmHg, one additional measurement was performed and then averaged.

Oxidized LDL and matrix metalloproteinases analysis

Plasma samples were collected after 12h of fasting and immediately frozen to -80°C. Then, commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kits were used to evaluate the plasmatic concentrations of OxLDL (Mercodia AB, Uppsala, Sweden), and MMP-9, MMP-2, MMP-8, TIMP-1 and TIMP-2 concentrations (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Carotid Ultrasonography studies

Carotid ultrasonography studies were performed by a skilled physician on each subject in the sitting position with a Vivid 3 Pro apparatus (General Electric, Milwaukee, WI, USA) equipped with a 10-MHz transducer [16, 17]. The average from both right and left common carotid arteries measurements was used for analyses. In order to measure the carotid IMT, a region 2 cm proximal to the carotid bifurcation was identified, and the IMT of the far wall was evaluated as the distance between the lumen–intima interface and the media–adventitia interface. All measurements were made using an automatic border recognizer (Vivid 3 Pro IMT software analyzer) on still images obtained during the sonographic scanning. No plaques were visualized while measuring IMT. End-diastolic internal carotid diameters were obtained by continuous tracing of 3 cycles and averaged. Intraobserver and interobserver carotid IMT and diameter variabilities were <5%, and intra-observer and inter-observer variabilities of resistive index measurements were <4%.

Statistical Analysis

Results were analyzed using SPSS 15.0TM. Continuous normal and non-normal variables are presented as mean $\pm$ standard error and median (25–75th percentile), respectively. Based on previous studies [3, 8], a sample size of 15 individuals in each group was considered suitable for detecting significant differences in carotid IMT regarding values of alpha error = 0.01 and beta error = 0.9. However, we were able to extend data collection to 16, 18 and 24 individuals in the able-bodied, S-SCI and PA-SCI groups. The Kolmogorov–Smirnov test was used to test for normal distribution of the variables. Differences in continuous normal variables were evaluated by one-way ANOVA followed by Tukey test for pairwise comparisons, while differences in continuous non-normal variables were evaluated by Kruskal–Wallis test followed by Wilcoxon signed rank test for pairwise comparisons. χ^2 was used to compare categorical variables. Assessment of bivariate correlations between variables was examined using Pearson's correlation coefficient for normally distributed data and Spearman's rank correlation coefficient for non-normal data. Partial correlation analysis was used to evaluate the relationship between OxLDL and MMP-2 after adjustment for physical activity. Stepwise regression analysis was used to evaluate the independent predictors of carotid IMT and IMT/diameter. Variables that exhibited significant correlation at bivariate analysis were included as independent variables in regression analyses. A p -value <0.05 was considered significant.

Results

Clinical, hemodynamic and carotid features of enrolled subjects are presented in Table 1. Able-bodied subjects exhibited higher blood pressure levels than the SCI groups, higher average body mass index than the PA-SCI group and lower C-reactive protein levels than the S-SCI group. In addition, average carotid IMT and IMT/diameter values of able-bodied and PA-SCI subjects were similar. However, S-SCI subjects exhibited higher IMT and IMT/diameter ratio compared to PA-SCI ($p<0.01$ and $p<0.001$, respectively) and able-bodied ($p<0.001$ for both) individuals. Plasmatic levels of OxLDL, MMPs and TIMPs are presented in Table 2. OxLDL levels of able-bodied and PA-SCI subjects were similar. Nevertheless, S-SCI individuals showed higher OxLDL levels than PA-SCI ($p=0.01$) and able-bodied ($p<0.001$) subjects. At last, no differences in MMPs, TIMPs and MMP/TIMP ratios were detected among the studied groups.

Bivariate correlation analysis including all SCI subjects ($n=42$) was performed to evaluate the relationship between carotid atherosclerosis and plasmatic levels of OxLDL, MMPs and TIMPs (Table 3). Carotid IMT and IMT/diameter correlated with OxLDL ($r=0.47$; $p<0.01$ and $r=0.51$; $p<0.001$, respectively), MMP-8 ($r=0.33$; $p<0.05$ and $r=0.35$; $p<0.05$, respectively) and MMP-8/TIMP-1 ratio ($r=0.35$; $p<0.05$ and $r=0.32$; $p<0.05$, respectively). In order to detect potential confounding factors, we also observed that carotid IMT and IMT/diameter correlated with age ($r=0.31$; $p<0.05$ and $r=0.38$; $p<0.05$, respectively) but with no other studied clinical or laboratory variable. Noticeably, carotid IMT and IMT/diameter showed no significant correlation with whole LDL-cholesterol levels ($r=0.16$; $p=0.34$ and $r=0.19$; $p=0.25$, respectively).

Stepwise regression analysis was then performed to evaluate the variables that were independently associated with carotid atherosclerosis in SCI individuals (Table 4). The presence of physical activity and OxLDL levels were independently associated with carotid IMT in a model that also included MMP-8/TIMP-1 ratio and age as independent variables. Conversely, carotid IMT/diameter was associated with physical activity, OxLDL and MMP-8 but not with age.

We then evaluated whether OxLDL correlated with any studied variable among SCI subjects. Results of bivariate analysis showed a direct correlation between OxLDL and MMP-2 levels ($r=0.39$; $p=0.009$). This result remained statistically significant even after adjustment for physical activity ($p=0.01$). On the other hand, OxLDL did not correlate with C-reactive protein, other MMPs and TIMPs or with any studied clinical, laboratory or hemodynamic feature.

Discussion

Previous studies reported increased subclinical atherosclerosis in SCI individuals, independent of variation in traditional risk factors [3-6, 17]. Interestingly, regular physical activity was described to be associated with decreased carotid IMT in SCI individuals, independent of variation in hemodynamic, metabolic and inflammatory variables [7, 8], thus indicating that alternative mechanisms underlie this association. In the present report we evaluated young, nonhypertensive, nondiabetic, nonsmoker S-SCI, PA-SCI and able-bodied individuals with normal average lipids and glucose levels and found that: 1) carotid IMT and OxLDL plasmatic levels of S-SCI subjects were markedly

higher than those of PA-SCI and able-bodied subjects; and 2) plasmatic OxLDL and the presence of physical activity were independently associated with carotid IMT and carotid IMT/diameter, while MMP-8 levels also exhibited significant association with carotid IMT/diameter in SCI individuals. In general, these findings provide novel evidence that oxidatively modified form of LDL-cholesterol and MMP-8 are related to SCI-induced atherogenesis and further suggest that there is an interaction among physical inactivity, atherosclerosis and OxLDL in SCI individuals.

