

ANGÉLICA HERINGER DE REZENDE

**AVALIAÇÃO DO USO DO ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO E
DA VITAMINA E NA PROGRESSÃO DA ATEROSCLEROSE EM
CAMUNDONGOS *KNOCKOUT* PARA O RECEPTOR DE LDL**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciência da Nutrição, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

ANGÉLICA HERINGER DE REZENDE

**AVALIAÇÃO DO USO DO ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO E
DA VITAMINA E NA PROGRESSÃO DA ATEROSCLEROSE EM
CAMUNDONGOS *KNOCKOUT* PARA O RECEPTOR DE LDL**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciência da Nutrição, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

Aprovada: 20 de julho de 2007

Prof^ª. Maria do Carmo Gouveia Peluzio
(Co-orientadora)

Prof. Sérgio Oliveira de Paula
(Co-orientador)

Prof^ª. Maria Beatriz Abreu Glória

Prof. Clóvis Andrade Neves

Prof^ª. Céphora Maria Sabarense
(Orientadora)

À minha mãe, exemplo de força.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tornar tudo possível.

À Universidade Federal de Viçosa, especialmente aos professores e funcionários do Departamento de Nutrição e Saúde.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À Prof^a. Céphora, por acreditar e confiar em mim, até mais que eu mesma. O seu incentivo e amizade foram fundamentais em todas as etapas do meu aprendizado.

À Prof^a. Carminha, pelas inestimáveis contribuições na realização deste trabalho e no meu crescimento profissional.

Ao Prof. Sérgio, pela atenção e pelos conhecimentos compartilhados.

Ao Prof. Clóvis, pela disponibilidade e pela contribuição valiosa nas análises histológicas e morfométricas.

Aos colegas dos Laboratórios de Bioquímica Nutricional, Análise de Alimentos, Nutrição Experimental e Análise de Vitaminas: Maria Carol, Nilma, Vanessa, Luiza, Luiz Fernando, Luana, Fernanda, Mariane, Vânia, Monise, Pollyanna, Michele Netto, Paloma e Rodrigo, pelas contribuições e pela convivência.

À Déborah, Júlia e Tatiana, pela dedicação nas horas “oficiais” de trabalho e nas inúmeras horas extras. Obrigada por me ajudarem a concretizar este trabalho.

À Solange, minha mãe de Viçosa, pelos momentos de descontração, pelos conselhos e pela amizade.

Ao Arnaldo, Clarice, Aline, Marina Maria, Damiana, Poliana e Tati Coura, com os quais eu sempre pude contar. Sem vocês seria muito mais difícil chegar até aqui.

À minha mãe, Eugenia, e às minhas irmãs, Lígia e Larissa, pelo amor e pela dedicação.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Angélica Heringer de Rezende, filha de Roberto da Silva Rezende e de Eugenia Inez Heringer Rezende, nasceu em 05 de fevereiro de 1980, na cidade de Caratinga, Minas Gerais.

Em abril de 2001 iniciou o Curso de Graduação em Nutrição, na Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em julho de 2005.

Em agosto de 2005, iniciou o curso de mestrado, no Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, do Departamento de Nutrição e Saúde, concluindo-o em julho de 2007.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE QUADROS E TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Aterosclerose	3
2.2 Camundongos <i>knockout</i> para o receptor de LDL como modelo experimental	6
2.3 Ácido linoléico conjugado	7
2.3.1 Definição e fontes dietéticas	7
2.3.2 Consumo	9
2.3.3 Efeitos do CLA na aterosclerose	10
2.4 Vitamina E	12
2.4.1 Definição e fontes dietéticas	12
2.4.2 Efeitos da vitamina E na aterosclerose	13
3 OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo Geral	16
3.2 Objetivos Específicos	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1 Animais	17
4.2. Delineamento Experimental	17
4.3 Dietas	19
4.4 Análise dos Lipídios	20
4.4.1 Extração dos Lipídios	20
4.4.2 Identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos	20
4.5 Determinação do colesterol sérico, hepático e fecal	21
4.6 Avaliação da peroxidação lipídica	21
4.7 Determinação do α -tocoferol	22
4.8 Análise morfométrica	23
4.9 Análise estatística	23

5 ARTIGO DE REVISÃO: Os isômeros do CLA são agentes antiaterogênicos?	
Evidências sobre o desenvolvimento e regressão das lesões	24
5.1 Introdução	25
5.2 Isômeros do CLA e aterogênese	26
5.3 Isômeros do CLA e regressão da aterosclerose	27
5.4 Mecanismos bioquímicos prováveis	28
5.5 Os isômeros do CLA podem ser considerados agentes antiaterogênicos?.....	30
6 ARTIGO ORIGINAL I: Vitamina E, mas não o ácido linoléico conjugado, reduz a progressão da aterosclerose em camundongos LDLR -/- com lesão pré-estabelecida	33
6.1 Introdução	34
6.2 Materiais e Métodos.....	35
6.2.1 Animais e dietas	35
6.2.2 Concentração dos lipídios séricos	37
6.2.3 Concentração do colesterol hepático e fecal	37
6.2.4 Determinação do α -tocoferol	37
6.2.5 Análise Morfométrica	38
6.2.6 Análise estatística	38
6.3 Resultados e Discussão	39
6.3.1 Peso dos animais	39
6.3.2 Colesterol	39
6.3.3 Concentrações de α -tocoferol	43
6.3.4 Aterogênese	45
6.4 Conclusões	53
7 ARTIGO ORIGINAL II: Perfil de ácidos graxos teciduais não é alterado pelo consumo de 10 <i>t</i> ,12 <i>c</i> -CLA e/ou de vitamina E em camundongos LDLR -/-	54
7.1 Introdução	55
7.2 Materiais e Métodos.....	56
7.2.1 Animais e dietas	56
7.2.2 Avaliação da peroxidação lipídica	57
7.2.3 Análise dos lipídios	57
7.2.3.1 Extração dos lipídios	57
7.2.3.2 Identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos ..	57

7.2.4 Análise estatística	58
7.3 Resultados e Discussão	58
7.3.1 Ganho de peso e consumo alimentar	58
7.3.2 Hidroperóxidos hepáticos	60
7.3.3 Perfil de ácidos graxos teciduais	61
7.3.3.1 Perfil de ácidos graxos do fígado	66
7.3.3.2 Perfil de ácidos graxos do tecido adiposo peri-renal	68
7.3.3.3 Perfil de ácidos graxos do intestino.....	70
7.4 Conclusões	73
8 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	73
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 2.1 – Estruturas das ligações duplas dieno-conjugadas e metileno interrompidas.....	7
Figura 2.2 – Representação do ácido linoléico e de três dos seus isômeros conjugados.....	8
Figura 2.3 – Estrutura química do α -tocoferol.....	12
Figura 4.1 – Desenho experimental.....	18
Figura 6.1 – Concentrações hepáticas de colesterol dos grupos controles e experimentais.....	42
Figura 6.2 – Concentrações de α -tocoferol hepático dos grupos controles e experimentais.....	44
Figura 6.3 – Concentração fecal de α -tocoferol, nas fases de indução e de tratamento, dos grupos controles e experimentais.....	45
Figura 6.4 – Avaliação morfométrica da maior lesão aterosclerótica de camundongos LDLR -/-.....	48
Figura 6.5 – Percentual de obstrução da aorta de camundongos LDLR -/-	49
Figura 6.6 – Histologia da aorta proximal de camundongos LDLR -/-.....	50
Figura 6.7 – Aspecto histológico da aorta proximal de camundongos LDLR -/-	51
Figura 6.8 – Histologia da aorta proximal de camundongos LDLR -/-, após oito semanas de tratamento com CLA e/ou com vitamina E.....	52
Figura 7.1 – Evolução do peso dos animais dos grupos controles e experimentais.....	59
Figura 7.2 – Concentração hepática de hidroperóxidos lipídicos dos grupos controles e experimentais.....	61
Figura 7.3 – Proporção de ácidos graxos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) e poliinsaturados (AGPI) em diferentes órgãos e tecidos.....	65

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Pag.
Quadro 5.1 – Efeitos dos isômeros do CLA na aterosclerose experimental.....	32
Tabela 4.1 – Composição das dietas experimentais (%)	19
Tabela 6.1 – Composição da dieta controle (semipurificada).....	36
Tabela 6.2 – Composição da dieta de indução (aterogênica).....	36
Tabela 6.3 – Peso corporal (g) e perfil de lipídios séricos (mg/gdL) dos animais dos grupos controles e experimentais.....	40
Tabela 6.4 – Concentração de colesterol fecal (mg/g) dos grupos controles e experimentais, nas fases de indução (FI) e de tratamento (FT).....	43
Tabela 7.1 – Peso corporal e consumo alimentar dos animais dos grupos controles e experimentais.....	59
Tabela 7.2 – Perfil de ácidos graxos das dietas controles e experimentais.....	62
Tabela 7.3 – Perfil de ácidos graxos do fígado dos grupos controles e experimentais.....	67
Tabela 7.4 – Perfil de ácidos graxos do tecido adiposo dos grupos controles e experimentais.....	69
Tabela 7.5 – Perfil de ácidos graxos do intestino dos grupos controles e experimentais.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Σ	Somatório
AG	Ácido graxo
AGMI	Ácido graxo monoinsaturado
AGPI	Ácido graxo poliinsaturado
AGS	Ácido graxo saturado
Ag+-HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, utilizando coluna impregnada com nitrato de prata.
ApoB-100	Apolipoproteína B-100
ApoE -/-	Deficiência de apolipoproteína E
BHT	Butil Hidroxitolueno
CEA	Coefficiente de Eficácia Alimentar
CEA _{AL}	Coefficiente de Eficácia Alimentar aparente dos lipídios
CG	Cromatografia gasosa
CLA	Ácido linoléico conjugado
COX	Ciclooxigenase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HepG2	Células de carcinoma hepatocelular, <i>Homo sapiens</i> .
HOO•	Radical perhidroxil
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ICAM-1	Molécula-1 de adesão intercelular
IFN	Interferon
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase indutível
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-MM	LDL minimamente oxidada
LDL-OX	LDL oxidada
LDLR -/-	Deficiência de receptores de LDL

MCP-1	Proteína-1 quimiotática para monócitos
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos
NF-κB	Fator nuclear κB
PAF	Fator ativador de plaquetas
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PGE	Prostaglandina E
PPAR	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
VCAM-1	Molécula-1 de adesão da célula vascular
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

RESUMO

REZENDE, Angélica Heringer. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, julho de 2007.

Avaliação do uso do ácido linoléico conjugado e da vitamina E na progressão da aterosclerose em camundongos *knockout* para o receptor de LDL.

Orientadora: Céphora Maria Sabarense. Co-orientadores: Maria do Carmo Gouveia Peluzio, Sérgio Oliveira de Paula e Cristina Maria Ganns Chaves Dias.

Este estudo teve o objetivo de avaliar os efeitos da suplementação com CLA e/ou com vitamina E na progressão da aterosclerose e no perfil de ácidos graxos teciduais de camundongos LDLR $-/-$, um modelo para hipercolesterolemia familiar. Os animais foram alimentados com dieta semipurificada (CT) ou com dieta aterogênica (AT), durante seis semanas. Após este período, um grupo sofreu eutanásia para avaliação do grau de desenvolvimento da aterosclerose e os outros animais foram alimentados por oito semanas com dieta semipurificada suplementada com 1% de vitamina E (TOC), 1% de 10*t*,12*c*-CLA (CLA) ou com 1% de vitamina E + 1% de 10*t*,12*c*-CLA (CLA/TOC). O peso dos animais foi monitorado semanalmente e o consumo alimentar diariamente. O perfil de lipídios séricos foi determinado, bem como as concentrações de α -tocoferol e de colesterol no fígado e nas fezes. A peroxidação lipídica no fígado foi determinada pela análise de hidroperóxidos. Os perfis de ácidos graxos do fígado, tecido adiposo e intestino delgado foram analisados por cromatografia gasosa. Avaliou-se a área total da lesão aterosclerótica e o percentual de obstrução da aorta dos diferentes grupos experimentais. As concentrações séricas de colesterol total, de LDL e de triacilgliceróis foram menores nos grupos suplementados com vitamina E. Nestes grupos, a excreção de colesterol foi maior que nos demais e também foram observadas as maiores concentrações hepáticas de α -tocoferol. Por outro lado, no grupo suplementado com vitamina E foi encontrado o maior grau de peroxidação dos lipídios hepáticos. Os perfis de ácidos graxos dos tecidos refletiram a composição de ácidos graxos das dietas. Entretanto, em nenhum dos tecidos analisados foi possível identificar a incorporação do 10*t*,12*c*-CLA. Aparentemente, o CLA não foi detectado em função da sua rápida metabolização. Em todos os grupos experimentais, os percentuais de ácidos graxos poliinsaturados no tecido adiposo e no intestino, foram maiores em relação ao grupo CT. A utilização isolada do isômero 10*t*,12*c*-CLA não impediu o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas na aorta. Por outro lado, a suplementação dietética com vitamina E, assim como a associação de vitamina E e 10*t*,12*c*-CLA, reduziram significativamente a área total da lesão e o percentual de obstrução da aorta. Demonstrando, assim, a melhor ação da vitamina E que do 10*t*,12*c*-CLA em reduzir a progressão da aterosclerose, a despeito da sua ação antioxidante.

ABSTRACT

REZENDE, Angélica Heringer. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, July, 2007.
Assessment of use of conjugated linoleic acid and vitamin E in the atherosclerosis progression in LDL-receptor *knockout* mice. Adviser: Céphora Maria Sabarense. Co-advisers: Maria do Carmo Gouveia Peluzio, Sérgio Oliveira de Paula and Cristina Maria Ganns Chaves Dias.

This study aimed to evaluate the effects of CLA and/or vitamin E supplementation in the progression of atherosclerosis and in the fatty acids profile of tissues of LDLR $-/-$ mice, a model for familial hypercholesterolemia. The animals were fed with a semi purified diet (CT) or with an atherogenic diet (AT), during six weeks. After this period, in order to evaluating the atherosclerosis development degree, a group of animals was euthanized. The other animals were fed during eight weeks later with a semi purified diet supplemented with 1% of vitamin E (TOC), 1% of 10*t*,12*c*-CLA (CLA) or with 1% of vitamin E + 1% of 10*t*,12*c*-CLA (CLA/TOC). The weight and the diet consumption were monitored weekly and daily, respectively. Fatty acid serum profile was determined, as well as liver and feces concentrations of α -tocopherol and cholesterol. Peroxidation in liver was evaluated by hydroperoxides analysis. The fatty acids profiles of the liver, adipose tissue and small intestine were analyzed by gas chromatography. The total area of the atherosclerotic lesion and the aorta obstruction percentile were estimated. Serum lipids profile showed total cholesterol, LDL and triacylglycerols smaller concentrations in the supplemented with vitamin E groups. In these groups the cholesterol excretion and the hepatic α -tocopherol concentrations were larger than in others. However, in the group that received with vitamin E only, was found the biggest degree of hepatic lipids peroxidation. The fatty acids profiles of tissues reflected the dietary fatty acids composition. Although, in none tissues analyzed was possible to identify the incorporation of 10*t*,12*c*-CLA. Probably the CLA was not detected due to its rapidly metabolization. In all of the experimental groups, the polyunsaturated fatty acids percentage in the adipose tissue and intestine was larger than in CT group. The use of 10*t*,12*c*-CLA isomer individually did not impede the atherosclerotic lesions development in the aorta. On the other hand, the dietary supplementation with vitamin E, as well as the vitamin E and 10*t*,12*c*-CLA association significantly reduced the total area of the atherosclerotic lesion and the aorta obstruction percentile. Showing the better action of vitamin E than 10*t*,12*c*-CLA in reduce the atherosclerosis progression, despite their antioxidant effect.

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares secundárias à aterosclerose têm elevado substancialmente as taxas de morbidade e mortalidade, principalmente nos países em desenvolvimento, como o Brasil (DEPARTAMENTO DE ATEROSCLEROSE DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007).

Alguns componentes do estilo de vida, particularmente a dieta, têm mostrado relação direta com os fatores de risco cardiovasculares (HAMER e STEPTOE, 2006). A promoção do consumo de nutrientes específicos, provenientes de fontes naturais ou de suplementos, tem recebido considerável atenção. Neste sentido, têm-se relacionado os benefícios de alguns compostos como, por exemplo, determinados ácidos graxos e antioxidantes da dieta, nos fatores de risco cardiovasculares.

Estudos sobre o consumo de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados, particularmente, do ácido oléico (ODA et al., 2005), dos ácidos graxos da família ômega-3 (ODA et al., 2005; ERKKILÄ et al., 2006) e dos ácidos linoléicos conjugados (LOCK et al., 2005; VALEILLE et al., 2006), têm demonstrado o efeito protetor destes nutrientes no desenvolvimento das doenças cardiovasculares, uma vez que a fonte e a natureza dos ácidos graxos são importantes determinantes dos seus efeitos sobre a saúde. Estes ácidos graxos são capazes de formar lipoproteínas com menor suscetibilidade à oxidação.

Por outro lado, a utilização de flavonóides (KAPLAN et al., 2001) e de compostos vitamínicos (ZUREIK et al., 2004), como o β -caroteno (LEVY et al., 2000), o ácido ascórbico (WANNAMETHEE et al., 2006) e o α -tocoferol (IANNUZZI et al., 2002; OTERO et al., 2005), também tem se mostrado eficaz em melhorar a saúde cardiovascular, devido à sua capacidade antioxidante.