OxLDL is a pro-inflammatory and pro-atherogenic lipoprotein and is intimately involved in the initiation, progression and potentially in the destabilization of atherosclerotic lesions [9]. Previous studies demonstrated that plasmatic OxLDL levels are related to carotid atherosclerosis and may be reduced by regular physical activity in some able-bodied populations [9, 12, 18]. In the present report we found that OxLDL levels were markedly higher in S-SCI than in PA-SCI and able-bodied subjects. This result contrasts with a previous report by Mitsui et al, which showed unaltered plasmatic OxLDL levels in SCI subjects after acute exercise [19]. This discrepancy seems to be explained by the fact that the SCI athletes enrolled in our protocol were chronically performing physical activity, which has been also associated with lower OxLDL levels in able-bodied subjects [12, 20]. Besides exhibiting increased OxLDL levels, S-SCI subjects also presented higher carotid IMT and IMT/diameter values than PA-SCI. Conversely, results of bivariate and stepwise regression analyses revealed that OxLDL was associated with carotid atherosclerosis in all studied SCI individuals. Remarkably, this association was independent of the presence of physical activity. Overall, these data indicate

that OxLDL might play a role in SCI-induced atherogenesis and further suggest that changes in OxLDL levels could contribute to explain the beneficial effects of regular physical activity in SCI-induced vascular remodeling. Nevertheless, further longitudinal studies are necessary to confirm this assumption.

Oxidation of lipoproteins is usually assumed to occur as a consequence of oxidative stress in the vessel wall generated by cardiovascular risk factors [21]. However, the mechanisms by which OxLDL was increased in S-SCI subjects, but not in PA-SCI individuals, were not clear in our study. As an approach to address this issue, we assessed the correlation between OxLDL and all studied variables among injured subjects and found that OxLDL only correlated with MMP-2 levels, even after adjustment for physical activity. Nevertheless, we believe that this association might not be a major mechanism behind the interaction among OxLDL, physical activity and SCI, since OxLDL has been reported to stimulate the expression of MMP-2 [22], and not the opposite. Therefore it seems more appropriate to speculate that increased MMP-2 levels might be a consequence rather than a cause of higher OxLDL levels in SCI subjects.

In our protocol, we evaluated the plasmatic expression of MMP-2, MMP-8 and MMP-9 and their respective TIMPs, but no differences in their levels or ratios among the studied groups were found. However, results of stepwise regression analysis showed an independent association between MMP-8 and carotid IMT/diameter values in SCI individuals. Arterial IMT/diameter is an alternative measure of atherosclerosis and is more representative of a concentric vascular remodeling pattern [6, 23]. In addition, MMP-8 is involved in remodeling processes

within the atherosclerotic plaque and MMP-8 levels have been associated with carotid and coronary atherosclerosis and with increased risk for future cardiovascular events [24-26]. These findings suggest that MMP-8 might play a role in SCI-induced atherogenesis. Nevertheless, the lack of impact of physical activity on the plasmatic levels of MMP-8 and MMP8/TIMP-1 ratio in our sample of SCI individuals indicate that changes in circulating MMP8 levels do not contribute to explain the beneficial effects of physical activity on SCI-induced vascular remodeling.

Physical activity is consistently related to cardiovascular disease risk reduction, which has usually been considered to be a consequence of the beneficial effects of exercise on metabolic, inflammatory and thrombotic factors [27]. Nevertheless, the precise mechanisms underlying the effects of exercise on atherogenesis progression remain not established. In addition, conflicting data have been reported regarding the impact of physical activity on measures of atherosclerotic burden, such as carotid wall thickness and coronary artery calcium [27, 28]. In the present report, by evaluating a very specific subgroup of individuals, namely SCI subjects, we observed that physical activity was associated with reduced carotid atherosclerosis. Noticeably, such variation in atherosclerotic burden was not explained by changes in traditional metabolic, hemodynamic and inflammatory risk factors, but instead, was related to changes in alternative factors, such as oxidized lipoproteins. Overall, this body of evidence points toward the need for further studies assessing the role of physical activity on the pathogenesis and prevention of atherosclerosis in humans.

One aspect of our protocol that should be highlighted was the strict criteria of subject selection of our sample. We excluded individuals with obesity, hyperlipidemias, diabetes mellitus, hypertension and smoking, which are commonly seen after chronic SCI [1] and could be potential confounders in the analysis. In addition, we only included SCI subjects without any preserved motor function below the injury level, a feature that is noticeably associated with increased prevalence of cardiovascular disease [29]. However, two potential limitations should be acknowledged. First, the cross-sectional design limits our ability to infer a causal relationship between OxLDL and MMP-8 levels and carotid atherosclerosis in SCI individuals. Second, the inclusion of only male patients means that the results cannot yet be applied to female patients.

In conclusion, the present report showed that plasmatic OxLDL and MMP-8 levels are associated with carotid atherosclerosis and that there is an interaction among physical inactivity, atherosclerosis and OxLDL in SCI individuals. These findings suggest that physical activity might influence the early course of atherosclerosis in patients with SCI and further support the notion regular exercise may exert beneficial vascular effects in this population.

Conflict of interest

None.

Source of funding

This work was supported by grants from FAPESP (2010/16252-0) and CNPq (476909/2012-0 and 303539/2010-0), Brazil.

References

[1] Myers J, Lee M, Kiratli J. (2007) Cardiovascular disease in spinal cord injury: an overview of prevalence, risk, evaluation, and management. *Am J Phys Med Rehabil* 86: 142-152.

[2] Garshick E, Kelley A, Cohen SA, Garrison A, Tun CG, et al. (2005) A prospective assessment of mortality in chronic spinal cord injury *Spinal Cord* 43: 408-416.

[3] Matos-Souza JR, Pithon KR, Ozahata TM, Gemignani T, Cliquet A Jr, et al. (2009) Carotid intima-media thickness is increased in patients with spinal cord injury independent of traditional cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis* 202: 29-31.

[4] Orakzai SH, Orakzai RH, Ahmadi N, Agrawal N, Bauman WA, et al. (2007) Measurement of coronary artery calcification by electron beam computerized tomography in persons with chronic spinal cord injury: evidence for increased atherosclerotic burden. *Spinal Cord* 45: 775-779.

[5] Wang YH, Chen SY, Wang TD, Hwang BS, Huang TS, et al. (2009) The relationships among serum glucose, albumin concentrations and carotid atherosclerosis in men with spinal cord injury. *Atherosclerosis* 206: 528-534.

[6] Thijssen DH, De Groot PC, van den Bogerd A, Veltmeijer M, Cable NT, et al. (2012) Time course of arterial remodelling in diameter and wall thickness above and below the lesion after a spinal cord injury. *Eur J Appl Physiol* 112: 4103-9.

[7] Jae SY, Heffernan KS, Lee M, Fernhall B. (2008) Arterial structure and function in physically active persons with spinal cord injury. *J Rehabil Med* 40: 535-538.

[8] Matos-Souza JR, Silva AA, Campos LF, Goulart D, Schreiber R, et al. (2013) Physical activity is associated with improved subclinical atherosclerosis in spinal cord injury subjects independent of variation in traditional risk factors. *Int J Cardiol* 167:592-593.

[9] Fraley AE, Tsimikas S. (2006) Clinical applications of circulating oxidized low-density lipoprotein biomarkers in cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 17: 502-509.

[10] Siasos G, Tousoulis D, Kioufis S, Oikonomou E, Siasou Z, et al. (2012) Inflammatory mechanisms in atherosclerosis: the impact of matrix metalloproteinases. *Curr Top Med Chem* 12: 1132-1148.

[11] Romero JR, Vasan RS, Beiser AS, Polak JF, Benjamin EJ, et al. (2008) Association of carotid artery atherosclerosis with circulating biomarkers of extracellular matrix remodeling: the Framingham Offspring Study. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 17: 412-417.

[12] Schjerve IE, Tyldum GA, Tjønnå AE, Stølen T, Loennechen JP, et al. (2008) Both aerobic endurance and strength training programmes improve cardiovascular health in obese adults. *Clin Sci (Lond)* 115: 283-293.

[13] Kadoglou NP, Vrabas IS, Sailer N, Kapelouzou A, Fotiadis G, et al. (2010) Exercise ameliorates serum MMP-9 and TIMP-2 levels in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 36: 144-151.

[14] Lucotti P, Monti LD, Setola E, Galluccio E, Gatti R, et al. (2011) Aerobic and resistance training effects compared to aerobic training alone in obese type 2 diabetic patients on diet treatment. *Diabetes Res Clin Pract* 94: 395-403.

[15] Executive Summary: The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation And Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285: 2486-2497.

[16] Ferreira-Sae MC, Cipolli JA, Cornélio ME, Matos-Souza JR, Fernandes MN, et al. (2011) Sodium intake is associated with carotid artery structure alterations and plasma matrix metalloproteinase-9 upregulation in hypertensive adults. *J Nutr* 141: 877-882.

[17] Matos-Souza JR, Pithon KR, Ozahata TM, Oliveira RT, Téo FH, et al. (2010) Subclinical atherosclerosis is related to injury level but not to inflammatory parameters in spinal cord injury subjects. *Spinal Cord* 48: 740-744.

[18] Vaidya D, Szklo M, Cushman M, Holvoet P, Polak J, et al (2011) Association of endothelial and oxidative stress with metabolic syndrome and subclinical atherosclerosis: multi-ethnic study of atherosclerosis. *Eur J Clin Nutr* 65: 818-825.

[19] Mitsui T, Nakamura T, Ito T, Umemoto Y, Sakamoto K, et al. (2012) Exercise significantly increases plasma adrenaline and oxidized low-density lipoprotein in normal healthy subjects but not in persons with spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 93: 725-727.

[20] Coen PM, Flynn MG, Markofski MM, Pence BD, Hannemann RE. (2009) Adding exercise training to rosuvastatin treatment: influence on serum lipids and biomarkers of muscle and liver damage. *Metabolism* 58: 1030-1038.

[21] Fraley AE, Tsimikas S. (2006) Clinical applications of circulating oxidized low-density lipoprotein biomarkers in cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*. 17: 502-509.

- [22] Chen KC, Wang YS, Hu CY, Chang WC, Liao YC, et al. (2011) OxLDL up-regulates microRNA-29b, leading to epigenetic modifications of MMP-2/MMP-9 genes: a novel mechanism for cardiovascular diseases. *FASEB J.* 25: 1718-1728.
- [23] Bell JW, Chen D, Bahls M, Newcomer SC. (2011) Evidence for greater burden of peripheral arterial disease in lower extremity arteries of spinal cord-injured individuals. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301: H766-H772.
- [24] Lenglet S, Mach F, Montecucco F. (2013) Role of matrix metalloproteinase-8 in atherosclerosis. *Mediators Inflamm* 2013: 659282.
- [25] Laxton RC, Hu Y, Duchene J, Zhang F, Zhang Z, et al. (2009) A role of matrix metalloproteinase-8 in atherosclerosis. *Circ Res.* 23; 105: 921-929.
- [26] Tuomainen AM, Nyyssönen K, Laukkanen JA, Tervahartiala T, Tuomainen TP, et al. (2007) Serum matrix metalloproteinase-8 concentrations are associated with cardiovascular outcome in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 2722-2778.
- [27] Ahmed HM, Blaha MJ, Nasir K, Rivera JJ, Blumenthal RS. (2012) Effects of physical activity on cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 109: 288-295.

[28] Thijssen DH, Cable NT, Green DJ. (2012) Impact of exercise training on arterial wall thickness in humans. Clin Sci. 122: 311-322.

[29] Groah SL, Weitzenkamp D, Sett P, Soni B, Savic G. (2001) The relationship between neurological level of injury and symptomatic cardiovascular disease risk in the aging spinal injured. Spinal Cord 39: 310-317.

Table 1. Clinical, laboratory and carotid features of enrolled subjects.

Variable	Able-bodied (n=16)	Sedentary SCI (n=18)	Physically active SCI (n=24)
Age, years	29.6±1.3	32.3±1.8	30.1±1.3
Time of injury, years	—	7.2±1.1	9.3±0.9
Tetraplegic, n (%)	—	8 (44)	12 (50)
Body mass index, kg/m ²	25.1±0.8	23.8±1.0	22.4±0.6*
Systolic blood pressure, mmHg	126.3±3.9	105.3±3.8*	109.8±4.2*
Diastolic blood pressure, mmHg	79.5±2.5	68.3±2.3*	69.6±2.8*
Heart rate, b.p.m.	73.1±2.3	74.6±2.7	66.7±2.5
Glucose, mg/dL	84.6±2.5	84.0±2.3	79.8±1.0
LDL-cholesterol, mg/dL	113.8±7.6	114.6±9.1	101.9±5.5

HDL-cholesterol, mg/dL	43.7±2.2	40.6±1.5	40.3±1.7
Triglycerides, mg/dL	82 (61)	91 (55)	86 (30)
Log C-reactive protein, mg/dL	-0.91±0.16	-0.21±0.18*	-0.66±0.14
Carotid IMT, mm	0.52±0.03	0.68±0.02* [†]	0.57±0.02
Carotid diameter, mm	5.94±0.14	5.28±0.12*	5.69±0.15
Carotid IMT/ diameter, mm	0.087±0.005	0.131±0.006* [†]	0.100±0.004

Legend. SCI – spinal cord injury; LDL – low density lipoprotein; HDL – high density lipoprotein; IMT – intima-media thickness. *p at least<0.05 compared to able-bodied subjects. [†]p<0.05 compared to physically active SCI subjects.