Dentre os agentes antioxidantes, os resultados da ação do α -tocoferol ainda são controversos, o que sugere a necessidade de se ter um consenso quanto à quantidade deste composto a ser suplementada, considerando a elevada perda pelas fezes e a possibilidade de haver uma relação inversamente proporcional entre a quantidade consumida e o percentual absorvido (LOSOWSKY et al., 1972), que seja capaz de atuar benéficamente sobre os fatores de risco das doenças cardiovasculares.

O interesse pelo consumo de alimentos de origem animal, com alto conteúdo de gorduras saturadas, tem diminuído devido às recomendações de redução da ingestão destes nutrientes, como forma de prevenir o desenvolvimento das doenças

cardiovasculares. Neste cenário de redução do consumo da gordura de origem animal, os resultados de vários estudos experimentais têm divulgado o papel dos ácidos linoléicos conjugados como potentes agentes antiaterogênicos. Desta forma, surge uma grande expectativa de estimular o consumo dos produtos derivados de ruminantes, já que estes são fontes naturais destes ácidos graxos (BESSA et al., 2000).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007). Ela se manifesta clinicamente através das doenças cardiovasculares, que compreendem as doenças cardíacas e as doenças cerebrovasculares.

As duas principais hipóteses sobre o início do processo aterogênico são a hipótese da resposta à injúria e a hipótese oxidativa. Segundo a hipótese da resposta a injúria, proposta por ROSS e GLOMSET (1973), a interrupção da função endotelial estimula uma série de eventos celulares e vasculares que levam a resposta inflamatória e finalmente à lesão aterosclerótica.

Já a hipótese oxidativa sugere que o processo aterosclerótico possa ser iniciado por danos no endotélio vascular, produzidos por modificações oxidativas das partículas de LDL, o que aumenta sua captação por macrófagos da parede arterial (STEINBERG et al., 1989).

Estas hipóteses divergem sobre qual seria o evento primário na gênese da aterosclerose, porém consideram a ocorrência concomitante de reações oxidativas e inflamatórias no desenvolvimento desta doença.

Antes de serem completamente oxidadas, as partículas de LDL precisam sofrer algumas modificações. Inicialmente, as LDL nativas contêm apoB-100 e são ricas em ácidos graxos poliinsaturados e antioxidantes. Quando se tornam minimamente oxidadas (LDL-MM), estas partículas apresentam os fosfolipídios oxidados na sua superfície (PARTHASARATHY et al., 1999).

Nesta fase, metade das moléculas de apoB-100 ainda estão intactas, mas as LDL já perderam ácidos graxos poliinsaturados e compostos antioxidantes. Desta forma, as LDL não são reconhecidas pelos receptores *scavengers* dos macrófagos, embora elas ainda sejam reconhecidas pelos receptores de LDL nativa (MASHIMA et al., 2001).

As LDL-MM podem induzir a expressão de MCP-1 e de M-CSF pelas células endoteliais e iniciar o recrutamento de monócitos para a parede arterial, promovendo a diferenciação dos monócitos em macrófagos (VILLA-COLINAYO et al., 2000).

A oxidação adicional das LDL-MM, leva a modificações nas moléculas de apoB-100, gerando produtos do catabolismo dos peróxidos lipídicos, como os aldeídos.

Estes produtos interagem com os resíduos de lisina das apoB-100, tornando-as negativamente carregadas, o que resulta em uma menor afinidade pelos receptores de LDL nativas e em um aumento da afinidade pelos receptores *scavengers* (BROWN e GOLDSTEIN, 1983).

As partículas de LDL completamente oxidadas (LDL-OX) ativam as células endoteliais, que respondem com a expressão de moléculas de adesão, como a VCAM-1 e ICAM-1, além de MCP-1, que acentua a já iniciada entrada de monócitos na parede arterial e sua diferenciação em macrófagos pela ação do M-CSF (TAKEI et al., 2001).

As LDL-OX são reconhecidas por receptores *scavengers*, cuja expressão é regulada pelo aumento da concentração de colesterol nos macrófagos. A interação de LDL-OX com os receptores *scavengers* resulta na rápida captação da lipoproteína pelas células musculares lisas e macrófagos. A LDL-OX é degradada intracelularmente, o colesterol livre é esterificado e em seguida armazenado, conferindo às células o aspecto de espuma (HAKALA et al., 2003; OSTERUD e BJORKLID, 2003).

O acúmulo de lipídios na parede arterial induzirá a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos. Estas citocinas irão promover o recrutamento de monócitos e o acúmulo de células espumosas (*foam cells*), que são os tipos celulares mais comuns nas estrias gordurosas (OSTERUD e BJORKLID, 2003). Este círculo vicioso de oxidação, modificação das lipoproteínas e inflamação é mantido pela presença de LDL-OX nas artérias.

A formação e acúmulo de células espumosas caracterizam a estria gordurosa, e contribuem ainda para o aumento do tamanho da lesão, que pode progredir para uma lesão intermediária e finalmente para uma lesão complexa (FERREIRA et al., 2007).

Em resumo, a mudança da lesão precoce ou estria gordurosa para a lesão avançada envolve três processos celulares fundamentais (LUSIS, 2000):

- 1) entrada contínua de monócitos/macrófagos para o espaço subendotelial e proliferação de macrófagos, células musculares lisas e possivelmente linfócitos;
- 2) formação de uma extensa matriz de tecido conjuntivo fibroso e o acúmulo de células musculares lisas e
- 3) acúmulo de lipídeos, principalmente na forma de colesterol livre e, em menor proporção, colesterol esterificado, dentro dos macrófagos e células musculares lisas.

Tais processos apresentam características morfológicas específicas, que diferenciam os estágios de desenvolvimento das lesões.

Baseados nas descrições morfológicas, VIRMANI et al. (2000), propuseram uma classificação simplificada do desenvolvimento das lesões ateroscleróticas. As etapas do desenvolvimento dessa lesão seriam representadas em sete categorias:

1) **espessamento intimal**, descrito como acúmulo normal de células musculares lisas na íntima com ausência de lipídeos ou células espumosas;

2) **xantoma intimal ou estria gordurosa**, ocorrendo acúmulo de células espumosas sem um centro necrótico ou capa fibrosa;

3) **espessamento intimal patológico**, lesão aterosclerótica progressiva, com células musculares lisas em uma matriz rica em proteoglicanas, com área de acúmulo de lipídeos, sem necrose;

4) **ateroma com capa fibrosa**, com centro necrótico bem formado e delimitado por uma capa fibrosa. Pode ocorrer trombose luminal, sem nenhuma comunicação do centro necrótico com o trombo;

5) **ateroma com capa fibrosa estreita**, infiltrado por macrófagos e linfócitos com raras células musculares lisas e um centro necrótico;

6) **nódulo calcificado**, com calcificação nodular eruptiva e placa fibrocalcificada;

7) **placa fibrocalcificada**, rica em colágeno com significante estenose; normalmente contém uma grande área de calcificação e poucas células inflamatórias.

Determinados fatores se associam ao desenvolvimento mais precoce e acelerado da aterogênese. Segundo SCOTT (2004), dentre estes, estão as dislipidemias, que constituem fatores de risco modificáveis para a aterosclerose.

As dislipidemias são etiologicamente classificadas em primárias, cuja origem é genética; e secundárias, que são causadas por outras doenças ou pelo uso de medicamentos.

As dislipidemias primárias são caracterizadas por um perfil genético de alto risco (BROWN e GOLDSTEIN, 1986; RAMACHANDRAN et al., 2005), no qual o fenótipo do perfil lipídico é determinado pela interação entre os fatores genéticos e os ambientais, incluindo a dieta.

A hipercolesterolemia familiar, um tipo de dislipidemia primária, é caracterizada pelo elevado nível de LDL no plasma, pela presença de xantomas e história familiar de doença arterial coronariana prematura (PUNZALAN et al., 2005). Esta desordem metabólica hereditária é relativamente comum, com uma incidência de 1/500, sendo causada por mutações no gene do receptor de LDL (SMILDE et al., 2001). Essas mutações podem reduzir o número ou prejudicar a função dos receptores de LDL na superfície das células hepáticas, levando à diminuição do catabolismo das partículas de LDL, o que resulta na elevação dos níveis plasmáticos dessa lipoproteína (PUNZALAN et al., 2005).

2.2 Camundongos knockout para o receptor de LDL como modelo experimental

Em camundongos *knockout* para o receptor de LDL (LDLR $-/-$) o desenvolvimento de aterosclerose é similar à hipercolesterolemia familiar humana (STAPRANS et al., 2000).

Os camundongos são os modelos animais mais utilizados para o estudo dos lipídios e da aterosclerose. No entanto, nestes animais, as lesões ateroscleróticas induzidas por dietas extremamente hipercolesterolêmicas são limitadas em tamanho, complexidade e distribuição. Isto pode ser modificado com o desenvolvimento de camundongos transgênicos e *knockout* para determinados genes, os quais podem produzir efeitos notáveis nas lipoproteínas plasmáticas e nas lesões arteriais até mesmo na ausência de manipulações dietéticas (FAZIO & LINTON, 2001).

O desenvolvimento dos camundongos LDLR $-/-$ foi descrito por ISHIBASHI et al. (1993). Estes modelos animais são levemente hipercolesterolêmicos devido à ausência de receptores de LDL no fígado, o que prolonga a meia vida das partículas de LDL e VLDL no plasma. Quando consomem dietas potencialmente aterogênicas, tornam-se gravemente hipercolesterolêmicos, desenvolvem lesões ateroscleróticas ao longo da aorta e xantomas subcutâneos. As lesões ateroscleróticas, tanto precoces como tardias, ainda não foram completamente caracterizadas neste modelo animal (KOWALA et al., 2000). Entretanto, pode ser um modelo particularmente satisfatório para a investigação dos mecanismos da aterosclerose, bem como para estudos de intervenção antiaterogênicos (TANGIRALA et al., 1995).

Já o 10*t*,12*c*-CLA é encontrado em quantidades menores nas fontes naturais de CLA, mas em quantidades substanciais nas preparações comerciais (BAUMAN e GRIINARI, 2001).

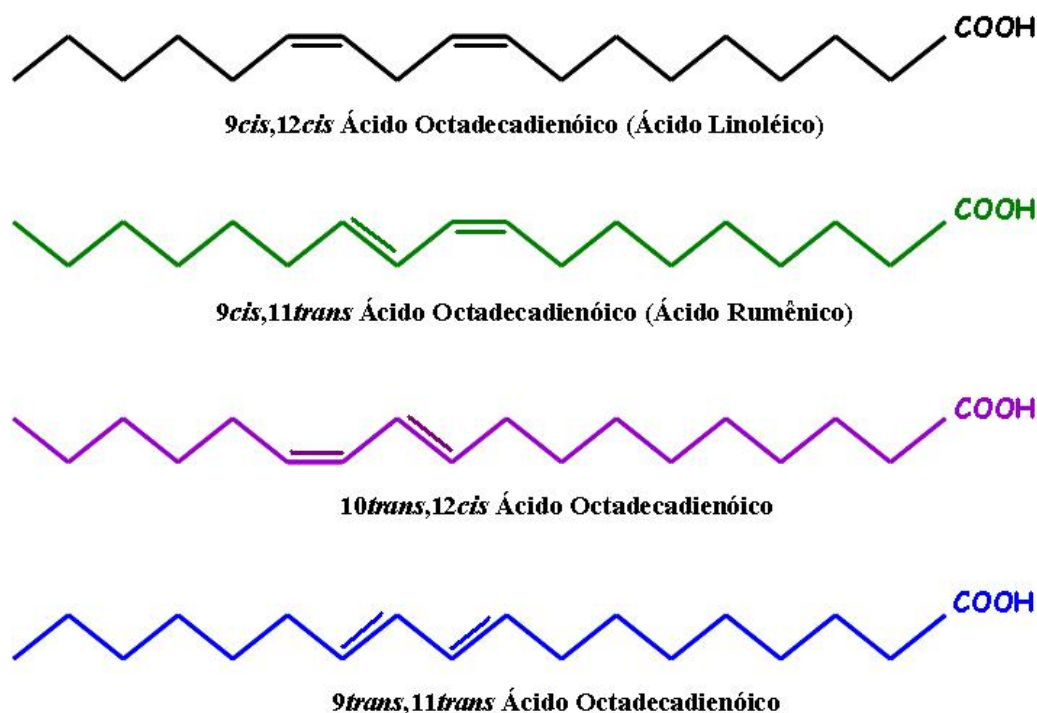


Figura 2.2 – Representação do ácido linoléico e de três dos seus isômeros conjugados.

De acordo com JIANG et al. (1996), há uma variação do conteúdo de CLA no leite, de 2,5 a 17,7 mg/g de gordura. Observa-se que esta variação é sazonal e tem sido associada a vários fatores, contudo, a dieta é o principal deles, encontrando-se as mais altas concentrações de CLA quando o animal se alimenta de pastagens frescas e ricas em ácidos graxos poliinsaturados (BAUMAN e GRIINARI, 2000; COLLOMB et al., 2002; ADDIS et al., 2005; NUDDA et al., 2005).

Em outros produtos derivados do leite, a concentração de CLA é menor e varia de 2,5 a 7,0 mg/g de lipídio. Já em sobremesas e iogurtes com teor reduzido de gordura, o conteúdo de CLA é relativamente baixo, de 0,5 a 1,7 mg/g de lipídio (CHIN et al., 1992).

O teor de CLA nestes produtos é dependente do seu conteúdo no leite, sendo que o tipo de processamento parece ter pouco ou nenhum efeito na sua concentração final,

exceto quando há uma grande redução do teor de gordura. Esta estabilidade do CLA durante o processamento pode ser decorrente da sua ligação à lactoalbumina ou à lactoglobulina, que o protegem da isomerização e da oxidação (BANNI e MARTIN, 1998).

2.3.2 Consumo

Devido à conversão endógena do ácido *trans*-vacênico a 9*c*,11*t*-CLA, pela Δ -9 dessaturase, provavelmente a ingestão média de CLA não reflete todo o conteúdo disponível destes ácidos graxos na dieta de um indivíduo. Estima-se que aproximadamente 20% do ácido *trans*-vacênico consumidos sejam convertidos a 9*c*,11*t*-CLA por esta via metabólica (TURPEINEN et al., 2002).

Existem poucas estimativas disponíveis sobre o consumo de CLA (JIANG et al., 1999; ENS et al., 2001; RITZENTHALER et al., 2001). Além disto, os instrumentos utilizados na avaliação da ingestão são variáveis entre os estudos, tornando as comparações mais difíceis.

JIANG et al. (1999), estudando uma população de homens idosos na Suécia, encontraram um consumo médio de 160,00 mg de CLA por dia. Por outro lado, no Canadá, em um estudo com um pequeno grupo de jovens, a ingestão média de 9*c*,11*t*-CLA foi estimada em $94,90 \pm 40,60$ mg/dia, variando entre 15,00 e 174,00 mg/dia (ENS et al., 2001).

Nos EUA, o consumo total de CLA é estimado em $151,00 \pm 14,00$ mg/dia para mulheres e em $212,00 \pm 14,00$ mg/dia para homens. Quando avaliada somente a ingestão de ácido rumênico, a estimativa é de $140,00 \pm 13,00$ mg/dia e $193,00 \pm 14,00$ mg/dia para mulheres e homens, respectivamente (RITZENTHALER et al., 2001).

A atividade funcional atribuída ao CLA tem incitado o seu consumo. Porém, devido à variação sazonal do conteúdo de CLA nas suas fontes naturais, a quantidade habitualmente consumida também é variável.

Uma maior ingestão diária poderia ser conseguida das seguintes formas:

- 1 – aumentando o consumo de alimentos derivados de animais ruminantes;
- 2 – aumentando o conteúdo de CLA nestes alimentos;
- 3 – enriquecendo outros produtos alimentares com CLA;

4 – utilizando suplementos de CLA na forma de cápsulas.

Com o objetivo de elevar o valor nutritivo e terapêutico dos alimentos derivados de ruminantes, várias pesquisas vêm sendo conduzidas com o intuito de aumentar o teor de ácido *trans*-vacênico e/ou de ácido rumênico destes alimentos (DHIMAN et al., 1999; ADDIS et al., 2005). Além de prática e viável, esta tem se mostrado a melhor alternativa para aumentar o consumo de CLA, por prover uma forma natural de consumo, não interferir na quantidade de alimentos habitualmente consumida pelos indivíduos e evitar o consumo excessivo destes compostos na forma de suplementos, já que suas recomendações de ingestão diária ainda não foram estabelecidas.

2.3.3 Efeitos do CLA na aterosclerose

O ácido linoléico conjugado tem sido investigado pelos seus efeitos benéficos na prevenção e tratamento de uma diversidade de doenças, incluindo a obesidade (GAULLIER et al., 2007), o diabetes (MOLONEY et al., 2007), o câncer (LEE et al., 2006; BOCCA et al., 2007) e as doenças cardiovasculares (TOOMEY et al., 2006).