Table 2. Plasmatic levels of OxLDL, MMPs and TIMPs of enrolled subjects

Variable	Able-bodied (n=16)	Sedentary SCI (n=18)	Physically active SCI (n=24)
OxLDL, U/L	32.0±4.8	52.6±4.1* [†]	38.6±2.5
MMP-2, ng/mL	190.4±9.0	181.5±5.1	186.4±5.5
MMP-9, ng/mL	100.7 (100.4)	78.4 (69.8)	75.1 (95.8)
MMP-8, ng/mL	7.73 (8.82)	6.42 (14.25)	6.06 (9.91)
TIMP-1, ng/mL	83.6±6.2	98.3±5.8	94.6±5.2

TIMP-2, ng/mL	109.1±10.7	92.2±3.0	106.2±8.4
MMP-9/TIMP-1 ratio	1.60±0.26	0.99±0.17	1.20±0.18
MMP-2/TIMP-2 ratio	2.01±0.05	1.88±0.08	1.87±0.08
MMP-8/TIMP-1 ratio	0.09 (0.11)	0.08 (0.15)	0.07 (0.10)

Legend. SCI – spinal cord injury; OxLDL – oxidized LDL-cholesterol; MMP – matrix metalloproteinase; TIMP – tissue inhibitor of MMPs. *p at least<0.05 compared to able-bodied subjects. †p at least<0.05 compared to physically active SCI subjects.

Table 3. Bivariate correlation coefficients between OxLDL, MMPs and TIMPs and markers of carotid atherosclerosis in all enrolled SCI subjects (n=42).

Variable	IMT	IMT/diameter
OxLDL	0.47 [†]	0.51 [‡]
MMP-2	-0.10	0.05
MMP-9	0.22	0.11
MMP-8	0.33*	0.35*
TIMP-1	0.10	0.19

TIMP-2	-0.11	-0.11
MMP-9/TIMP-1 ratio	0.21	0.04
MMP-2/TIMP-2 ratio	0.03	0.17
MMP-8/TIMP-1 ratio	0.35*	0.32*

Legend. SCI – spinal cord injury; OxLDL – oxidized LDL-cholesterol; MMP – matrix metalloproteinase; TIMP – tissue inhibitor of MMPs. *p<0.05; †p<0.01; ‡p<0.001.

Table 4. Stepwise regression analyses for carotid intima-media thickness and intima-media thickness/diameter ratio in all enrolled SCI subjects (n=42).

Step	Variable	β	p
<i>Dependent: intima-media thickness (Model 1)</i>			
1	Physical activity (No=0; Yes=1)	-.337	0.029
2	OxLDL	0.317	0.039
<i>Dependent: intima-media thickness/diameter (Model 2)</i>			
1	Physical activity (No=0; Yes=1)	-.393	0.004
2	MMP-8	0.306	0.013

3	OxLDL	0.294	0.028
---	-------	-------	-------

Legend. Model 1 also included MMP-8/TIMP-1 ratio and age, while Model 2 also included age as independent variables. MMP-8/TIMP-1 ratio and MMP-8 were not included in the same model because of high collinearity. OxLDL – oxidized LDL-cholesterol; MMP-8 – matrix metalloproteinase-8; TIMP-1 - tissue inhibitor of metalloproteinases-1.



IV. DISCUSSÃO

IV. DISCUSSÃO

Estudos anteriores relataram aumento da aterosclerose subclínica em indivíduos com LM, independente da variação de fatores de risco tradicionais (MATOS-SOUZA et al, 2009; THIJSEN et al, 2012; MATOS-SOUZA et al, 2010). Curiosamente, a atividade física regular foi associada com a diminuição da espessura íntima-média carotídea em indivíduos com LM, independente da variação nas variáveis hemodinâmicas, metabólicas e inflamatórias (JAE et al, 2008; MATOS-SOUZA et al, 2013) indicando, portanto, que os mecanismos alternativos devem mediar esta associação. No presente estudo foram avaliados indivíduos saudáveis e jovens atletas e sedentários com LM, os quais eram normotensos, não diabéticos, não fumantes normolipêmicos.

Observamos que a espessura íntima-média carotídea e os níveis plasmáticos de LDLox dos pacientes sedentários com LM foram significativamente maiores do que os dos atletas com LM. Além disso, os níveis de LDLox plasmática e a presença de atividade física foram associados de forma independente com a espessura íntima-média carotídea e a razão espessura íntima-média/diâmetro da carótida, enquanto os níveis de MMP-8 também apresentaram associação significativa com a espessura íntima-média/diâmetro da carótida em indivíduos com LM. Em geral, estes resultados fornecem evidência de que a LDLox e a MMP-8 estão relacionados com a aterogênese induzida por LM e ainda sugerem que existe uma interação entre a inatividade física e os níveis de LDLox em indivíduos com LM.

A aterosclerose resulta da combinação de alterações metabólicas, estresse oxidativo, inflamação crônica e suscetibilidade a trombose. Todos esses processos contribuem individualmente ou em conjunto para a expressão clínica da doença cardiovascular (STEINBERG, 2002). Estudos anteriores mostraram que os níveis plasmáticos de LDLox estão relacionados à aterosclerose carotídea e podem ser reduzidos pela atividade física regular (FRALEY et al, 2006; SCHJERVE et al, 2008; VAIDYA et al, 2011). No presente estudo nós mostramos que os níveis de LDLox foram significativamente maiores em indivíduos sedentários com LM quando comparados com os atletas com LM. Segundo MITSUI et al (2012), os níveis de LDLox permanecem inalterados após o exercício agudo em indivíduos com LM. Essa diferença pode ser explicada pelo fato de os atletas com LM do nosso estudo praticarem atividade física de forma crônica e regular. Neste contexto, estudos prévios mostraram que a atividade física regular também se associa a níveis mais baixos de LDLox em indivíduos sem LM (SCHJERVE et al, 2008; COEN et al, 2009). O nível plasmático mais alto de LDLox em sedentários com LM indica que estes podem estar mais expostos ao estresse oxidativo, provavelmente devido a falta de atividade física regular. De fato, diversas evidências têm demonstrado que a inatividade física está relacionada ao aumento do estresse oxidativo e que essas alterações são revertidas pelo exercício físico (LAUF et al, 2005; SAFDAR et al, 2010). Além de apresentarem os níveis de LDLox mais altos, os pacientes sedentários com LM também apresentam espessura íntima-média da carótida e espessura íntima-média/diâmetro maiores. Por outro lado a análise de regressão tipo *stepwise* revelou que a LDLox está associada à aterosclerose em todos os indivíduos com

LM estudados. Notavelmente essa associação foi independente da presença de atividade física. Em geral esses dados indicam que a LDLox desempenha um papel na aterogênese em indivíduos com LM e sugerem que alterações nos níveis de LDLox poderiam contribuir para explicar os efeitos benéficos da atividade física na remodelação vascular induzida por LM. No entanto mais estudos longitudinais são necessários para confirmar essa hipótese.