A estes ácidos graxos também têm sido atribuídas atividades anti-inflamatórias, bem como ações regulatórias sobre o sistema imune (SNEDDON et al., 2006), o metabolismo lipídico (MITCHELL et al., 2005) e de eicosanóides (IWAKIRI et al., 2002; URQUHART et al., 2002), a produção de citocinas (LUONGO et al., 2003) e a expressão de determinados genes (BELURY et al., 2002).

Embora seus mecanismos de ação ainda não estejam totalmente esclarecidos, sabe-se que as atividades do CLA são mediadas diretamente pelos seus isômeros ou por meio da ligação destes isômeros a fatores de transcrição específicos, envolvidos em muitos dos processos metabólicos afetados por eles (WAHLE et al., 2004).

Dentre os numerosos efeitos benéficos relatados sobre o CLA, as suas propriedades anti-carcinogênicas e anti-obesogênicas têm sido extensivamente estudadas e, somente nos últimos anos, as propriedades anti-aterogênicas destes ácidos graxos têm ganhado maior notoriedade.

Os estudos de LEE et al. (1994) e NICOLOSI et al. (1997) foram os primeiros a relacionar o papel protetor do CLA na formação de lesões ateroscleróticas precoces em modelos animais. Desde então, vários pesquisadores já demonstraram os efeitos do

CLA no desenvolvimento e regressão da aterosclerose (KRITCHEVSKY et al., 2004; VALEILLE et al., 2005; TOOMEY et al., 2006).

Os estudos com animais vêm demonstrando as interferências mais relevantes do CLA na aterosclerose; entretanto, estes efeitos são variáveis dependendo das espécies estudadas.

TOOMEY et al. (2006) demonstraram a regressão quase completa da aterosclerose, em camundongos apo E^{-/-}, após a suplementação com CLA. Em outro estudo, a suplementação com 9*c*,11*t*-CLA impediu, enquanto o isômero 10*t*,12*c*-CLA promoveu o desenvolvimento da aterosclerose neste modelo animal (ARBONÉS-MAINAR, 2006).

Em coelhos, o CLA também reduz a gravidade das lesões ateroscleróticas, em diferentes níveis de suplementação (KRITCHEVSKY et al., 2002), entretanto, na concentração de 1 % da dieta, é capaz de regredir lesões bem estabelecidas na aorta (KRITCHEVSKY et al., 2000; KRITCHEVSKY et al., 2004), não havendo diferenças nas ações dos dois principais isômeros (KRITCHEVSKY et al., 2004).

Vários estudos também demonstraram que a suplementação com CLA leva à redução do desenvolvimento da aterosclerose em hamsters (WILSON et al., 2000; MITCHELL et al., 2005; VALEILLE et al., 2005).

Estudos *in vitro* descrevem alguns efeitos importantes do CLA nos mecanismos moleculares envolvidos na aterogênese. Tem sido demonstrado que o tratamento com CLA suprime a adesão endotelial de monócitos (SNEDDON et al., 2006) e diminui a produção de prostaglandinas (IWAKIRI et al., 2002; YU et al., 2002) e outros produtos pró-inflamatórios, como TNF α , IL-1 β e IL-6, nos macrófagos (YU et al., 2002).

Além disto, existem relatos de efeitos seletivos dos principais isômeros do CLA em determinados mecanismos moleculares, como o aumento da transcrição do gene do receptor de LDL (RINGSEIS et al., 2006) e a redução da secreção de apolipoproteína B (STORKSON et al., 2005), em cultura de células HepG2, após tratamento com 10*t*,12*c*-CLA.

De maneira geral, os estudos com seres humanos tentam relacionar o consumo de CLA com o metabolismo das lipoproteínas, no entanto, seus resultados são bastante controversos.

O consumo de CLA tem sido associado com modificações benéficas no perfil de lipídios séricos (BLANKSON et al., 2000; NOONE et al., 2002). Contudo, alguns trabalhos não mostram associação (NAUMANN et al., 2006) ou relatam efeitos divergentes dos principais isômeros do CLA no metabolismo das lipoproteínas (TRICON et al., 2004).

2.4 Vitamina E

2.4.1 Definição e fontes dietéticas

Vitamina E é o termo utilizado para indicar um grupo de compostos lipossolúveis intimamente relacionados (tocoferóis e tocotrienóis), cujas moléculas são constituídas por duas regiões distintas: um núcleo contendo um grupo hidroxil e uma longa cadeia hidrofóbica (**Figura 2.3**). Estas peculiaridades estruturais são responsáveis por suas propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, pelo seu papel biológico (BONGIORNO et al., 2006).

No plasma humano, o α -tocoferol é a principal forma circulante de vitamina E. Este composto é um potente antioxidante das partículas de LDL e possui a capacidade de atuar como *scavenger* dos radicais peroxil, assim como, na quebra da reação em cadeia associada com a peroxidação lipídica (BURTON e INGOLD, 1989; van AALST, 2004).

Os compostos com atividade de vitamina E são sintetizados apenas pelas plantas, mas são componentes essenciais da dieta dos animais. Desta forma, eles são encontrados principalmente nos produtos de origem vegetal e suas principais fontes são o germe de trigo e os óleos vegetais. Com exceção da gema de ovo, do fígado e do tecido adiposo, os alimentos de origem animal não são boas fontes da vitamina (BALL, 1998).

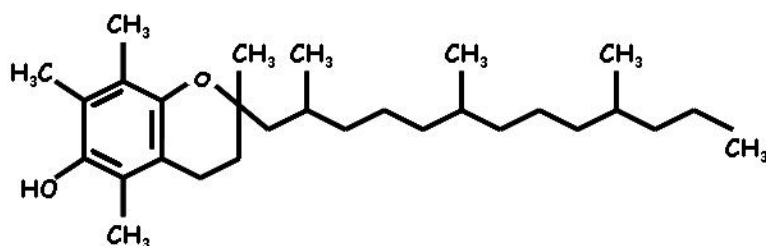


Figura 2.3 – Estrutura química do α -tocoferol.

2.4.2 Efeitos da vitamina E na aterosclerose

De acordo com a hipótese oxidativa, a oxidação das partículas de LDL constitui o evento primário na patogênese da aterosclerose (STEINBERG et al., 1989). Desta forma, a LDL-OX tem sido foco de um grande número de investigações devido ao papel fundamental que esta partícula desempenha na iniciação e progressão das lesões ateroscleróticas (van AALST, 2004).

Os antioxidantes presentes na dieta, além de proteger a LDL da oxidação, podem aumentar a capacidade oxidativa das células vasculares e do sistema imune, reduzir o estresse oxidativo e a resposta inflamatória associada à hipercolesterolemia, reduzindo desta maneira, o risco de aterosclerose (KOGA et al., 2004).

Ainda que existam controvérsias sobre a utilidade das estratégias antioxidantes na prevenção das doenças cardiovasculares, o efeito potencial de diferentes antioxidantes da dieta na prevenção do desenvolvimento e progressão da aterosclerose tem sido demonstrado em certos modelos experimentais (STEINBERG e WITZTUM, 2002; RODRÍGUEZ et al., 2005).

Assim, existe um grande interesse na busca por agentes antioxidantes capazes de reduzir o impacto das reações oxidativas na aterosclerose (PELUZIO et al., 2003), estando a ingestão de alimentos ricos em vitamina E entre os fatores que têm contribuído para retardar o desenvolvimento desta doença (ÖZER et al., 2006).

Muitos estudos com modelos animais (OTERO et al., 2005; HASTY et al., 2007) e ensaios clínicos (HODIS et al., 2002; ZUREIK et al., 2004) têm sido conduzidos para avaliar o papel antioxidante da vitamina E na redução do risco de desenvolvimento da aterosclerose e, conseqüentemente, das doenças cardiovasculares.

Em estudos experimentais, a suplementação com vitamina E tem se mostrado eficaz em reduzir a suscetibilidade das partículas de LDL à oxidação (KHALIL e MILOCHEVITCH, 2005), em inibir a proliferação de células musculares lisas e diminuir a captação das LDL-OX na parede arterial (ÖZER et al., 2006), em inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias (DEVARAJ & JIALAL, 2005) e a agregação plaquetária (MUROHARA et al., 2004).

Além desses efeitos, de acordo com CYRUS et al. (2001), a vitamina E induz uma redução significativa da aterogênese precoce em modelos animais para aterosclerose. Em camundongos LDLR *-/-*, a suplementação com vitamina E reduziu a progressão das lesões ateroscleróticas, suprimindo reações inflamatórias e oxidativas e

umentando os níveis de óxido nítrico. A efetividade da suplementação com vitamina E neste modelo animal é vista tanto na fase inicial da aterogênese como depois da doença estabelecida (CYRUS et al., 2003).

No entanto, estudos epidemiológicos com seres humanos não associam (BUIJSSE et al., 2005) ou associam inversamente (RIMM et al., 1993; STAMPFER et al., 1993) a ingestão de vitamina E com as doenças cardiovasculares. Já os ensaios do tipo randomizado e controlado são contraditórios nesta questão e mostram efeitos benéficos (CARRERO et al., 2005), efeitos mistos (HODIS et al., 2002; MICHELETTA et al., 2004) e até mesmo a ineficiência da vitamina E nas doenças cardiovasculares (TÖRNWALL et al., 2004; ZUREIK et al., 2004).

O efeito variável da suplementação com vitamina E na aterosclerose experimental tem sido objeto de muitos questionamentos. Segundo WEINBERG (2005), os estudos com animais podem ser mais bem controlados e podem utilizar medidas mais rigorosas de progressão das lesões ateroscleróticas. Isto poderia explicar, pelo menos em parte, os efeitos contraditórios relatados em estudos epidemiológicos e ensaios clínicos, em relação aos estudos que utilizam animais.

Contudo, de acordo com SUARNA et al. (2006), o α -tocoferol tem um impacto modesto na aterosclerose experimental e seus efeitos são observados somente sob condições de deficiência grave de vitamina E. Se comparados aos resultados obtidos em estudos com seres humanos, estes resultados podem explicar porque, muitas vezes, a suplementação com vitamina E falha em melhorar a saúde cardiovascular quando não existe deficiência da vitamina.

Por outro lado, de acordo com HASTY et al. (2007), é possível que, em humanos, o tratamento com vitamina E tenha valor terapêutico somente em indivíduos com níveis elevados de estresse oxidativo. Assim, sugere-se que as incoerências encontradas nestes tipos de estudo seriam decorrentes de critérios inconsistentes na seleção de candidatos ao uso de terapias antioxidantes (VIOLI et al., 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da suplementação alimentar com ácido linoléico conjugado (CLA) e com vitamina E na progressão da aterosclerose em camundongos LDLR-/-, com lesão precoce instalada.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar a presença e dimensão das lesões ateroscleróticas na raiz da aorta.
- Comparar os efeitos do consumo de CLA e de vitamina E na evolução da lesão aterosclerótica precoce.
- Avaliar o efeito da associação de CLA e vitamina E na evolução da lesão aterosclerótica precoce.
- Verificar os efeitos decorrentes da suplementação com CLA e/ou com vitamina E no perfil dos lipídios séricos.
- Identificar alterações no perfil de ácidos graxos do intestino, do tecido hepático e do tecido adiposo, decorrentes da suplementação com CLA e com vitamina E.
- Observar o nível de peroxidação lipídica hepática em animais suplementados com CLA e com vitamina E.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos LDLR -/-, machos e fêmeas, com seis semanas de idade, procedentes do biotério do Laboratório de Bioquímica Nutricional (LABIN), do Departamento de Bioquímica e Imunologia, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais, com peso médio de $14,2 \pm 1,9$ g, foram mantidos em gaiolas individuais de aço inoxidável, em ambiente com temperatura controlada ($21 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) e fotoperíodo de 12 horas.

4.2 Delineamento experimental

O ensaio biológico foi realizado em duas etapas e teve duração de 14 semanas.

A primeira etapa, ou **fase de indução**, teve o objetivo de promover o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas precoces nos animais. Nesta etapa, com duração de seis semanas, os animais foram divididos em dois grupos:

- Grupo CT: dieta semipurificada;
- Grupo AT: dieta aterogênica.

Ao final do período de indução, 10 animais do grupo AT, que constituíram o grupo AT1, sofreram eutanásia para avaliação do estágio de desenvolvimento das lesões ateroscleróticas na aorta.

Na segunda etapa, ou **fase de tratamento**, com duração de oito semanas, os animais do grupo CT continuaram recebendo dieta semipurificada e os animais do grupo AT foram divididos em outros cinco grupos:

- Grupo AT2: dieta aterogênica;
- Grupo CLA: dieta semipurificada + 1% de 10*t*,12*c*-CLA;
- Grupo TOC: dieta semipurificada + 1% de acetato de vitamina E;
- Grupo CLA/TOC: dieta semipurificada + 1% de 10*t*,12*c*-CLA + 1% de acetato de vitamina E;
- Grupo AT/SP: dieta semipurificada.

As fezes foram coletadas no início e no final de ambas as etapas do experimento e armazenadas a – 20 °C até análise.

O consumo das dietas foi monitorado diariamente e a evolução do peso, semanalmente, para o cálculo do coeficiente de eficácia alimentar (ABDULLAH e OTHMAN, 2000). Durante todo o período experimental (**Figura 4.1**), os animais receberam água e dieta *ad libitum*, exceto no período de 12 horas anteriores à eutanásia, quando foram colocados em jejum.

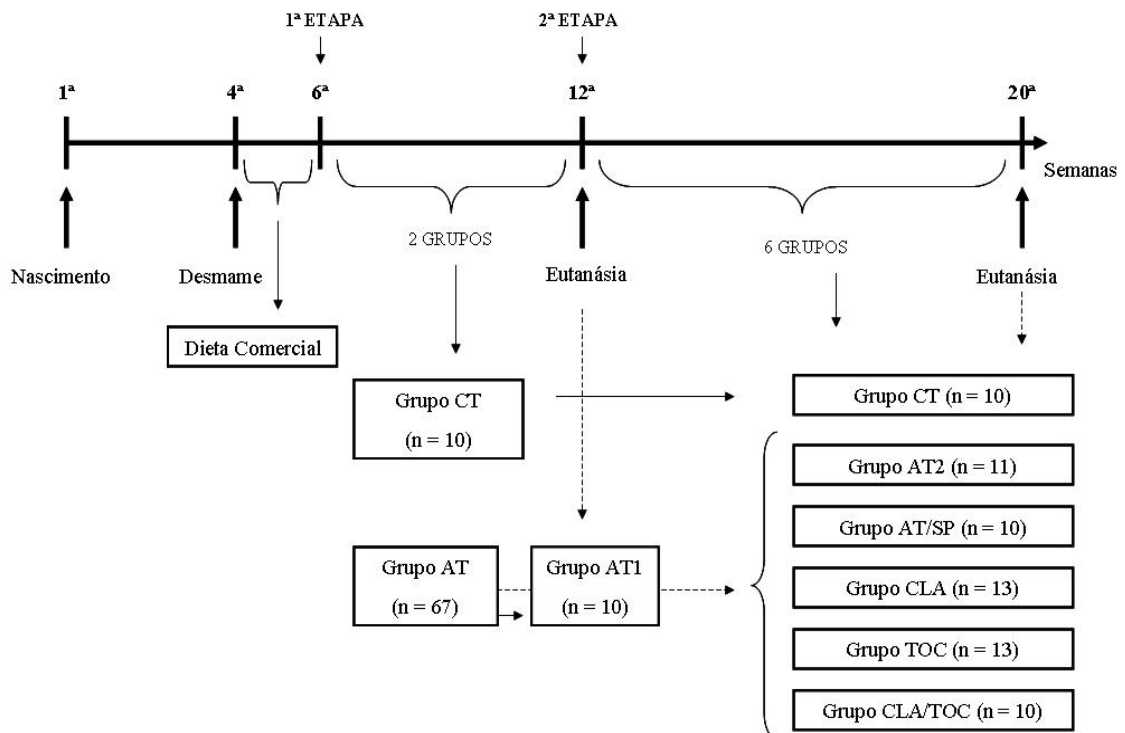


Figura 4.1 – Desenho experimental.

Grupo CT – dieta semipurificada / **Grupo AT (AT1 e AT2)** – dieta aterogênica/ **Grupo CLA** – dieta semipurificada + 1% de 10*t*,12*c*-CLA/ **Grupo TOC** – dieta semipurificada + 1% de acetato de vitamina E/ **Grupo CLA/TOC** – dieta semipurificada + 1% de 10*t*,12*c*-CLA + 1% de acetato de vitamina E/ **Grupo AT/SP** – dieta aterogênica (fase de indução) e dieta semipurificada (fase de tratamento).

O tecido adiposo peri-renal, o fígado e o intestino foram removidos, lavados em PBS, congelados em nitrogênio líquido e mantidos a – 80 °C. Os corações foram retirados em bloco com a raiz da aorta, perfundidos em solução salina fisiológica e, em seguida, fixados em solução de formol em PBS (10%).

O sangue foi coletado por punção na aorta abdominal e centrifugado a 3500 rpm, por 10 minutos, para obtenção do soro. O soro foi congelado em nitrogênio líquido e mantido a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, até análise.

O experimento seguiu as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA (1991).

4.3 Dietas

A composição das dietas experimentais (**Tabela 4.1**) foi baseada na dieta proposta pela *Association of Official Analytical Chemistry* (A.O.A.C., 1989). Foram confeccionadas manualmente, congeladas e protegidas da luz até o momento da utilização. Com exceção da dieta aterogênica, as demais foram isoenergéticas. O CLA foi obtido na forma de cápsulas que continham, em média, $62,70 \pm 2,60$ mg de $10t,12c$ -CLA/100 mg de óleo.