A oxidação de lipoproteínas ocorre geralmente como consequência do stress oxidativo na parede do vaso gerada por fatores de risco cardiovasculares (FRALEY et al, 2006). No entanto, os mecanismos pelos quais a LDLox foi aumentada em indivíduos sedentários com LM, mas não em atletas com LM não estão claros em nosso estudo. Como abordagem para avaliar esta questão, avaliamos a correlação entre a LDLox e todas as variáveis estudadas entre os indivíduos com LM e observamos que a LDLox se correlacionou apenas com os níveis de MMP-2, mesmo após o ajuste por atividade física. No entanto, acreditamos que esta associação possa não ser um dos principais mecanismos por trás da interação entre LDLox, atividade física e LM, uma vez que a LDLox parece estimular a expressão de MMP-2 (CHEN et al, 2011) e não o oposto. Portanto, parece mais apropriado especular que o aumento dos níveis de MMP-2 pode ser consequência e não causa dos níveis de LDLox maior em indivíduos com LM.

As MMPs desempenham papel importante na progressão da aterosclerose. São enzimas proteolíticas que degradam matriz extracelular e facilitam a migração de células do músculo liso vascular através da lâmina elástica interna, para a íntima, onde proliferam e contribuem para a formação da placa

aterosclerótica (SIASOS et al, 2012). Com base na sua estrutura primária e a especificidade do substrato, as MMPs podem ser classificadas em cinco grupos, entre as quais as collagenases (MMP-1, -8 e -13) e gelatinases (MMP-2 e -9) são conhecidas por desempenhar um papel mais proeminente na aterogênese (SIASOS et al, 2012; BAKER et al, 2002). Um corpo substancial de evidências suporta também a noção de que o desequilíbrio entre a atividade de MMPs e seus inibidores teciduais específicos (TIMPs) contribui para a patogênese da aterosclerose (NEWBY, 2012). A este respeito, não só os níveis circulantes de MMP, mas também a razão entre MMPs/TIMPs têm sido relacionados com a carga de aterosclerose em seres humanos (SIASOS et al, 2012; ROMERO et al, 2008; NEWBY, 2012). No presente estudo, foi avaliada a expressão de uma collagenase (MMP-8) e de gelatinases (MMP-2 e -9) e seus respectivos TIMPs, mas não encontramos diferenças em seus níveis ou razões entre os grupos estudados. No entanto, os resultados da análise bivariada revelaram que a MMP-8 e a razão MMP-8/TIMP-1 se correlacionou com a espessura íntima-média carotídea e a razão espessura íntima-média/diâmetro carotídeo em indivíduos com LM. Além disso, a análise de regressão tipo *stepwise* mostrou uma associação independente entre MMP-8 e a razão espessura íntima-média/diâmetro carotídeo nestes indivíduos. Esta razão tem sido também usada para medir a aterosclerose, mesmo em indivíduos com LM, e é mais representativa de um padrão de remodelação vascular concêntrico (THIJSSSEN et al, 2012b; BELL et al, 2011). Durante a última década, várias linhas de evidência têm proporcionado uma nova visão sobre o papel de MMP-8 na aterosclerose (LENGLET et al, 2013). A MMP-8 está envolvida no processo de remodelação no interior da placa aterosclerótica e

seus níveis têm sido associados com aterosclerose carotídea e coronariana, e foram relatados como sendo um fator de risco independente para eventos cardiovasculares (LENGLET et al, 2013; TUOMAINEN et al, 2007). Os presentes resultados sugerem que a MMP-8 também pode estar relacionada à aterogênese induzida por LM. No entanto, a falta de impacto da atividade física sobre os níveis plasmáticos de MMP-8 e a razão MMP8/TIMP-1 em nossa amostra de indivíduos com LM sugere que as mudanças dos níveis circulantes de MMP-8 não contribuem para explicar os efeitos benéficos da atividade física na remodelação vascular.

A atividade física é constantemente relacionada à redução do risco de doença cardiovascular, à qual tem sido explicada como consequência dos efeitos benéficos do exercício sobre fatores metabólicos, inflamatórios e trombóticos (AHMED et al, 2012). No entanto, não ficam estabelecidos os mecanismos precisos subjacentes aos efeitos do exercício sobre a progressão da aterogênese. Além disso, dados controversos têm sido relatados em relação ao impacto da atividade física sobre as medidas de carga aterosclerótica, como a espessura da parede da artéria carótida e o escore de cálcio coronário (AHMED et al, 2012; THIJSEN et al, 2012b). No presente estudo, através da avaliação de subgrupo muito específico de indivíduos, aqueles com LM, observou-se que a atividade física foi associada a redução da aterosclerose carotídea. Curiosamente, essa variação na carga aterosclerótica não foi explicada por mudanças nos tradicionais fatores de risco, ou seja: metabólica, hemodinâmica e fatores de risco inflamatório, mas em vez disso, foi relacionada a mudanças em fatores alternativos, como lipoproteínas oxidadas. No geral, estas evidências apontam na direção da

necessidade de mais estudos que avaliem o papel da atividade física na patogênese e prevenção da aterosclerose em humanos.

Um aspecto do nosso protocolo que deve ser destacado foram os rigorosos critérios de seleção dos sujeitos da nossa amostra. Foram excluídos indivíduos com obesidade, hiperlipidemias, diabetes mellitus, hipertensão e tabagismo, que são comumente vistos após LM crônica (MYERS et al, 2007) e poderiam ser potenciais fatores de confusão na análise. Além disso, só incluímos indivíduos com LM sem qualquer função motora preservada abaixo do nível da lesão, uma característica que é caracteristicamente associada ao aumento da prevalência de doença cardiovascular (GROAH et al, 2001). No entanto, duas limitações potenciais devem ser reconhecidas. Primeiro, o desenho transversal limita nossa capacidade de inferir uma relação causal entre os níveis de LDLox e MMP-8 e aterosclerose carotídea em indivíduos com LM. Em segundo lugar, a inclusão de doentes do sexo masculino significa que os resultados não podem ainda ser aplicados em pacientes do sexo feminino.

Em conclusão, o presente estudo mostrou que os níveis de LDLox MMP-8 estão associados com aterosclerose carotídea e que há uma interação entre o sedentarismo, a aterosclerose e LDLox em indivíduos com LM. Estes resultados podem contribuir para explicar os mecanismos envolvidos na aterogênese induzida por inatividade física em humanos.

V. CONCLUSÃO

V. CONCLUSÃO

Os níveis plasmáticos de LDLox e MMP-8 estão associados à aterosclerose carotídea em indivíduos com LM e existe uma interação entre LDLox, inatividade física e aterosclerose nesta população. Estes dados podem contribuir para explicar os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de aterosclerose em indivíduos com LM.



VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Ahmed HM, Blaha MJ, Nasir K, Rivera JJ, Blumenthal RS. Effects of physical activity on cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2012;109: 288-95.
- 2) ANDO J, YAMAMOTO K. Vascular mechanobiology – Endothelial cells responses to fluid shear stress. *Circ J* 2009;73:1983-92.
- 3) BAKER AH, EDWARDS DR, MURPHY G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002;115:3719–27.
- 4) BAHIA LUCIANA, AGUIAR JGK, VILLELA NR, BOTINO D, BOUSKELA E. O endotélio na síndrome metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006;50/2:291-303.
- 5) BAUMAN WA, RAZA M, CHAYES Z, MACHAC J. Tomographic thallium-201 myocardial perfusion imaging after intravenous dipyridamole in asymptomatic subjects with quadriplegia. *Arch Phys Med Rehabil* 1993;74:740-4.
- 6) BAUMAN WA, RAZA M, SPUNGEN AM, MACHAC J. Cardiac stress testing with thallium-201 imaging reveals silent ischemia in individuals with paraplegia. *Arch Phys Med Rehabil* 1994;75:946-50.
- 7) BELL JW, CHEN D, BAHLS M, NEWCORNER SC. Evidence for greater burden of peripheral arterial disease in lower extremity arteries of spinal cord-injured individuals. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;301: H766-H72.
- 8) BERLINER JA, NAVAB M, FOGELMAN AM, FRANK JS, DEMER LL, EDWARDS PA, WATSON AD, LUSIS AJ. Atherosclerosis: Basic mechanisms – Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 1995;91:2488-96.

- 9) BLUMER CE, QUINE S. Surveillance of traumatic spinal cord injury in Australia: the identification of information needs. *Spinal Cord* 1996;34:639-43.
- 10) BURR JF, SHEPHARD RJ, ZEHR EP. Physical activity after stroke and spinal cord injury. *Canadian Family Physician – Le Medecin de Famille Canadien* 2012;2:1236-39.
- 11) CAMPOS MF, RIBEIRO AT, LISTIK S, PEREIRA CA, SOBRINHO JA, RAPOPORT A. Epidemiologia do traumatismo da coluna vertebral. *Rev Col Bras Cir* 2008;35:88-93.
- 12) CHEN KC, WANG YS, HU CY, CHANG WC, LIAO YC, DAI CY, JUO SHH. OxLDL up-regulates microRNA-29b, leading to epigenetic modifications of MMP-2/MMP-9 genes: a novel mechanism for cardiovascular diseases. *FASEB J* 2011; 25:1718-28.
- 13) COEN PM, FLYN MG, MARKOFSKI MM, PENCE BD, HANNEMANN RE. Adding exercise training to rosuvastatin treatment: influence on serum lipids and biomarkers of muscle and liver damage. *Metabolism* 2009;58:1030-38.
- 14) DAVIGNON J, GANZ P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004;109:27-32.
- 15) DELFINO HLA. Trauma raquimedular. *Medicina, Ribeirão Preto* 1999;32: 388-400.
- 16) DEMIREL S, DEMIREL G, TÜKEK T, ERK O, YILMAZ H. Risk factors for coronary heart disease in patients with spinal cord injury in Turkey. *Spinal Cord* 2001;39:134-8.

- 17) DESSI M, NOCE A, BERTUCCI P, VILLAHERMOSA SM, ZENOBI R, CASTAGNOLA V, ADESSI E, DI DANIELE N. Atherosclerosis, dyslipidemia, and inflammation: The significant role of polyunsaturated fatty acids. *IRSN Inflammation*. 2013.
- 18) DEVIVO MJ, SHEWCHUK RM, STOVER SL, BLACK KJ, GO BK. A cross-sectional study of the relationship between age and current health status for persons with spinal cord injuries. *Paraplegia* 1992;30:820–7.
- 19) FRALEY AE, TSIMIKAS S. Clinical applications of circulating oxidized low-density lipoprotein biomarkers in cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2006;17: 502-09.
- 20) GALIS ZS, KHATRI JJ. Matrix Metalloproteinases in Vascular Remodeling and Atherogenesis : The Good, the Bad, and the Ugly. *Circ Res* 2002;90:251-62.
- 21) GARSHICK E, KELLEY A, COHEN SA, GARRISON A, TUN CG, GAGNON D, BROWN R. A prospective assessment of mortality in chronic spinal cord injury. *Spinal Cord* 2005;43:408-16.
- 22) GAUBATZ JW, BALLANTYNE CM, WASSERMAN BA, HE M, CHAMBLESS LE, BOERWINKLE E, HOOGEVEEN RC. Association of circulating matrix metalloproteinases with carotid artery characteristics: the atherosclerosis risk in communities carotid MRI study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:1034-42.
- 23) GONÇALVES NF, JACOB-FERREIRA ALB, GOMES VA, CASELLA-FILHO A, CHAGAS ACP, MARCACCINI AM, GERLACH RF, TANUS-SANTOS JE. Avaliação de metaloproteínas e de marcadores inflamatórios em pacientes com síndrome metabólica. *Clinica Chimica Acta* 2009;403:173-7.

- 24) GROAH SL, WEITZENKAMP D, SETT P, SONI B, SAVIC G. The relationship between neurological level of injury and symptomatic cardiovascular disease risk in the aging spinal injured. *Spinal Cord* 2001;39:310-7.
- 25) GUIMARÃES DA, RIZZI E, CERON CS, MARTINS-OLIVEIRA A, GERLACH RF, TANUS-SANTOS JE. Inibição de metaloproteinases da matriz extracelular: uma possível estratégia terapêutica na hipertensão arterial? *Rev Brás Hipertens* 2010;17:226-30.
- 26) ISHIGAKI Y, OKA Y, KATAGIRI H. Circulating oxidized LDL: a biomarker and a pathogenic factor. *Curr Opin Lipidol* 2009;20:363-9.
- 27) JAE SY, HEFFERNAN KS, LEE M, FERNHALL B. Arterial structure and function in physically active persons with spinal cord injury. *J Rehabil Med* 2008;40:535-8.
- 28) KADOGLU NPE, VRABAS IS, SAILER N, KAPELOUZOU A, FOTIADIS G, NOUSSIOUS G, KARAYANNACOS PE, ANGELOPOULOU N. *Diabetes and Metabolism*. 2010;36:144-51.
- 29) LAUFS U, WASSMANN S, CZECH T, MUNZEL T, EISENHAEUER M, BOHM M, NICKENIG G. Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:809-14.
- 30) LEE MY, MYERS J, HAYES A, MADAN S, FROELICHER VF, PERKASH I, KIRATLI BJ. C-reactive protein, metabolic syndrome, and insulin resistance in individuals with spinal cord injury. *J Spinal Cord Med* 2005;28:20-5.
- 31) LEUNG FP, YUNG LM, LAHER I, YAO X, CHEN ZY, HUANG Y. Exercise, vascular wall and cardiovascular diseases: an update (Part 1). *Sports Med* 2008;38:1009–24.