Tabela 4.1 – Composição das dietas experimentais (%).

Ingredientes	Dietas					
	Semipurificada	Aterogênica	CLA	TOC	CLA/TOC	
Amido de milho	68	-	68	68	68	
Sacarose	-	55	-	-	-	
Caseína	20	20	20	20	20	
Celulose	1	1	1	1	1	
Óleo de soja	5	1	5	5	5	
Colesterol	-	1	-	-	-	
GVH ¹	-	15	-	-	-	
Mistura vitamínica	1	1	1	1	1	
Mistura mineral	5	5	5	5	5	
Bitartrato de colina	-	1	-	-	-	
CLA ²	-	-	1	-	1	
Acetato de vitamina E	-	-	-	1	1	

Fonte: AOAC (1989).

¹ Gordura vegetal hidrogenada.

² Ácido linoléico conjugado ($10t,12c$ -CLA). Gentilmente cedido por: Rainha Laboratório Nutracêutico Ltda.

A composição centesimal aproximada das dietas foi determinada utilizando-se as técnicas descritas pela AOAC (1980) para umidade, extrato etéreo e cinzas. O nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldhal. Os glicídios e a fibra

alimentar foram calculados por diferença, compondo juntos a fração NIFEXT (*Nitrogen-free extract*).

4.4 Análise dos lipídios

4.4.1 Extração dos lipídios

Os lipídios dos órgãos e tecidos, bem como das dietas, foram extraídos pelo método de FOLCH et al. (1957). Os extratos lipídicos foram esterificados para obtenção dos ésteres metílicos dos ácidos graxos, utilizando o método CBA (*Combined base- and acid-catalyzed methylation method*), de acordo com YU et al. (2003).

Neste método, a amostra lipídica foi homogeneizada com 1 mL de NaOH-MeOH (0,5N) e reagiu em temperatura ambiente. Após 5 minutos, foram adicionados 2 mL de HCl-MeOH (4%) e a reação foi conduzida por mais 5 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 3 mL de água destilada e seus produtos extraídos com 5 mL de isooctano. O extrato dissolvido em isooctano foi filtrado em funil com sulfato de sódio anidro, concentrado em atmosfera de nitrogênio e armazenado em frasco âmbar a – 20 °C até análise cromatográfica.

4.4.2 Identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos

A identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa, comparando-se os tempos de retenção dos ésteres presentes nas amostras com os dos padrões: FAME mix (Supelco[®], EUA), 10*t*,12*c*-CLA, 9*c*,11*t*-CLA e 9*t*,11*t*-CLA (Matreya[®], EUA). O ácido tridecanoico (Sigma-Aldrich[®], EUA) foi utilizado como padrão interno.

Utilizou-se cromatógrafo a gás GC-17A Shimadzu/Class GC, equipado com detector de ionização de chamas e com coluna cromatográfica de sílica fundida SP-2560 (*Biscyanopropil polysiloxane*) de 100 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno.

Foram adotadas as seguintes condições de programação:

- Temperatura do detector: 240 °C
- Temperatura do injetor: 240 °C

- Temperatura da coluna: início a 70 °C, permanecendo nesta temperatura por 4 minutos; aquecimento até 100 °C, a uma taxa de 5 °C por minuto; aquecimento até 175 °C, a uma taxa de 10 °C por minuto, permanecendo nesta temperatura por 20 minutos; aquecimento até 225 °C, a uma taxa de 5 °C por minuto, permanecendo nesta temperatura por 27,5 minutos.

O gás de arraste foi o nitrogênio, com fluxo da coluna de 1,47 mL/minuto, velocidade linear de 22,96 cm/segundo, split de 1:20, fluxo total de 35 mL/minuto e pressão da coluna de 257 Kpa.

4.5 Determinação do colesterol sérico, hepático e fecal

O colesterol total foi quantificado por método enzimático (ALLAIN et al., 1974) e sua concentração sérica foi determinada a partir da absorbância do padrão de colesterol (200 mg/dL). A dosagem de colesterol hepático e fecal foi feita a partir dos seus respectivos extratos lipídicos retomados em 1,5 mL de álcool isopropílico.

A concentração de triacilgliceróis foi determinada enzimaticamente, sendo que os valores encontrados foram divididos por quatro, para obtenção das concentrações da fração VLDL. A fração HDL foi obtida por determinação direta (WARNICK et al., 2001) e a fração LDL, por diferença entre as concentrações de colesterol total e as de HDL e VLDL.

Foram utilizados *kits* comerciais (Bioclin[®], Brasil), gentilmente cedidos pela empresa Quibasa Química Básica Ltda.

4.6 Avaliação da Peroxidação lipídica

A medida do grau de peroxidação lipídica foi realizada pelo método FOX-2 (NOUROOZ-ZADEH et al., 1994) e incluiu a realização de dois ensaios.

No primeiro ensaio, uma alíquota de 45 µL de homogenato do tecido hepático reagiu durante 30 minutos com solução de trifetilfosfina em metanol. Em seguida, foram adicionados 450 µL do reagente FOX-2 e a reação prosseguiu por mais 30 minutos em temperatura ambiente. No segundo ensaio, uma alíquota de 50 µL do homegenato reagiu durante 30 minutos com 450 µL do reagente FOX-2.

O reagente FOX-2 foi preparado imediatamente antes da sua utilização, adicionando-se nove partes de solução de BHT em metanol (1%), a uma parte de solução de alaranjado de xilenol e sulfato ferroso amoniacal em ácido sulfúrico.

Após as reações, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm, durante 5 minutos e os sobrenadantes foram lidos em leitor de placa de ELISA, a 560 nm, contra um branco contendo tampão PBS.

Considerou-se um Coeficiente de Extinção Aparente igual a $4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e o cálculo da concentração de hidroperóxidos foi realizado utilizando a seguinte fórmula:

$$[\text{Hidroperóxidos}] = \frac{\text{Absorbância}}{(4,3 \times 10^4) \times 10^9} = [\] \text{ nmol}$$

Para a quantificação dos hidroperóxidos lipídicos, subtraíram-se os valores encontrados no segundo ensaio pelos encontrados no primeiro.

4.7 Determinação do α -tocoferol

A extração do α -tocoferol das amostras de fígado e fezes foi realizada baseando-se no método de UEDA e IGARASHI (1990). A determinação da concentração de α -tocoferol foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detector espectrofotométrico UV-visível de arranjo de diodos (Shimadzu), utilizando a coluna Lichrospher, RP-18 (4,0 x 250 mm, 5 μm). A fase móvel consistiu de uma solução de acetonitrila, metanol e hexano na proporção de 3:95:2, com fluxo de 1 mL/minuto e tempo total de corrida de 10 minutos. O comprimento de onda no detector, 295 nm, foi o correspondente à absorbância máxima do α -tocoferol.

O padrão vitamínico foi preparado dissolvendo-se 10 mg de α -tocoferol (Sigma-Aldrich[®], EUA) em etanol a 96%, resultando em uma solução estoque com concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Procedeu-se a varredura para confirmação do espectro de absorção da solução padrão na faixa ultravioleta, utilizando os comprimentos de onda de 190 a 350 nm. O cálculo da concentração real da solução padrão foi feito utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar ($E1\%1\text{cm}$) = 70,8.

As concentrações de α -tocoferol das amostras de fígado e fezes foram expressas em $\mu\text{g}/100\text{g}$ e calculadas a partir da curva padrão do α -tocoferol, obtida por regressão linear.

4.8 Análise morfológica

Foram utilizados cinco animais de cada grupo experimental, escolhidos ao acaso. O coração foi separado da aorta torácica e abdominal, fixado em formol tamponado 10% e processado para inclusão em parafina. Foram feitos cortes consecutivos de 10 μm de espessura na região da válvula aórtica e montadas de seis a oito lâminas por animal, contendo em média 25 seções de aorta em cada lâmina. As lâminas foram codificadas e coradas por hematoxilina e eosina (H/E).

O tamanho da lesão aterosclerótica e a avaliação do percentual de obstrução da aorta foram avaliados em dez cortes, tomando sempre como referência a presença da válvula aórtica.

A partir da identificação da válvula aórtica, a cada 30 μm era selecionado um corte. Assim, foi percorrida uma extensão média de 300 μm e os cortes analisados foram sempre intercalados por dois cortes consecutivos, de acordo com a técnica de PAIGEN et al. (1987) modificada por PORTUGAL et al., (2004).

O cálculo do tamanho da lesão aterosclerótica de cada animal foi feito pela soma das áreas dos dez cortes selecionados. O percentual de obstrução da aorta foi calculado pela fórmula: $[(\sum \text{áreas das lesões} / \sum \text{áreas da aorta}) \times 100]$.

A captura das imagens foi feita em microscópio *Olympus*, acoplado a vídeo-câmera (Objetivas: 4x e 20x / Bin = 1). Para medida das áreas das seções da aorta utilizou-se o software Image Pro Plus[®], versão 4.5.

4.9 Análise Estatística

Foi utilizado o software SigmaStat[®], versão 3.0 para a análise estatística. O teste de normalidade utilizado foi o de *Kolmogorov-Smirnov*.

Para as comparações entre três ou mais grupos independentes, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de comparações múltiplas de

Tukey e quando os dados não apresentaram distribuição normal, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de Dunn's.

Na análise morfométrica, além dos testes citados, foi utilizado o teste *t*, para comparação entre dois grupos independentes e o teste *t* pareado, para avaliação da evolução das lesões entre os grupos AT1 e AT2.

O nível de significância utilizado foi de 95 %, com o valor de $p < 0,05$. Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão.

5 ARTIGO DE REVISÃO:

Os isômeros do CLA são agentes antiaterogênicos?

Evidências sobre o desenvolvimento e regressão das lesões.

Resumo

Ácido linoléico conjugado (CLA) é o termo que designa todos os isômeros geométricos e de posição do ácido linoléico. A estes compostos têm sido atribuídos efeitos importantes no desenvolvimento e na regressão da aterosclerose. A maioria dos estudos nesta área era conduzida utilizando misturas com quantidades iguais dos seus dois principais isômeros, 9*c*,11*t*-CLA e 10*t*,12*c*-CLA. Contudo, a necessidade de se conhecer qual a participação de cada um destes ácidos graxos no tratamento e/ou prevenção da aterosclerose, tem incentivado pesquisas com estes isômeros na forma isolada, o que tem contribuído para o esclarecimento de muitas das discrepâncias encontradas nos estudos que utilizaram misturas isoméricas. Evidências encontradas nos estudos mais recentes sugerem que ambos os isômeros exercem atividades biológicas importantes na aterosclerose, entretanto, seus mecanismos de ação ainda não foram totalmente elucidados.

Palavras-chave: ácido linoléico conjugado, aterogênese, regressão da aterosclerose, aterosclerose experimental.

5.1 Introdução

O termo ácido linoléico conjugado (CLA) é utilizado para designar todos os isômeros geométricos e de posição do ácido octadecadienóico (PARIZA e HARGREAVES, 1985; PARODI, 1999). São caracterizados por possuírem as ligações duplas separadas por uma ligação simples carbono-carbono, produzindo uma estrutura dieno-conjugada (ARBONÉS-MAINAR et al., 2006).

A forma natural mais abundante de CLA é o 9*c*,11*t*-CLA (PARODI, 1977), também chamado de ácido rumênico, que é formado no rúmen durante a biohidrogenação incompleta do ácido linoléico. Pode ser formado também pela ação da Δ -9 dessaturase sobre o ácido *trans*-vacênico no tecido mamário de várias espécies, incluindo o homem (GRIINARI et al., 2000). Desta forma, os alimentos derivados de animais ruminantes (carnes e produtos lácteos) são as principais fontes de CLA da dieta (WAHLE et al., 2004).

O 10*t*,12*c*-CLA é encontrado em quantidades menores nos produtos derivados de ruminantes, entretanto, as preparações comerciais contêm quantidades substanciais deste isômero. O 9*c*,11*t*-CLA e o 10*t*,12*c*-CLA são, quantitativamente, as principais formas isoméricas do CLA (BAUMAN e GRIINARI, 2001).

Vários efeitos biológicos importantes foram atribuídos ao CLA, incluindo controle da composição corporal e metabolismo energético (GAULLIER et al., 2004), modulação da resposta imune (SNEDDON et al., 2006), efeitos anti-carcinogênicos (PARODI, 1999; BOCCA et al., 2007) e anti-aterogênicos (VALEILLE et al., 2006). Entretanto, como o CLA não é uma substância única, esta variedade de atividades biológicas provavelmente não é resultado da ação de um único isômero, já que potencialmente cada um deles possui propriedades distintas (PARIZA et al., 2000).

Com a disponibilidade dos principais isômeros do CLA na forma purificada e a um preço razoável, é possível determinar se os efeitos na aterosclerose podem ser atribuídos a um isômero específico ou se ambos exercem efeitos antiaterogênicos (KRITCHEVSKY et al., 2002). A utilização destas formas isoméricas isoladas tornou-se uma área em expansão na pesquisa científica.

Evidências têm sugerido que ambos os isômeros exercem atividades biológicas importantes e que estes não são biologicamente equivalentes. Em particular, o interesse sobre a ação desses compostos na aterosclerose tem recebido considerável atenção. Esta

revisão considera observações nesta área, limitando-se aos resultados relacionados aos dois principais isômeros do CLA.

5.2 Isômeros do CLA e aterogênese

Os relatos sobre os efeitos potenciais do CLA na aterogênese são relativamente recentes. Os estudos de LEE et al. (1994) e NICOLOSI et al. (1997) foram uns dos primeiros a relacionar o papel protetor do CLA na formação de lesões ateroscleróticas precoces. Embora MUNDAY et al. (1999) tenham demonstrado a formação de estrias gordurosas após a suplementação com CLA, posteriormente, outros pesquisadores mostraram que níveis destes compostos, tão baixos como 0,05 %, já exercem alguma ação inibitória no desenvolvimento experimental da aterosclerose (KRITCHEVSKY et al., 2002).

Efeitos específicos de isômeros do CLA também têm sido demonstrados em camundongos (TOOMEY et al., 2003; ARBONÉS-MAINAR et al., 2006; NESTEL et al., 2006), coelhos (KRITCHEVSKY et al., 2004) e hamsters (MITCHELL et al., 2005; VALEILLE et al., 2005).

Em camundongos apoE ^{-/-}, os principais isômeros do CLA apresentaram efeitos divergentes nos componentes celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento e estabilidade das lesões. O 10*t*,12*c*-CLA induziu a manifestação de determinadas características, como a presença de menor conteúdo de colágeno e células musculares lisas, que estão presentes em lesões mais vulneráveis à formação de trombos. Além disso, este isômero promoveu o desenvolvimento de um maior número de focos de lesões na aorta, exercendo um efeito pró-aterogênico acentuado. Já o 9*c*,11*t*-CLA impediu o desenvolvimento da aterosclerose (ARBONÉS-MAINAR et al., 2006).

KRITCHEVSKY et al. (2004) confirmaram o efeito das misturas isoméricas do CLA em reduzir o desenvolvimento da aterosclerose experimental em coelhos e verificaram que tanto o isômero 9*c*,11*t*-CLA, como o 10*t*,12*c*-CLA, exercem efeitos similares, com reduções de 48 % a 62 % na gravidade das lesões.

Quando comparado ao ácido linoléico, cada isômero individual do CLA exerceu efeitos protetores na aterosclerose, reduzindo substancialmente a frequência de lesões em hamsters; no entanto, este efeito não se correlacionou com modificações benéficas no perfil das lipoproteínas plasmáticas (MITCHELL et al., 2005).

Contudo, WILSON et al. (2006) estudando o acúmulo de colesterol na aorta de hamsters hipercolesterolêmicos, verificaram a tendência do isômero 10*t*,12*c*-CLA em aumentar o depósito de colesterol no arco aórtico, enquanto o 9*c*,11*t*-CLA e o ácido linoléico reduziram o acúmulo de colesterol. Diminuir a deposição de colesterol na aorta pode contribuir para a redução do desenvolvimento da aterosclerose.

5.3 Isômeros do CLA e regressão da aterosclerose

O primeiro relato de regressão substancial de lesões ateroscleróticas, atribuída exclusivamente à dieta, foi feita por KRITCHEVSKY et al. (2000). Eles demonstraram que após o estabelecimento da aterosclerose em coelhos, a isenção de colesterol da dieta e a suplementação com 1 % de CLA levava à redução de 31 % das lesões no arco aórtico e de 30 % na aorta torácica.

Em 2006, TOOMEY et al. relataram a regressão quase completa da aterosclerose em camundongos apoE -/- que receberam dietas suplementadas com 1 % de CLA. Este estudo utilizou misturas dos principais isômeros do CLA e, embora tenha utilizado uma maior proporção (80 %) de 9*c*,11*t*-CLA, não esclareceram a contribuição de cada isômero, individualmente, na regressão das lesões ateroscleróticas.

Ainda existem poucos estudos sobre a ação de isômeros específicos do CLA na regressão da aterosclerose. Além disto, os efeitos até hoje descritos são variáveis de acordo com as espécies estudadas. Apesar dos relatos sobre a atuação de isômeros específicos do CLA no desenvolvimento da aterosclerose em hamsters, do nosso conhecimento, nenhum estudo até o momento foi capaz de confirmar a ação destes isômeros na regressão da aterosclerose neste modelo animal. Além disto, os estudos que demonstraram tal efeito restringem-se àqueles que utilizam coelhos ou camundongos apoE -/- como modelo experimental.