- 32) LENGLET S, MACH F, MONTECUCCO F. Role of matrix metalloproteinase-8 in atherosclerosis. *Mediators Inflamm* 2013: 659282.
- 33) LEVI R, HULTLING C, SEIGER A. The Stockholm Spinal Cord Injury Study: 2. Associations between clinical patient characteristics and post-acute medical problems. *Paraplegia* 1995;33:585-94.
- 34) LIBBY P, RIDKER PM, MASERI A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135-43.
- 35) MATOS-SOUZA JR, PITHON KR, OZAHATA TM, GEMIGNANI T, CLIQUET A JR, NADRUZ W JR. Carotid intima-media thickness is increased in patients with spinal cord injury independent of traditional cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis* 2009;202:29-31.
- 36) MATOS-SOUZA JR, PITHON KR, OZAHATA TM, OLIVEIRA RT, TÉO FH, BLOTTA MH, CLIQUET A JR, NADRUZ W JR. Subclinical atherosclerosis is related to injury level but not to inflammatory parameters in spinal cord injury subjects. *Spinal Cord* 2010;48:740-4.
- 37) MATOS-SOUZA JR, PITHON KR, OLIVEIRA RT, TÉO FH, BLOTTA MH, CLIQUET A JR, NADRUZ W JR. Altered left ventricular diastolic function in spinal cord injury subjects. *Spinal Cord* 2011;49:65-9.
- 38) MATOS-SOUZA JR, SILVA AA, CAMPOS LF, GOULART D, SCHREIBER R, DE ROSSI G, PIO-MAGALHÃES JA, ETCHEBEHERE M, GORLA JI, CLIQUET A JR, NADRUZ W JR. Physical activity is associated with improved subclinical atherosclerosis in spinal cord injury subjects independent of variation in traditional risk factors. *Int J Cardiol* 2013;167:592-3.

- 39) MAYNARD FM JR, BRACKEN MB, CREASEY G, DITUNNO JF JR, DONOVAN WH, DUCKER TB, GARBER SL, MARINO RJ, STOVER SL, TATOR CH, WATERS RL, MYERS J, LEE M, KIRATLI J. Cardiovascular disease in spinal cord injury: an overview of prevalence, risk, evaluation, and management. *Am J Phys Med Rehabil* 2007;86:142-52.
- 40) MITSUI T, NAKAMURA T, ITO T, UMEMOTO Y, SAKAMOTO K, KINOSHITA T, NAKAGAWA M, TAJIMA F. Exercise significantly increases plasma adrenaline and oxidized low-density lipoprotein in normal healthy subjects but not in persons with spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 2012;93: 725-727.
- 41) MYERS J, LEE M, KIRATLI J. Cardiovascular disease in spinal cord injury: an overview of prevalence, risk, evaluation, and management. *Am J Phys Med Rehabil* 2007;86:142-52.
- 42) NATIONAL SPINAL CORD INJURY STATISTICAL CENTER. Spinal cord injury: facts and figures at a glance. <http://www.spinalcord.uab.edu/show.asp?durki=116979>
- 43) NEWBY AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Re.* 2005;85:1-31.
- 44) NEWBY AC. Matrix metalloproteinase inhibition therapy for vascular diseases. *Vascular Pharmacology* 2012;56:232-44.
- 45) ORAKZAI SH, ORAKZAI RH, AHMADI N, AGRAWAL N, BAUMAN WA, YEE F, ADKINS RH, WATERS RL, BUDOFF MJ. Measurement of coronary artery calcification by electron beam computerized tomography in persons with chronic spinal cord injury: evidence for increased atherosclerotic burden. *Spinal Cord* 2007;45:775-9.

- 46) PHILLIPS WT, KIRATLI BJ, SARKARATI M, WERAARCHAKUL G, MYERS J, FRANKLIN BA, PARKASH I, FROELICHER V. Effect of spinal cord injury on the heart and cardiovascular fitness. *Curr Probl Cardiol* 1988;23:641–720.
- 47) PODREZ EA, ABU-SOUD HM, HAZEN SL. Myeloperoxidase generated oxidants and atherosclerosis. *Free Rad Biol & Med* 2000;28:1717-25.
- 48) ROMERO JR, VASAN RS, BEISER AS, POLAK JF, BENJAMIM EJ, WOLF PA, SESHADRI S. Association of Carotid Artery Atherosclerosis With Circulating Biomarkers of Extracellular Matrix Remodeling: The Framingham Offspring Study. *J Stroke and Cerebrovascular Diseases* 2008;17:412-17.
- 49) SAFDAR A, HAMADEH MJ, KACZOR JJ, RAHA S, DEBEER J, TARNOPOLSKY MA. Aberrant mitochondrial homeostasis in the skeletal muscle of sedentary older adults. *PLoS One* 2010;5: e10778.
- 50) SCHJERVE IE, TYLDUM GA, TJONNA AE, STOLEN T, LENNECHEN JP, HANSEN HEM, HARAM PER M, HENRICH G, BYE A, NAJJAR SM, SMITH GL, SLORDAHL AS, KEMI OJ, WISLOFF U. Both aerobic endurance and strength training programmes improve cardiovascular health in obese adults. *Clinical Science* 2008;115:283-93.
- 51) SIASOS G, TOUSOULIS D, KIOUFIS S, OIKONOMOU E, SIASOU Z, LIMPERI M, PAPAVALASSILIOU AG, STEFANADIS C. Inflammatory mechanisms in atherosclerosis: the impact of matrix metalloproteinases. *Curr Top Med Chem* 2012;12(10):1132-48.
- 52) STAAS WE, FORMAL CS, FREEDMAN MK, FRIED GW, READ ME. Lesões medulares e tratamento médico nas lesões medulares. São Paulo: 2002,1325-59.