No estudo de KRITCHEVSKY et al. (2004), os isômeros 9*c*,11*t*-CLA e 10*t*,12*c*-CLA promoveram 59 % e 65 %, respectivamente, de regressão de lesões pré-estabelecidas na aorta. Os resultados demonstraram que, em coelhos e no nível de suplementação de 1 % da dieta, os efeitos dos dois principais isômeros do CLA foram similares na regressão da aterosclerose.

Além de retardar a formação de novas lesões, a administração de 9*c*,11*t*-CLA (1 %) em camundongos apoE -/- induziu significativamente a regressão de lesões pré-estabelecidas na aorta (TOOMEY et al., 2003). Já em camundongos apoE -/- diabéticos,

a suplementação com 0,9 % de 9*c*,11*t*-CLA não foi capaz de reduzir a gravidade das lesões (NESTEL et al., 2006). Outros processos patológicos podem afetar a progressão das placas ateroscleróticas (ARBONÉS-MAINAR et al., 2006) e, nestas condições, pode ser necessário um nível de suplementação mais elevado para obtenção de resultados semelhantes na regressão da aterosclerose.

5.4 Mecanismos bioquímicos prováveis

Várias hipóteses têm sido testadas para determinar os mecanismos pelos quais os isômeros do CLA podem alterar a progressão da aterosclerose. No entanto, algumas proposições são insuficientes para explicar os efeitos múltiplos e complexos do CLA na homeostase vascular (ARBONÉS-MAINAR et al., 2006). Talvez, a dificuldade em propor um mecanismo único seja devido aos efeitos diferentes produzidos pelos seus principais isômeros, e à falta de dados que comprovem algum efeito sinérgico ou antagônico entre eles.

Durante algum tempo, acreditou-se que a ação antiaterogênica do CLA fosse devido ao seu papel como agente antioxidante. No entanto, cada vez mais estudos vêm confirmando que o CLA não possui esta habilidade (FLINTOFF-DYE e OMAYE, 2005), apesar de alguns autores afirmarem o contrário (YU, 1991; YU et al., 2002a).

Os mecanismos de ação do CLA ainda são passíveis de muitas discussões e pesquisas, no entanto também não parecem envolver modificações no perfil de lipoproteínas plasmáticas e efeitos na peroxidação lipídica. Fundamentalmente, estes efeitos dos isômeros do CLA têm sido associados à sua ação anti-inflamatória (YU et al., 2002b; MÜLLER et al., 2005), que está relacionada com o papel regulatório destes compostos na expressão de determinados genes (UAUY et al., 2000).

Alguns dos mecanismos moleculares envolvidos na atividade antiaterogênica do CLA têm sido relatados; tais como a redução da síntese de eicosanóides (IWAKIRI et al., 2002) e a ativação de PPAR α (MOYA-CAMARENA et al., 1999; TOOMEY et al., 2006) e de PPAR γ (SCHLESER et al., 2006; TOOMEY et al., 2006), fatores de transcrição que induzem a diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias, por exercerem ações antagônicas ao NF- κ B (CHENG et al., 2004).

A superprodução de certos eicosanóides, como as PGE₂, derivadas do ácido araquidônico, está associada com distúrbios na homeostase vascular (GERRITSEN, 1996). A inibição da síntese desta prostaglandina pelo CLA envolve a redução da

conversão de ácido araquidônico a PGE₂, mediada principalmente pela supressão da transcrição da COX-2 (IWAKIRI et al., 2002).

O promotor da COX-2 contém vários elementos de resposta, incluindo uma proteína de ligação ao NF-κB, e sua expressão é induzida nos sítios de inflamação em resposta a citocinas e fatores de crescimento (von KNETHEN et al., 1999). Contudo, segundo TOOMEY et al. (2003), a inibição seletiva da COX-1, mas não da COX-2, pelo CLA inibe o desenvolvimento da aterosclerose, mas não tem efeito na regressão de lesões pré-estabelecidas.

Em outro estudo, após a suplementação com CLA houve aumento da expressão de PPARα e de PPARγ na aorta, entretanto, os CLA não inibiram a geração de prostaglandinas mediada pelas COX (TOOMEY et al., 2006).

Já no estudo de YU et al. (2002b), o CLA diminuiu a expressão de COX-2, iNOS e TNFα e, conseqüentemente, a produção de PGE₂, TNFα e óxido nítrico em células RAW (*RAW264.7 mouse macrophage cells*) tratadas com INFγ. Além disto, outras citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas IL-1β e IL-6 tiveram sua expressão reduzida após o tratamento com CLA.

A indução do NF-κB é uma etapa crítica para a expressão de moléculas de adesão e de outros marcadores inflamatórios (COLLINS et al., 1995). Sua atividade é regulada negativamente pelo PPARγ, desta forma, os ligantes deste receptor exercem seus efeitos anti-inflamatórios reduzindo a expressão de moléculas de adesão, a adesão de monócitos e a liberação de citocinas (DUVAL et al., 2002).

Os ácidos graxos de cadeia longa, incluindo o ácido linoléico e o ácido araquidônico, são conhecidos ligantes e ativadores dos PPAR (KLIOWER et al., 1997), e os isômeros do CLA compartilham com esses ácidos graxos esta similaridade funcional (MOYA-CAMARENA et al., 1999; YU et al., 2002b).

De acordo com SNEDDON et al. (2006), o PAF desempenha um papel central na adesão de monócitos ao endotélio. Estes autores demonstraram que a ação anti-inflamatória do CLA, representada pela supressão da interação entre os monócitos e as células endoteliais, é mediada através da menor presença de fosfolipídios pró-inflamatórios, como o PAF, nas membranas das células endoteliais. Neste estudo, o CLA inibiu a ligação dos monócitos às células endoteliais em 40 %, sendo que o isômero 10*t*,12*c*-CLA suprimiu a adesão entre estas células em uma resposta dose-dependente.

Ao contrário, outro estudo demonstrou que o tratamento com isômeros do CLA em células HAEC (*human aortic endothelial cells*) não modulou a expressão induzida por citocinas, de ICAM-1, VCAM-1 e selectina-E, bem como a adesão de monócitos U937 e a secreção de MCP-1. Além disto, os isômeros do CLA aumentaram a atividade do PPAR γ , mas não alteraram a atividade de ligação ao NF- κ B neste modelo celular de experimentação (SCHLESER et al., 2006).

5.5 Os isômeros do CLA podem ser considerados agentes antiaterogênicos?

Os estudos que utilizaram isômeros isolados do CLA (Quadro 5.1) podem explicar algumas das discrepâncias encontradas na literatura, visto que aqueles estudos que utilizaram misturas de isômeros, não elucidaram qual destas moléculas foi responsável pelos efeitos observados na aterosclerose.

Os principais isômeros do CLA têm sido relacionados com modificações benéficas no desenvolvimento da aterosclerose, entretanto, algumas observações relatadas nos estudos experimentais ainda são controvertidas. Além disto, a quantidade de CLA necessária para impedir a aterogênese e suprimir estrias gordurosas na aorta, talvez seja variável em função das espécies estudadas e da concentração de colesterol das dietas (KRITCHEVSKY et al., 2004).

Um aspecto importante é que diversas metodologias têm sido empregadas para avaliar as lesões ateroscleróticas na aorta, incluindo a classificação visual das lesões, a coloração dos lipídios *en face* e a morfometria de seções histológicas da aorta, o que dificulta a comparação entre os estudos.

No caso de estudos com seres humanos, além das questões éticas envolvidas, existe também a dificuldade técnica em se avaliar o desenvolvimento da aterosclerose, tendo como parâmetro somente as análises bioquímicas. Outro fator a ser considerado é que a quantidade de CLA disponível na alimentação humana está normalmente muito aquém dos níveis de suplementação utilizados nos estudos experimentais com animais.

Apesar dos avanços alcançados nos últimos anos em relação ao papel dos principais isômeros do CLA na patogênese e no tratamento da aterosclerose, ainda existem muitas pesquisas a serem desenvolvidas para se avaliar os resultados em longo prazo e estabelecer níveis seguros de suplementação para seres humanos. Desta forma, ainda não é possível afirmar que os isômeros do CLA sejam antiaterogênicos ou mesmo que, ao contrário de muitas evidências até hoje encontradas, sejam agentes aterogênicos.

Deve-se ter bastante cuidado ao se recomendar o uso de determinado composto ou substância. As evidências experimentais são pouco conclusivas em se tratando dos mecanismos moleculares e não existe uma padronização de protocolo para que haja correlação. Além disso, os modelos estudados nem sempre são passíveis de comparação com os seres humanos em relação à formação e evolução das lesões.

Quadro 5.1 – Efeitos dos isômeros do CLA na aterosclerose experimental.

Modelos animais	Objetivo	Parâmetro de avaliação	Período de suplementação	Tipo de CLA	Resultados	Referências
Camundongos apoE -/-	Regressão da aterosclerose	Área das seções da aorta	16 semanas	1 % 9 <i>c</i> ,11 <i>t</i> -CLA;	9 <i>c</i> ,11 <i>t</i> -CLA retardou o desenvolvimento e induziu a regressão das lesões na aorta.	TOOMEY et al 2003.
Camundongos apoE -/-	Desenvolvimento da aterosclerose	Área das seções da aorta	12 semanas	Quantidades equivalentes dos 2 isômeros (\pm 0,85 %)	9 <i>c</i> ,11 <i>t</i> -CLA impediu e 10 <i>t</i> ,12 <i>c</i> -CLA promoveu o desenvolvimento da aterosclerose.	ARBONÉS-MAINAR et al, 2006.
Camundongos apoE -/- diabéticos	Desenvolvimento da aterosclerose	Método <i>en face</i>	20 semanas	0,9 % 9 <i>c</i> ,11 <i>t</i> -CLA	O 9 <i>c</i> ,11 <i>t</i> -CLA não reduziu a gravidade das lesões na aorta.	NESTEL et al, 2006
Camundongos apoE -/-	Regressão da aterosclerose	Área das seções da aorta/ método <i>en face</i>	16 semanas	1% CLA (80 % 9 <i>c</i> ,11 <i>t</i> -CLA e 20 % 10 <i>t</i> ,12 <i>c</i> -CLA)	Regressão quase completa (> 90 %) das lesões.	TOOMEY et al, 2006.
Coelhos (New Zealand)	Avaliar progressão e regressão da aterosclerose	Escala visual (0-4)	Estudo de progressão: 12 semanas Estudo de regressão: 12 semanas	0,5 % 9 <i>c</i> ,11 <i>t</i> -CLA; 0,5 % 10 <i>t</i> ,12 <i>c</i> -CLA; 0,5 % Mistura de isômeros	Efeitos iguais dos isômeros em inibir a evolução e em promover a regressão da aterosclerose.	KRITCHEVSKY et al, 2004.
Hamsters (Syrian Golden)	Desenvolvimento da aterosclerose	Área das seções da aorta	12 semanas	1 % 9 <i>c</i> ,11 <i>t</i> -CLA; 1 % 10 <i>t</i> ,12 <i>c</i> -CLA ou 1 % ácido linoléico	Efeitos iguais dos isômeros com menor formação de estrias gordurosas. *	MITCHELL et al., 2005.
Hamsters (Syrian Golden)	Acúmulo de colesterol na aorta	Concentração de colesterol na aorta	12 semanas	0,37 % 9 <i>c</i> ,11 <i>t</i> -CLA	Atenuação de sinais de aterosclerose precoce	VALEILLE et al., 2005.
Hamsters (Syrian Golden)	Acúmulo de colesterol na aorta	Concentração de colesterol na aorta	12 semanas	0,5 % 9 <i>c</i> ,11 <i>t</i> -CLA; 0,5 % 10 <i>t</i> ,12 <i>c</i> -CLA ou 0,5 % ácido linoléico	9 <i>c</i> ,11 <i>t</i> -CLA e ácido linoléico reduziram e 10 <i>t</i> ,12 <i>c</i> -CLA aumentou o acúmulo de colesterol na aorta *	WILSON et al., 2006.

* Diferença não significante.

6 ARTIGO ORIGINAL I

Vitamina E, mas não o 10*t*,12*c*-CLA, reduz a progressão da aterosclerose em camundongos LDLR *-/-* com lesão pré-estabelecida

Resumo

Introdução: Evidências comprovam a ocorrência de reações inflamatórias e oxidativas na aterosclerose. O ácido linoléico conjugado, um conjunto de isômeros geométricos e de posição do ácido octadecadienóico, tem sido relacionado com a redução da progressão da aterosclerose, devido à sua ação antiinflamatória. Por outro lado, a ação antioxidante da vitamina E também tem revelado efeitos benéficos importantes na aterosclerose. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da suplementação com CLA e/ou com vitamina E na progressão da aterosclerose experimental. **Materiais e métodos:** Camundongos LDLR *-/-* foram alimentados com dieta semipurificada ou aterogênica, durante seis semanas. Após este período, um grupo sofreu eutanásia para constatação do desenvolvimento da aterosclerose e os outros animais foram alimentados por oito semanas com dieta semipurificada suplementada com 1 % de vitamina E, 1 % de 10*t*,12*c*-CLA ou com 1 % de vitamina E + 1 % de 10*t*,12*c*-CLA. Foram avaliados a área total da lesão aterosclerótica e o percentual de obstrução da aorta, além de parâmetros relacionados ao metabolismo do colesterol e do α -tocoferol. **Resultados:** A utilização isolada do isômero 10*t*,12*c*-CLA não impediu o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas na aorta. No entanto, a suplementação dietética com vitamina E, assim como a associação de vitamina E e 10*t*,12*c*-CLA, reduziram significativamente a área total da lesão e o percentual de obstrução da aorta. **Conclusão:** Os resultados demonstraram que, em camundongos LDLR *-/-*, a suplementação da vitamina E isoladamente ou em associação com o isômero 10*t*,12*c*-CLA reduz a progressão de lesões ateroscleróticas pré-estabelecidas na aorta.

Palavras-chave: ácido linoléico conjugado, α -tocoferol, aterosclerose, camundongos LDLR *-/-*

6.1 Introdução

Nos países em desenvolvimento, incluindo o Brasil, as doenças cardiovasculares secundárias à aterosclerose têm elevado substancialmente as taxas de morbidade e mortalidade. A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial (DEPARTAMENTO DE ATEROSCLEROSE DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007).

Dentre os vários fatores envolvidos no seu desenvolvimento, destaca-se a ocorrência de reações inflamatórias (HANSSON, 2005) e oxidativas (STOCKER e KEANEY JR, 2003). Algumas medidas empregadas na prevenção da aterosclerose incluem a utilização de compostos da dieta com propriedades específicas, que visam minimizar o impacto destas reações no seu desenvolvimento.

Neste sentido, os lipídios e os compostos antioxidantes da dieta têm sido importantes objetos de pesquisa em saúde e nutrição; existindo um grande interesse nos potenciais efeitos benéficos destes compostos, especialmente na prevenção e no tratamento das doenças cardiovasculares.

Ácido linoléico conjugado (CLA) é o termo que engloba todos os isômeros geométricos e de posição do ácido octadecadienóico (PARIZA e HARGREAVES, 1985; PARODI, 1999).

Estes ácidos graxos têm sido relacionados com a diminuição da extensão da aterosclerose em diversos modelos animais (KRITCHEVSKY et al., 2004; MITCHELL et al., 2005; TOOMEY et al., 2006). Fundamentalmente, os efeitos dos isômeros do CLA na aterosclerose têm sido atribuídos à sua ação anti-inflamatória (YU et al., 2002; MÜLLER et al., 2005), apesar de os mecanismos envolvidos nestas ações ainda serem desconhecidos.

Por outro lado, estratégias utilizadas no tratamento experimental da aterosclerose compreendem a utilização de suplementos de vitaminas antioxidantes, como a vitamina E. Esta vitamina também está relacionada à redução do desenvolvimento da aterosclerose em animais experimentais (PELUZIO et al., 2003; CYRUS et al., 2003; OTERO et al., 2005).

Evidências de estudos *in vivo* (ROSENBLAT e AVIRAM, 2002) e *in vitro* (ARROL et al., 2000) indicam que a vitamina E exerce seu papel antiaterogênico por incorporar-se às partículas de LDL, tornando-as menos suscetíveis à oxidação.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos individuais e associados do isômero 10*t*,12*c*-CLA e da vitamina E na aterosclerose induzida por dieta hiperlipídica e colesterol, em um modelo para hipercolesterolemia familiar humana.

6.2 Materiais e Métodos

6.2.1 Animais e dietas

Foram utilizados 77 camundongos LDLR *-/-*, machos e fêmeas, com seis semanas de vida, procedentes do biotério do Laboratório de Bioquímica Nutricional, do Departamento de Bioquímica e Imunologia, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de aço inoxidável, em ambiente com temperatura controlada ($21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo de 12 horas. Durante todo o período experimental, os animais receberam água e dieta *ad libitum*. Também foram monitorados o consumo alimentar e o ganho de peso.

O ensaio biológico foi realizado em duas etapas e teve duração total de 14 semanas.

Na **fase de indução** da aterogênese, os animais foram alimentados com dieta controle (semipurificada) ou com dieta de indução (aterogênica), durante seis semanas (**Tabelas 6.1 e 6.2**). Ao final deste período, um grupo (grupo AT1; $n = 10$) sofreu eutanásia para avaliação do grau de desenvolvimento da aterosclerose.

Na **fase de tratamento** os animais do grupo controle continuaram recebendo dieta semipurificada e os animais que receberam dieta aterogênica foram divididos em outros cinco grupos:

- 1 – Grupo AT2: dieta aterogênica;
- 2 – Grupo CLA: dieta semipurificada + 1% de 10*t*,12*c*-CLA;
- 3 – Grupo TOC: dieta semipurificada + 1% de acetato de vitamina E;
- 4 – Grupo CLA/TOC: dieta semipurificada + 1% de 10*t*,12*c*-CLA + 1% de acetato de vitamina E;

5 – Grupo AT/SP: dieta semipurificada.

As cápsulas de CLA foram gentilmente cedidas pela empresa Rainha Laboratório Nutracêutico Ltda. e continham, em média, $62,70 \pm 2,60$ mg de 10*t*,12*c*-CLA/100 mg de óleo.

Tabela 6.1 – Composição da dieta controle (semipurificada).

Ingredientes	%
Amido de milho	68
Caseína	20
Celulose	1
Óleo de soja	5
Mistura vitamínica	1
Mistura mineral	5

Fonte: AOAC (1989).

Tabela 6.2 – Composição da dieta de indução (aterogênica).

Ingredientes	%
Sacarose	55
Caseína	20
Celulose	1
Óleo de soja	1
Colesterol	1
Gordura vegetal hidrogenada	15
Mistura vitamínica	1
Mistura mineral	5
Bitartarato de colina	1

Fonte: AOAC (1989).

As fezes foram coletadas no início e no final de ambas as etapas do experimento e armazenadas a -20 °C até análise.

Ao término do período experimental, os animais foram colocados em jejum por 12 horas e sofreram eutanásia.

Os corações foram retirados em bloco, com a raiz da aorta, perfundidos em solução salina fisiológica e, em seguida, fixados em solução de formol em PBS (10%).

O sangue foi coletado por punção na aorta abdominal e centrifugado a 3500 rpm, por 10 minutos, para obtenção do soro. O soro foi congelado em nitrogênio líquido e mantido a -80 °C, até análise.

Este trabalho foi realizado segundo as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA (1991).

6.2.2 Concentração dos lipídios séricos

O colesterol total foi quantificado por método enzimático (ALLAIN et al., 1974) e sua concentração sérica foi determinada a partir da absorbância do padrão de colesterol (200 mg/dL).

A concentração de triacilgliceróis foi determinada enzimaticamente por *kit* bioquímico, sendo que os valores encontrados foram divididos por quatro, para obtenção das concentrações da fração VLDL. A fração HDL foi obtida por determinação direta (WARNICK et al., 2001) e a fração LDL, por diferença entre as concentrações de colesterol total e as de HDL e VLDL.

Foram utilizados *kits* comerciais (Bioclin[®], Brasil), gentilmente cedidos pela empresa Quibasa Química Básica Ltda.

6.2.3 Concentração do colesterol hepático e fecal

A dosagem de colesterol hepático e fecal foi feita a partir dos seus respectivos extratos lipídicos retomados em 1,5 mL de álcool isopropílico.

As concentrações de colesterol foram determinadas enzimaticamente, utilizando *kit* comercial (Bioclin[®], Brasil).

6.2.4 Determinação do α -tocoferol

A extração do α -tocoferol das amostras de fígado e fezes foi realizada pelo método de UEDA e IGARASHI (1990). A determinação da concentração de α -tocoferol foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detector espectrofotométrico UV-visível de arranjo de diodos (Shimadzu), utilizando a coluna Lichrospher, RP-18 (4,0 x 250 mm, 5 μ m). A fase móvel consistiu de uma solução de acetonitrila, metanol e hexano na proporção de 3:95:2, com fluxo de 1 mL/minuto e tempo total de corrida de 10 minutos. O comprimento de onda no detector, 295 nm, foi o correspondente à absorbância máxima do α -tocoferol.

O padrão vitamínico foi preparado dissolvendo-se 10 mg de α -tocoferol (Sigma-Aldrich[®], EUA) em etanol a 96%, resultando em uma solução estoque com concentração de 10 μ g/mL. Procedeu-se a varredura para confirmação do espectro de absorção da solução padrão na faixa ultravioleta, utilizando os comprimentos de onda de 190 a 350 nm. O cálculo da concentração real da solução padrão foi feito utilizando-se o coeficiente de absortividade molar ($E1\%1cm$) = 70,8.

6.2.5 Análise morfológica

Foram utilizados cinco animais de cada grupo experimental, escolhidos ao acaso. O coração foi separado da aorta torácica e abdominal, fixado em formol tamponado 10% e processado para inclusão em parafina. Foram feitos cortes consecutivos de 10 μ m de espessura na região da válvula aórtica e montadas de seis a oito lâminas por animal, contendo em média 25 seções de aorta em cada lâmina. As lâminas foram codificadas e coradas por hematoxilina e eosina (H/E).

O tamanho da lesão aterosclerótica e a avaliação do percentual de obstrução da aorta foram avaliados em dez cortes, tomando sempre como referência a presença da válvula aórtica.

A partir da identificação da válvula aórtica, um corte foi selecionado a cada 30 μ m, de acordo com a técnica de PAIGEN et al. (1987), modificada por PORTUGAL et al. (2004).

O cálculo do tamanho da lesão aterosclerótica de cada animal foi feito pela soma das áreas dos dez cortes selecionados. O percentual de obstrução da aorta foi calculado pela fórmula: $[(\sum \text{áreas das lesões} / \sum \text{áreas da aorta}) \times 100]$.

A captura das imagens foi feita em microscópio *Olympus*, acoplado a vídeo-câmera (Objetivas: 4x e 20x / Bin = 1). Para medida das áreas das seções da aorta utilizou-se o software Image Pro Plus[®], versão 4.5.

6.2.6 Análise Estatística

Foi utilizado o software SigmaStat[®], versão 3.0 para a análise estatística. O teste de normalidade utilizado foi o de *Kolmogorov-Smirnov*. Para as comparações entre três ou mais grupos independentes, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

Na análise morfométrica, além dos testes citados, foi utilizado o teste *t*, para comparação entre dois grupos independentes e o teste *t* pareado, para avaliação da evolução das lesões entre os grupos AT1 e AT2.

O nível de significância utilizado foi de 95 %, com o valor de $p < 0,05$. Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão.

6.3 Resultados e Discussão

6.3.1 Peso dos animais

A maior concentração de lipídios na dieta aterogênica e a suplementação dietética com CLA e/ou com vitamina E não interferiram no ganho ponderal dos animais (**Tabela 6.3**).

Os estudos com modelos para aterosclerose também não têm encontrado modificações na evolução do ganho de peso, decorrentes do consumo das dietas experimentais (KOGA et al., 2004; WILSON et al., 2006). Ao contrário, VALEILLE et al. (2005) observaram que os animais que consumiram dietas com alto teor de gordura, reduziram o consumo alimentar em função da densidade energética da dieta, mantendo, desta forma, pesos semelhantes aos animais que consumiram dietas normolipídicas.

6.3.2 Colesterol

Na **Tabela 6.3** têm-se o perfil de lipídios séricos dos grupos controles (CT e AT2) e experimentais (CLA, TOC e CLA/TOC).

Os tratamentos com CLA e com vitamina E não interferiram nas concentrações séricas de triacilgliceróis e das frações HDL e VLDL. A adição de vitamina E às dietas resultou no desenvolvimento de um perfil de lipídios séricos considerado menos aterogênico, com menores concentrações de colesterol total e de LDL, embora não tenha apresentado diferenças estatisticamente significantes em relação aos demais grupos.

Alguns estudos demonstraram que, quando comparada ao consumo de dieta aterogênica, a suplementação com vitamina E também não reduz significativamente os níveis séricos de colesterol total e de triacilgliceróis (CYRUS et al., 2003; PELUZIO et al., 2003; HASTY et al, 2007), uma vez que a concentração de gordura saturada nestas

dietas é elevada. Portanto, sendo este um reflexo direto da quantidade de lipídios da dieta.

As concentrações séricas de colesterol total, LDL, VLDL e triacilgliceróis foram maiores ($p < 0,05$) no grupo que consumiu dieta aterogênica em relação a todos os outros grupos, exceto o grupo CLA, no qual também foram verificadas concentrações elevadas de colesterol total e de LDL.

A suplementação com CLA não foi efetiva em melhorar o perfil dos lipídios séricos. No entanto, os níveis de colesterol deste grupo foram um pouco menores que os do grupo AT2; ao contrário do observado no estudo de ARBONÉS-MAINAR et al. (2006), no qual o consumo de 10*t*,12*c*-CLA aumentou as concentrações séricas de triacilgliceróis, de colesterol total e de HDL em relação ao grupo que consumiu somente dieta aterogênica. A diferença entre os resultados se deve em parte, ao modelo experimental, considerando que no estudo de ARBONÉS-MAINAR et al. (2006) foram utilizados animais *knockout* para Apo-E, o que efetivamente contribuiu para alteração na síntese das lipoproteínas. Já o modelo por nós utilizado, pressupõe um efeito diferente nas alterações do perfil lipídico, num primeiro momento, vinculado à concentração da gordura na dieta e, posteriormente à sua captação pelos tecidos.

Tabela 6.3 – Peso corporal (g) e perfil de lipídios séricos (mg/dL) dos animais dos grupos controles e experimentais.

	GRUPOS					
	CT (n = 10)	AT2 (n = 11)	CLA (n = 13)	TOC (n = 13)	CLA/TOC (n = 10)	AT/SP (n = 10)
Peso inicial (g)	14,2 ± 1,1	14,7 ± 2,1	13,7 ± 1,7	14,9 ± 1,5	14,0 ± 2,3	14,3 ± 1,5
Peso final (g)	23,7 ± 2,3	23,1 ± 1,4	22,9 ± 2,5	24,5 ± 2,4	23,8 ± 4,2	23,5 ± 3,8
Colesterol total	329,4 ± 26,0*	963,4 ± 435,8	571,8 ± 120,5	266,4 ± 12,7*	264,0 ± 57,6*	334,4 ± 43,3*
LDL	242,2 ± 22,5*	771,9 ± 423,7	465,0 ± 110,7	157,6 ± 15,5*	162,6 ± 32,2*	199,3 ± 31,9*
VLDL	22,1 ± 5,3*	130,1 ± 25,5	31,2 ± 15,5*	31,5 ± 5,8*	40,9 ± 25,8*	50,9 ± 14,2*
HDL	65,1 ± 6,1 [#]	61,4 ± 4,1 [#]	75,3 ± 1,9	77,6 ± 5,9	60,5 ± 5,5 ^{#,†}	84,1 ± 7,6
Triacilgliceróis	88,4 ± 21,3*	520,4 ± 101,9	124,9 ± 61,9*	126,1 ± 23,3*	163,8 ± 103,3*	203,8 ± 56,8*

Grupo CT – dieta semipurificada / **Grupo AT2** – dieta aterogênica/ **Grupo CLA** – dieta semipurificada + 1% de 10*t*,12*c*-CLA/ **Grupo TOC** – dieta semipurificada + 1% de acetato de vitamina E/ **Grupo CLA/TOC** – dieta semipurificada + 1% de 10*t*,12*c*-CLA + 1% de acetato de vitamina E/ **Grupo AT/SP** – dieta aterogênica (fase de indução) e dieta semipurificada (fase de tratamento).

Valores apresentados como média ± desvio-padrão.

Análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

[*] p<0,05 vs. grupo AT2

[#] p<0,05 vs. grupo AT/SP

[†] p<0,05 vs. grupo TOC

A concentração de colesterol hepático dos diferentes grupos avaliados variou em termos absolutos, no entanto, não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os valores (**Figura 6.1**).

Outros estudos também verificaram resultados semelhantes aos nossos. Em coelhos, as concentrações hepáticas de colesterol, após suplementação com CLA (KRITCHEVSKY et al., 2000) ou com os seus principais isômeros de forma isolada (KRITCHEVSKY et al., 2004), também foram semelhantes às encontradas no grupo controle. A mesma observação foi feita em camundongos apoE ^{-/-}, após suplementação com vitamina E (PELUZIO et al.; 2003).

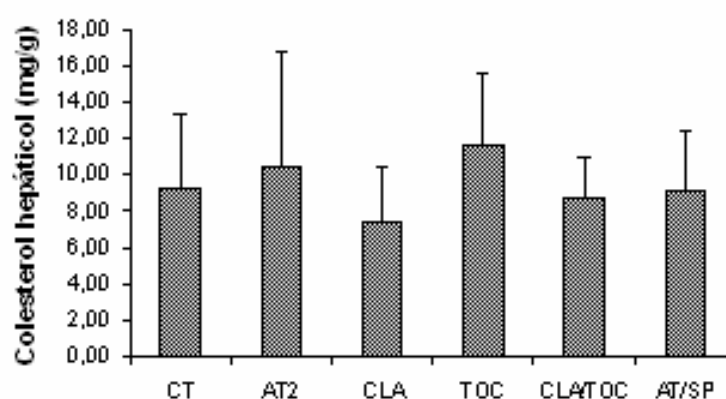


Figura 6.1 – Concentração hepática de colesterol dos grupos controles e experimentais.

Grupo CT – dieta semipurificada / **Grupo AT2** – dieta aterogênica/ **Grupo CLA** – dieta semipurificada + 1% de 10*t*,12*c*-CLA/ **Grupo TOC** – dieta semipurificada + 1% de acetato de vitamina E/ **Grupo CLA/TOC** – dieta semipurificada + 1% de 10*t*,12*c*-CLA + 1% de acetato de vitamina E/ **Grupo AT/SP** – dieta aterogênica (fase de indução) e dieta semipurificada (fase de tratamento). Resultados expressos como média ± desvio-padrão. As médias não diferiram pela análise de variância (ANOVA).

Em ambas as fases do período experimental, a excreção de colesterol nas fezes foi maior ($p < 0,05$) no grupo AT2 e refletiu o consumo de colesterol da dieta por este grupo (**Tabela 6.4**).

Ainda em resposta à dieta consumida na primeira fase, no início da fase de tratamento a excreção de colesterol foi maior nos grupos experimentais em relação ao controle. No grupo TOC houve uma excreção, aproximadamente, duas vezes maior que a dos demais grupos experimentais.

Na etapa final da fase de tratamento, a excreção de colesterol pelo grupo TOC foi menor que no início, mas ainda assim foi superior à excreção observada no grupo controle e nos demais grupos experimentais.

Este fato pode ter tido um papel importante na redução do colesterol sérico nos animais dos grupos TOC e CLA/TOC e, não necessariamente, relacionada ao efeito antioxidante próprio da vitamina E.

Tabela 6.4 – Concentração de colesterol fecal (mg/g) dos grupos controles e experimentais, nas fases de indução (FI) e de tratamento (FT).

	GRUPOS					
	CT (n = 10)	AT2 (n = 11)	CLA (n = 13)	TOC (n = 13)	CLA/TOC (n = 10)	AT/SP (n = 10)
FI*						
Início	10,2 ± 4,6	40,4 ± 10,7 [#]				
Final	16,6 ± 15,6	41,8 ± 11,9 [#]				
FT**						
Início	4,9 ± 1,9	41,6 ± 12,6 [#]	13,2 ± 6,5 [†]	32,1 ± 11,9 [#]	14,0 ± 5,4 [†]	17,5 ± 8,1
Final	3,8 ± 1,5	46,4 ± 9,3 [#]	3,5 ± 1,7 [†]	12,7 ± 4,5 [#]	4,8 ± 3,3 [†]	3,8 ± 2,5 [†]

Grupo CT – dieta semipurificada / **Grupo AT2** – dieta aterogênica/ **Grupo CLA** – dieta semipurificada + 1% de 10 α ,12 α -CLA/ **Grupo TOC** – dieta semipurificada + 1% de acetato de vitamina E/ **Grupo CLA/TOC** – dieta semipurificada + 1% de 10 α ,12 α -CLA + 1% de acetato de vitamina E/ **Grupo AT/SP** – dieta aterogênica (FI) e dieta semipurificada (FT) / **FI** – fase de indução / **FT** – fase de tratamento. Resultados expressos como média ± desvio-padrão. * Teste t; ** Análise de variância, complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. [#] p<0,05 vs. grupo CT; [†] p<0,05 vs. grupo TOC.

6.3.3 Concentrações de α -tocoferol

O conteúdo de vitamina E no fígado aumenta linearmente em resposta ao aumento da sua quantidade na dieta (BALL, 1998). As maiores concentrações de α -tocoferol hepático no grupo TOC foram confirmadas pela análise cromatográfica (**Figura 6.2**). O fígado é o principal local de armazenamento da vitamina E da dieta, o que justifica os resultados encontrados. Contudo, foram observadas menores concentrações hepáticas de α -tocoferol no grupo CLA/TOC em relação ao grupo TOC, o que pode ser devido à maior utilização da vitamina, convertida para a proteção dos ácidos graxos contra a oxidação, uma vez que uma das principais funções da vitamina E é a sua capacidade antioxidante. Outro fato que contribui com esta suposição é a excreção de α -tocoferol que não foi diferente entre estes dois grupos (**Figura 6.3**).