- 53) STEINBERG D. Atherogenesis in perspective: hipercholeresterolemia and inflammation as partners in crime. *Nature Medicine* 2002;8:1211-17.
- 54) THIJSSSEN DH, CABLE NT, GREEN DJ. Impact of exercise training on arterial wall thickness in humans. *Clin Sci* 2012;122: 311-22.
- 55) THIJSSSEN DH, DE GROOT PC, VAN DEN BOGERD A, VELTMEIJER M, CABLE NT, Time course of arterial remodelling in diameter and wall thickness above and below the lesion after a spinal cord injury. *Eur J Appl Physiol* 2012b; 112: 4103-9.
- 56) TUOMAINEN AM, NYSSONEN K, LAUKKANEN JA, TERVAHARTIALA T, TUOMAINEN TP, SALONEN JT, SORSA T, PUSSINEN PJ. Serum matrix metalloproteinase-8 concentrations are associated with cardiovascular outcome in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27: 2722-78.
- 57) VAIDYA D, SZKLO M, CUSHMAN M, HOLVOET P, POLAK J, BAHRAMI H, JENNY NS, OUYANG P. Association of endothelial and oxidative stress with metabolic syndrome and subclinical atherosclerosis: multi-ethnic study of atherosclerosis. *Eur J Clin Nutr* 2011;65: 818-25.
- 58) VAN DEN BERG M, CASTELLOTE J, DE PEDRO J, MAHILLO I. Survival following spinal cord injury: a systematic review. *J Neurotrauma* 2010;27:1517-28.
- 59) VAN DUIJNHOFEN N, HESSE E, JANSSEN T, WODZIG W, SCHEFFER P, HOPMAN M. Impact of exercise training on oxidative stress in individuals with a spinal cord injury. *Eur J Appl Physiol* 2010;109:1059-66.
- 60) VISSE R, NAGASE H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. *Circ Res* 2003;92:827-39.

- 61) YEKUTIEL M, BROOKS ME, OHRY A, YAROM J, CAREL R. The prevalence of hypertension, ischemic heart disease, and diabetes in traumatic spinal cord injured patients and amputees. *Paraplegia* 1989;27:58–62
- 62) YEO JD, WALSH J, RUTKOWSKI S, SODEN R, CRAVEN M, MIDDLETON J. Mortality following spinal cord injury. *Spinal Cord* 1998;36:329-36.

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jul 11, 2014

This is a License Agreement between Wilson Nadruz Jr. ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	Wilson Nadruz Jr.
Customer address	Department of Internal Medicine Campinas, SP 13081-970
License number	3424201165528
License date	Jul 08, 2014
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Atherosclerosis
Licensed content title	Oxidized low-density lipoprotein, matrix-metalloproteinase-8 and carotid atherosclerosis in spinal cord injured subjects
Licensed content author	Layde R. Paim, Roberto Schreiber, José R. Matos-Souza, Anselmo A. Silva, Luis F. Campos, Eliza R. Azevedo, Karina Alonso, Guilherme de Rossi, Maurício Etchebehere, José I. Gorla, Alberto Clquet, Wilson Nadruz
Licensed content date	December 2013
Licensed content volume number	231
Licensed content issue number	2
Number of pages	5
Start Page	341
End Page	345
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article

Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	Portuguese English
Title of your thesis/dissertation	Mecanismos envolvidos no aumento do risco cardiovascular em indivíduos portadores de lesão da medula espinhal
Expected completion date	Jul 2014
Estimated size (number of pages)	65
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Permissions price	0.00 USD
VAT/Local Sales Tax	0.00 USD / 0.00 GBP
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your

publication, as follows:

“Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER].” Also Lancet special credit - “Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier.”

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at permissions@elsevier.com)

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article. If this license is to re-use 1 or 2 figures then permission is granted for non-exclusive world rights in all languages.

16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the

Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com> . All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

For journal authors: the following clauses are applicable in addition to the above: Permission granted is limited to the author accepted manuscript version* of your paper.

***Accepted Author Manuscript (AAM) Definition:** An accepted author manuscript (AAM) is the author's version of the manuscript of an article that has been accepted for publication and which may include any author-incorporated changes suggested through the processes of submission processing, peer review, and editor-author communications. AAMs do not include other publisher value-added contributions such as copy-editing, formatting, technical enhancements and (if relevant) pagination.

You are not allowed to download and post the published journal article (whether PDF or HTML, proof or final version), nor may you scan the printed edition to create an electronic version. A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx>. As part of our normal production process, you will receive an e-mail notice when your article appears on Elsevier's online service ScienceDirect (www.sciencedirect.com). That e-mail will include the article's Digital Object Identifier (DOI). This number provides the electronic link to the published article and should be included in the posting of your personal version. We ask that you wait until you receive this e-mail and have the DOI to do any posting.

Posting to a repository: Authors may post their AAM immediately to their employer's institutional repository for internal use only and may make their manuscript publically available after the journal-specific embargo period has ended.

Please also refer to [Elsevier's Article Posting Policy](#) for further information.

18. For book authors the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only.. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

20. Thesis/Dissertation: If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include

permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

Elsevier publishes Open Access articles in both its Open Access journals and via its Open Access articles option in subscription journals.

Authors publishing in an Open Access journal or who choose to make their article Open Access in an Elsevier subscription journal select one of the following Creative Commons user licenses, which define how a reader may reuse their work: Creative Commons Attribution License (CC BY), Creative Commons Attribution – Non Commercial - ShareAlike (CC BY NC SA) and Creative Commons Attribution – Non Commercial – No Derivatives (CC BY NC ND)

Terms & Conditions applicable to all Elsevier Open Access articles:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation.

The author(s) must be appropriately credited.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: You may distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, including for commercial purposes without permission from Elsevier

CC BY NC SA: For non-commercial purposes you may distribute and copy the article, create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article and license new adaptations or creations under identical terms without permission from Elsevier

CC BY NC ND: For non-commercial purposes you may distribute and copy the article

and include it in a collective work (such as an anthology), provided you do not alter or modify the article, without permission from Elsevier

Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Promotional purposes (advertising or marketing)
- Commercial exploitation (e.g. a product for sale or loan)
- Systematic distribution (for a fee or free of charge)

Please refer to [Elsevier's Open Access Policy](#) for further information.

21. Other Conditions:

v1.7

If you would like to pay for this license now, please remit this license along with your payment made payable to "COPYRIGHT CLEARANCE CENTER" otherwise you will be invoiced within 48 hours of the license date. Payment should be in the form of a check or money order referencing your account number and this invoice number 501346243.

Once you receive your invoice for this order, you may pay your invoice by credit card. Please follow instructions provided at that time.

Make Payment To:
Copyright Clearance Center
Dept 001
P.O. Box 843006
Boston, MA 02284-3006

For suggestions or comments regarding this order, contact RightsLink Customer Support: customercare@copyright.com or +1-877-622-5543 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.