Outros estudos também notaram maiores concentrações hepáticas de α -tocoferol nos grupos suplementados com vitamina E com maior proteção contra oxidação (PELUZIO et al., 2003; OTERO et al., 2005).

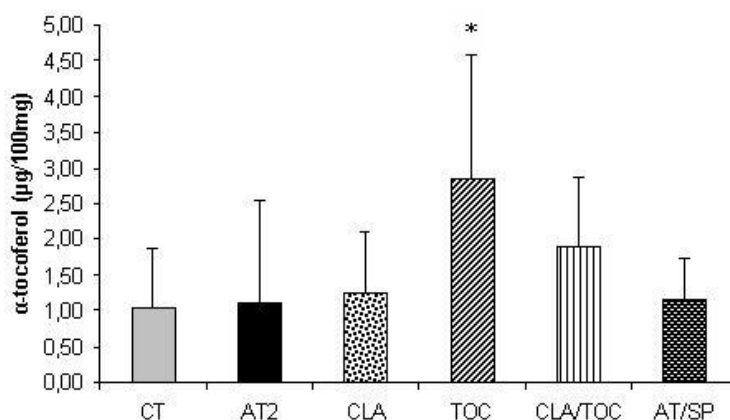


Figura 6.2 – Concentração de α -tocoferol hepático dos grupos controles e experimentais.

Grupo CT – dieta semipurificada / **Grupo AT2** – dieta aterogênica/ **Grupo CLA** – dieta semipurificada + 1% de $10t,12c$ -CLA/ **Grupo TOC** – dieta semipurificada + 1% de acetato de vitamina E/ **Grupo CLA/TOC** – dieta semipurificada + 1% de $10t,12c$ -CLA + 1% de acetato de vitamina E/ **Grupo AT/SP** – dieta aterogênica (FI) e dieta semipurificada (FT). Resultados expressos como média \pm desvio-padrão. Análise de variância, complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. [*] $p < 0,05$ vs. grupos CT, AT2, CLA e AT/SP.

De acordo com LOSOWSKY et al. (1972), existe uma relação inversamente proporcional entre a quantidade ingerida e o percentual de absorção da vitamina E. Este fato foi confirmado pelas análises das concentrações fecais de α -tocoferol (**Figura 6.3**), que revelaram diferenças significantes na excreção nos grupos que consumiram vitamina E (TOC e CLA/TOC) em relação aos demais grupos, embora não tenham apresentado diferenças entre si.

A vitamina E é absorvida no intestino delgado e, juntamente, com os ácidos graxos livre, os 2-monoacilgliceróis e o colesterol, provenientes da dieta, são incorporados nos quilomícrons.

Posteriormente, a vitamina presente nas partículas de quilomícrons remanescentes, é captada pelo fígado, que a distribui para os demais tecidos através das VLDL. O fígado não armazena quantidades excessivas de vitamina E, desta forma, os tocoferóis absorvidos em excesso são excretados na bile (KAYDEN e TRABER, 1993).

Assim, sua eliminação na bile pode ter sido uma via adicional de excreção do excesso de vitamina E absorvido.

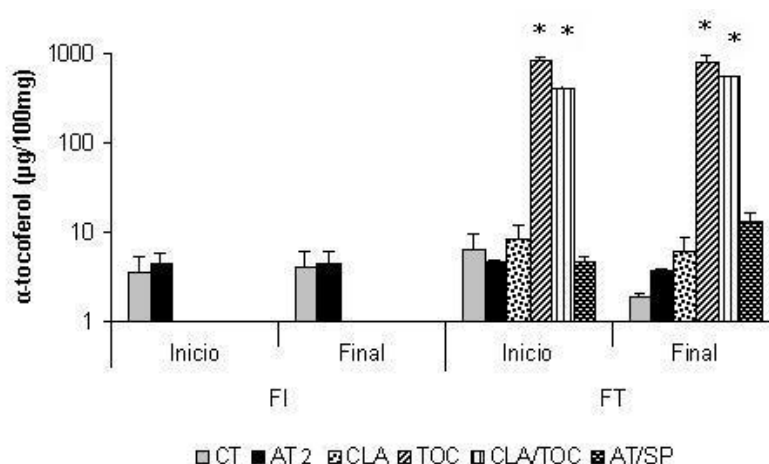


Figura 6.3 – Concentração fecal de α -tocoferol, nas fases de indução e de tratamento, dos grupos controles e experimentais.

Grupo CT – dieta semipurificada / **Grupo AT2** – dieta aterogênica/ **Grupo CLA** – dieta semipurificada + 1% de 10*t*,12*c*-CLA/ **Grupo TOC** – dieta semipurificada + 1% de acetato de vitamina E/ **Grupo CLA/TOC** – dieta semipurificada + 1% de 10*t*,12*c*-CLA + 1% de acetato de vitamina E/ **Grupo AT/SP** – dieta aterogênica (FI) e dieta semipurificada (FT) / **FI** – fase de indução / **FT** – fase de tratamento. Resultados expressos como média \pm desvio-padrão. Análise de variância, complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. [*] $p < 0,05$ vs. grupos CT, AT, CLA e AT/SP.

6.3.4 Aterogênese

Observações histológicas da aorta antes da suplementação com CLA e/ou vitamina E mostraram a formação de lesões nos animais experimentais. Como esperado, o consumo de dieta semipurificada durante todo o período experimental (grupo CT) não impediu a formação inicial de estrias gordurosas na aorta (**Figuras 6.4, 6.5 e 6.6**), fato justificado pelas características do modelo animal.

Os resultados encontrados por KOWALA et al. (2000) foram semelhantes aos nossos. Estes autores observaram que, em camundongos LDLR $-/-$ alimentados com dieta controle, houve um pequeno depósito de lipídios no espaço subendotelial; enquanto o consumo de dieta rica em colesterol, durante duas semanas, promoveu o rápido acúmulo de células espumosas na íntima arterial.

Uma vez iniciada a formação da lesão, somente a substituição da dieta aterogênica por uma dieta normolipídica (grupo AT/SP) foi suficiente para reduzir a progressão, mas não para induzir a regressão, da aterosclerose (**Figuras 6.4, 6.5 e 6.7**).

A suplementação dietética com 10*t*-12*c*-CLA produziu efeitos semelhantes (**Figuras 6.4, 6.5 e 6.8**), e embora não tenham sido estatisticamente significantes, estes resultados são satisfatórios do ponto de vista biológico, reforçando que a redução da ingestão de colesterol e de gorduras saturadas tem efeitos benéficos na aterosclerose.

Após seis semanas de consumo de dieta aterogênica (grupo AT1), foi constatada a presença de xantoma. O consumo da dieta por mais oito semanas (grupo AT2) produziu lesões mais avançadas, caracterizadas pela presença de centro necrótico, proliferação de células musculares lisas, presença maciça de cristais de colesterol e de células inflamatórias (**Figura 6.7**).

Além disto, a análise das lesões dos grupos AT2 e AT/SP revelou a presença maciça de cristais de colesterol por toda a extensão das placas, o que não foi observado nos grupos experimentais, sugerindo que os tratamentos também foram capazes de modificar características morfológicas. No entanto, as modificações mais pronunciadas foram observadas no grupo TOC, no qual se verificaram lesões menos extensas, com alterações degenerativas e necróticas de grau menos intenso.

Nos animais dos grupos TOC e CLA/TOC as lesões foram menores, tendo uma área total 72 % menor para o primeiro e 76 % menor para o segundo grupo. Já os percentuais de obstrução da aorta foram, respectivamente, 52 % e 68 % menores para os grupos TOC e CLA/TOC (**Figuras 6.4 e 6.5**).

Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por CYRUS et al. (2003), nos quais a suplementação com vitamina E, neste mesmo modelo animal, reduziu a progressão das lesões ateroscleróticas. A efetividade da vitamina E foi vista tanto na fase inicial da aterogênese como depois da doença estabelecida.

HASTY et al. (2007) observaram uma tendência de redução da área das lesões ateroscleróticas em camundongos obesos LDLR *-/-* que consumiram vitamina E. Outros autores identificaram também um efeito modesto da suplementação com vitamina E, em camundongos apoE *-/-*, em condições de deficiência pré-existente da vitamina (SUARNA et al., 2006).

Os resultados obtidos estão de acordo com estudos que utilizaram outros modelos animais e que demonstraram os benefícios da suplementação com vitamina E na diminuição da evolução da aterosclerose pré-estabelecida (PELUZIO et al., 2003; KOGA et al., 2004; OTERO et al., 2005). No entanto, os resultados de ensaios clínicos

e epidemiológicos são conflitantes quanto à suplementação de vitamina E em seres humanos (BUIJSSE et al., 2005; CARRERO et al., 2005).

Os resultados das análises de colesterol sugerem que as diferenças no tamanho das lesões ateroscleróticas não estejam relacionadas com alterações nos níveis hepáticos de colesterol. Entretanto, podem ter relação com o perfil de lipídios séricos ou com a excreção fecal de colesterol. Desta forma, a maior excreção de colesterol observada no grupo TOC pode ter contribuído para a redução da progressão da aterosclerose.

Por outro lado, no grupo CLA, as concentrações elevadas de colesterol total e de LDL podem ter favorecido o desenvolvimento das lesões; já que na promoção da aterosclerose parece ser obrigatório um estado persistente de hipercolesterolemia, com concentrações de colesterol total superiores a 300 mg/dL (GETZ e REARDON, 2006).

Apesar da suplementação isolada com 10*t*-12*c*-CLA não ter tido efeito na redução do desenvolvimento das lesões, a sua associação com a vitamina E foi mais eficiente que a vitamina E sozinha (resultados não significantes estatisticamente).

Os estudos que demonstraram os efeitos benéficos das misturas de isômeros do CLA ou dos seus principais isômeros individualmente, no desenvolvimento e na regressão de lesões ateroscleróticas precoces foram realizados com diferentes modelos experimentais em relação ao nosso (MITCHELL et al., 2005; TOOMEY et al., 2006; WILSON et al., 2006).

MUNDAY et al. (1999) demonstraram um aumento significativo da formação de estrias gordurosas na aorta, em camundongos C57BL/6, após o consumo de misturas isoméricas de CLA. E, mais recentemente, o isômero 10*t*,12*c*-CLA foi relacionado com a promoção da aterogênese em camundongos apoE -/- (ARBONÉS-MAINAR et al., 2006) e em hamsters (WILSON et al., 2006).

Em coelhos, tanto o isômero 9*c*,11*t*-CLA como o 10*t*,12*c*-CLA tiveram efeitos semelhantes na redução do desenvolvimento e na regressão de lesões pré-estabelecidas na aorta (KRITCHEVSKY et al., 2004).

Vale ressaltar que, além da quantidade de CLA e colesterol na dieta, o modelo animal de experimentação é um determinante considerável dos efeitos observados na aterosclerose (KRITCHEVSKY et al., 2004). ROSELAAR et al. (1996) observaram grandes diferenças nas características morfológicas e morfológicas das lesões ateroscleróticas entre camundongos apoE -/- e LDLR -/-, sendo que nos primeiros as lesões foram mais avançadas.

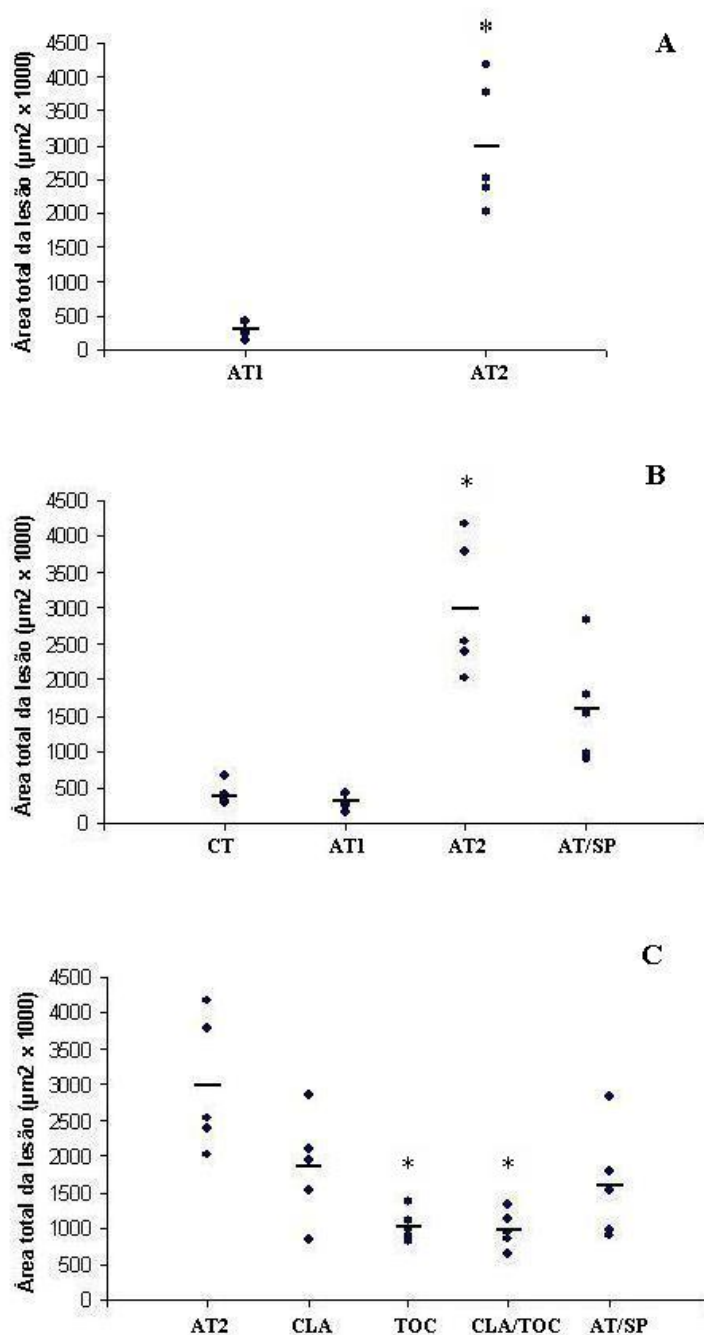


Figura 6.4 – Avaliação morfométrica da maior lesão aterosclerótica de camundongos LDLR $-/-$.

Os círculos representam medidas individuais ($n = 5$ para cada grupo) e os traços representam as médias. **Grupo CT** – dieta semipurificada / **Grupo AT1** – dieta aterogênica (6 semanas) / **Grupo AT2** – dieta aterogênica (14 semanas) / **Grupo CLA** – dieta semipurificada + 1% de $10t,12c$ -CLA/ **Grupo TOC** – dieta semipurificada + 1% de acetato de vitamina E/ **Grupo CLA/TOC** – dieta semipurificada + 1% de $10t,12c$ -CLA + 1% de acetato de vitamina E/ **Grupo AT/SP** – dieta aterogênica (fase de indução) e dieta semipurificada (fase de tratamento). [*] $p < 0,05$; **A** – AT1 x AT2 (teste t pareado); **B** – CT x AT1 x AT2 x AT/SP (ANOVA/Tukey) e **C** – AT2 x CLA x TOC x CLA/TOC x AT/SP (ANOVA/Tukey).

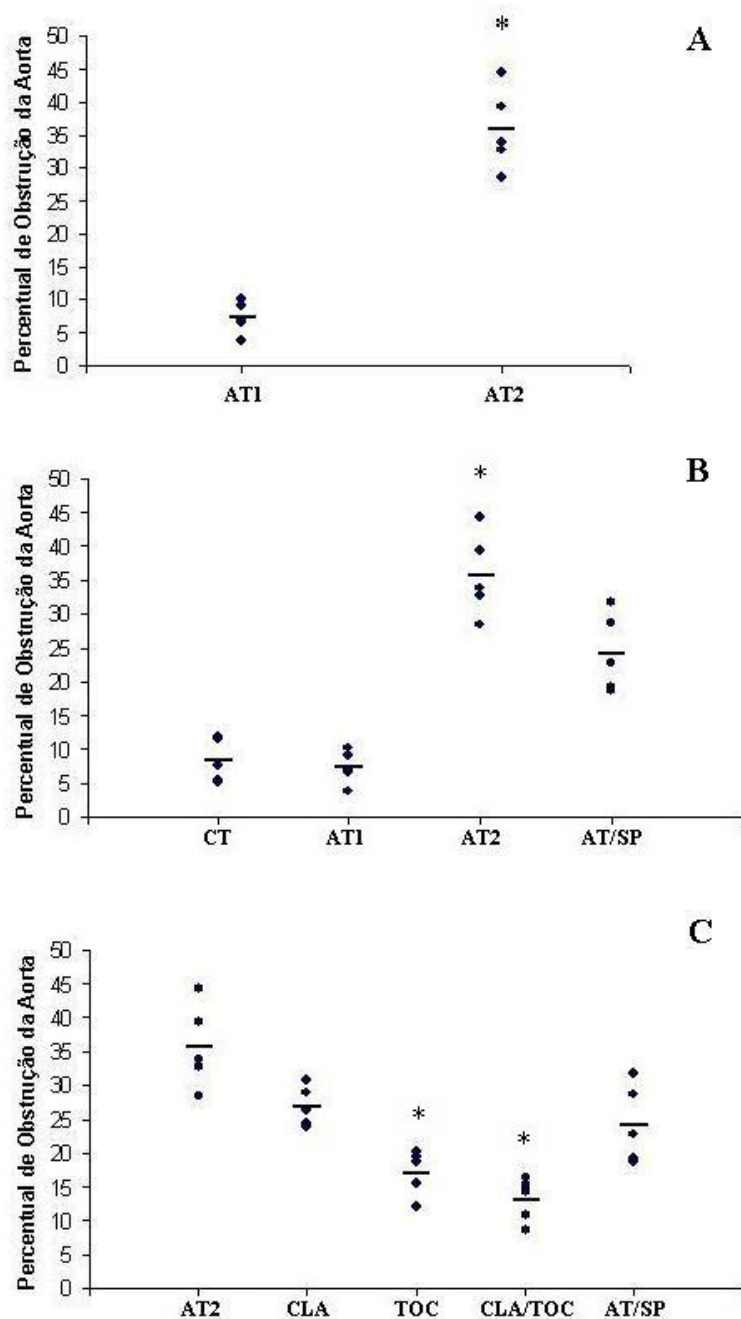


Figura 6.5 – Percentual de obstrução da aorta de camundongos LDLR^{-/-}.

Os círculos representam medidas individuais (n = 5 para cada grupo) e os traços representam as médias. **Grupo CT** – dieta semipurificada / **Grupo AT1** – dieta aterogênica (6 semanas) / **Grupo AT2** – dieta aterogênica (14 semanas) / **Grupo CLA** – dieta semipurificada + 1% de 10*t*,12*c*-CLA/ **Grupo TOC** – dieta semipurificada + 1% de acetato de vitamina E/ **Grupo CLA/TOC** – dieta semipurificada + 1% de 10*t*,12*c*-CLA + 1% de acetato de vitamina E/ **Grupo AT/SP** – dieta aterogênica (fase de indução) e dieta semipurificada (fase de tratamento). [*] p<0,05; **A** – AT1 x AT2 (teste *t* pareado); **B** – CT x AT1 x AT2 x AT/SP (ANOVA/Tukey) e **C** – AT2 x CLA x TOC x CLA/TOC x AT/SP (ANOVA/Tukey).

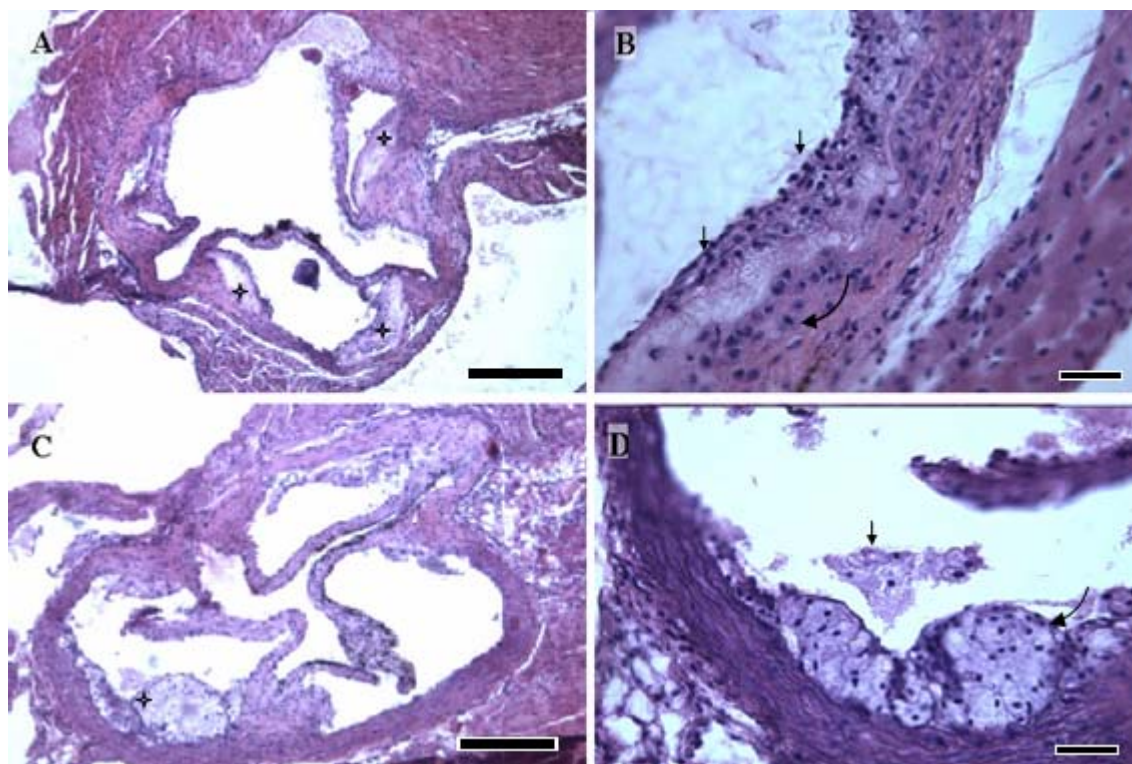


Figura 6.6 – Seções histológicas da aorta proximal de camundongos LDLR $-/-$.

Em **A**, aspecto histológico da aorta de camundongos alimentados com dieta semipurificada (CT), mostrando deposição lipídica inicial (estrela). Em **B**, detalhe da estria gordurosa em fase inicial, com início de deposição de células espumosas (seta curva). Observa-se endotélio íntegro (setas pequenas). Em **C**, aspecto histológico da lesão precoce de camundongos alimentados durante seis semanas com dieta aterogênica (estrela). Em **D** (detalhe de C), observa-se a presença de xantoma, com espessamento localizado na camada íntima, deposição de células espumosas (setas curvas) e debris celulares (seta pequena). (A e C: barra = 100 μ m; B e D: barra = 20 μ m).

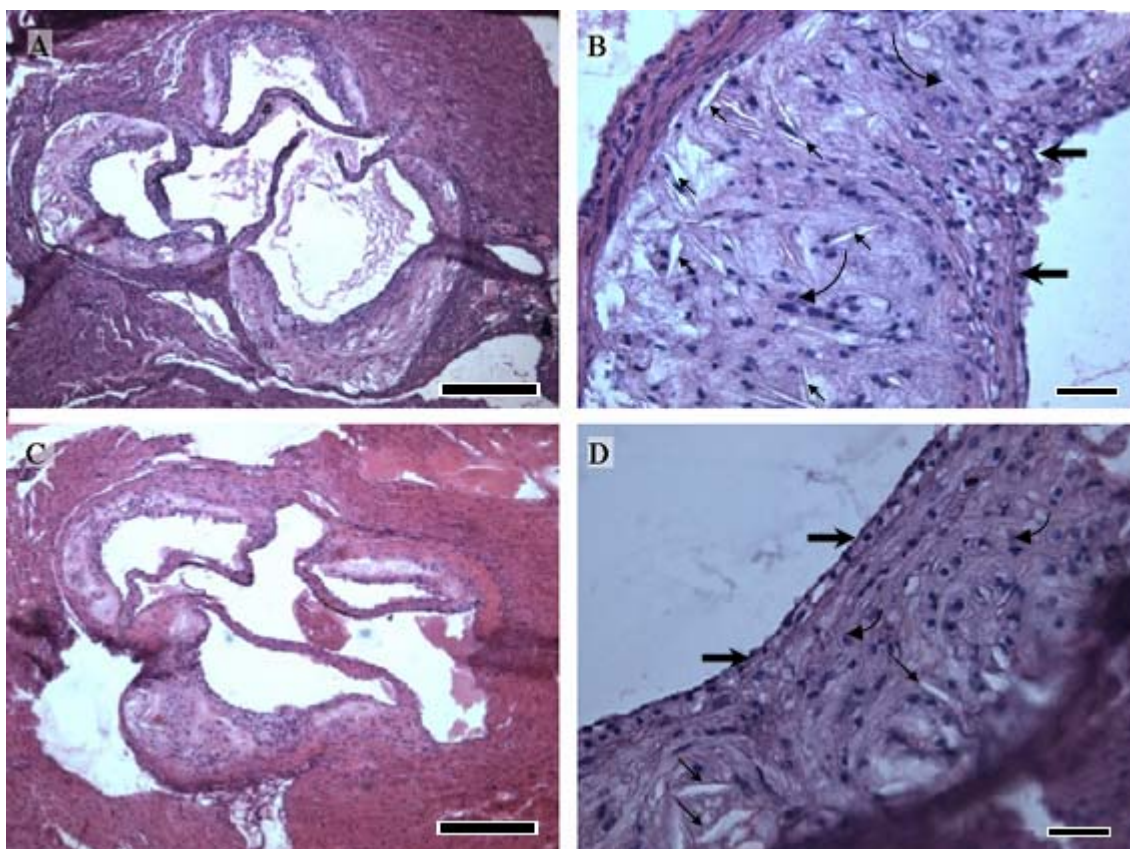


Figura 6.7 – Seções histológicas da aorta proximal de camundongos LDLR $-/-$.

Em **A**, lesão aterosclerótica de camundongos alimentados com dieta aterogênica, após quatorze semanas. Em **B** (detalhe de **A**), verifica-se a presença de xantoma, caracterizado por espessamento localizado na íntima, com deposição de células espumosas (setas curvas). Observa-se migração de células musculares lisas com início de formação de capa fibrosa (setas grossas), além da presença de cristais de colesterol em toda a extensão do xantoma (setas pequenas). Em **C**, aspecto da lesão de camundongo do grupo AT/SP. Em **D** (detalhe de **C**), observa-se endotélio íntegro (setas grossas), presença de cristais de colesterol (setas pequenas) e acúmulo de células espumosas (setas curvas). (**A e C**: barra = 100 μm ; **B e D**: barra = 20 μm).

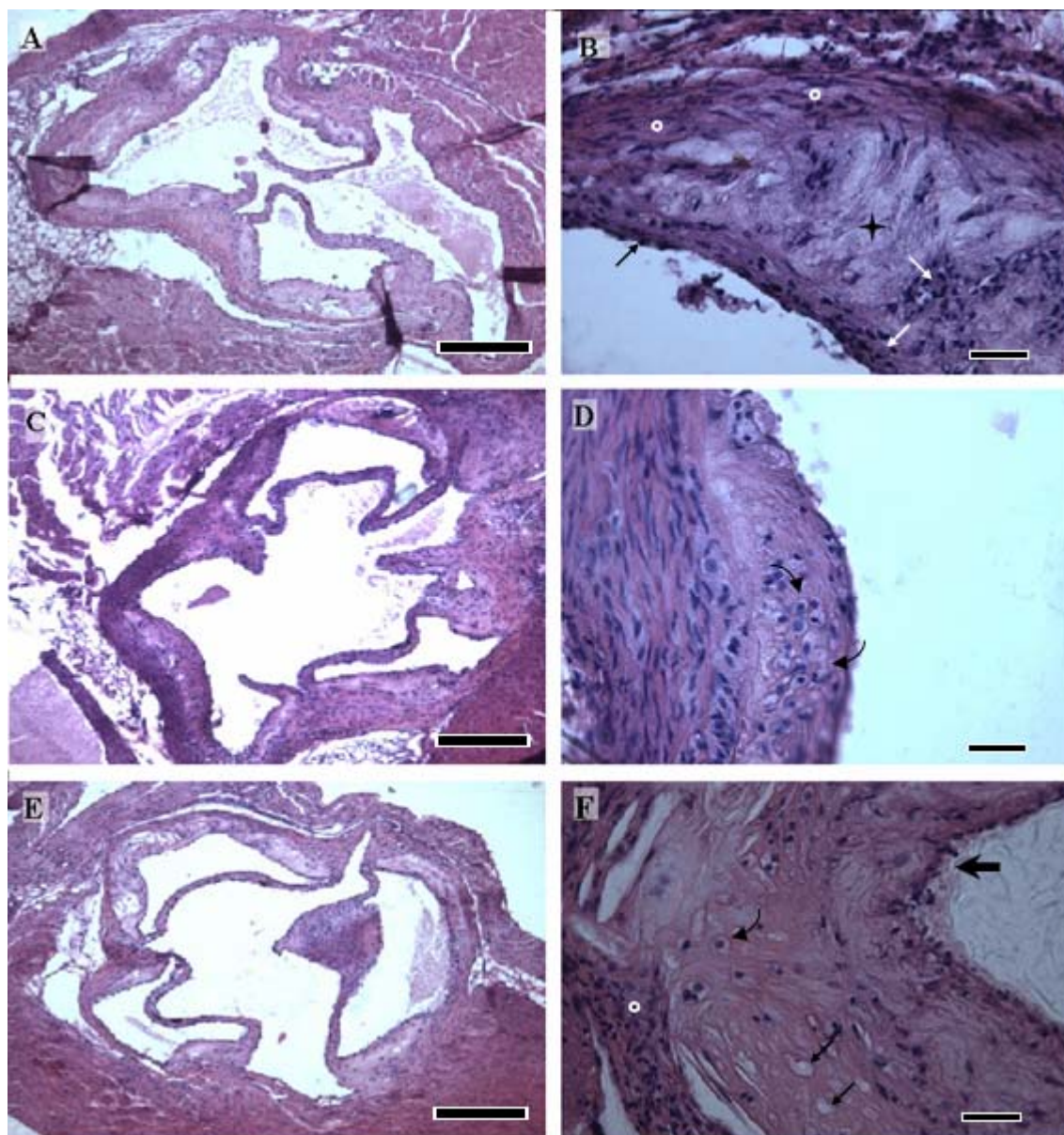


Figura 6.8 – Seções histológicas da aorta proximal de camundongos LDLR $-/-$, após oito semanas de tratamento com CLA e/ou com vitamina E.

Em **A**, aspecto histológico da lesão do grupo CLA. Em **B**, detalhe da lesão, caracterizada por centro lipídico (estrela) e pela presença de núcleos de células inflamatórias no entorno e no interior da placa (setas brancas). Observa-se endotélio preservado (seta pequena) e atividade proliferativa de células musculares lisas (círculos brancos). Em **C**, aspecto histológico da aorta de animal do grupo TOC. No detalhe (**D**), verifica-se lesão menos extensa que a anterior, com alterações degenerativas e necróticas de grau menos intenso, com presença de células espumosas (setas curvas). Em **E**, aspecto da aorta de animal do grupo CLA/TOC. No detalhe (**F**) observa-se a camada muscular lisa íntegra (círculo branco) e endotélio preservado (seta grossa). Verifica-se a presença de vacúolos lipídicos (setas pequenas) com células espumosas (setas curvas). (**A, C e E**: barra = 100 μ m; **B, D e F**: barra = 20 μ m).

6.4 Conclusões

Ao contrário dos resultados encontrados em estudos com outros modelos animais para aterosclerose, o 10*t*,12*c*-CLA não reduziu a progressão da aterosclerose em camundongos LDLR -/-.

A suplementação da vitamina E isoladamente reduziu a progressão de lesões ateroscleróticas pré-estabelecidas na aorta. E quando associada ao 10*t*,12*c*-CLA, esta redução foi maior em termos absolutos, apesar de não apresentar diferença estatisticamente significativa. Vale ressaltar que este resultado não indica um potencial sinérgico entre os compostos, mas sim uma relação com o perfil de lipídios séricos e com a excreção de colesterol.

Sugere-se que mais estudos sejam conduzidos nesta área para avaliar se há algum efeito diferente do isômero 9*c*,11*t*-CLA no desenvolvimento da aterosclerose neste modelo experimental.

7 ARTIGO ORIGINAL II

Perfil de ácidos graxos teciduais não é alterado pelo consumo de 10*t*,12*c*-CLA e de vitamina E em camundongos LDLR -/-

Resumo:

Introdução: A utilização de compostos antioxidantes pode proteger os ácidos graxos insaturados contra a oxidação, permitindo que eles desempenhem integralmente seus papéis biológicos. É importante, por conseguinte, avaliar a incorporação tecidual, especialmente dos ácidos graxos não sintetizados pelo organismo, como por exemplo, os ácidos graxos essenciais e os isômeros de configuração *trans*. Os diferentes efeitos relatados a respeito dos CLA podem ser resultantes das interações dos seus isômeros biologicamente ativos com diversas rotas metabólicas de sinalização. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi verificar a incorporação tecidual do isômero 10*t*,12*c*-CLA, quando suplementado isoladamente ou em associação com a vitamina E. **Materiais e métodos:** Camundongos LDLR -/- foram alimentados com dieta semipurificada ou hiperlipídica, durante seis semanas. Após este período, os animais foram alimentados por oito semanas com dieta semipurificada suplementada com 1 % de vitamina E, 1 % de 10*t*,12*c*-CLA ou com 1 % de vitamina E + 1 % de 10*t*,12*c*-CLA. Foram avaliados a peroxidação dos lipídios hepáticos e o perfil de ácidos graxos do fígado, do tecido adiposo peri-renal e do intestino delgado. **Resultados:** Houve maior formação de hidroperóxidos lipídicos nos fígados dos animais do grupo TOC. A suplementação com CLA ou com a associação de CLA com vitamina E promoveram maior estabilidade oxidativa aos lipídios hepáticos. Os perfis de ácidos graxos dos tecidos refletiram a composição de ácidos graxos das dietas. Entretanto, em nenhum dos tecidos analisados foi possível identificar a incorporação do 10*t*,12*c*-CLA. **Conclusões:** A utilização de vitamina E em alta concentração pode ter contribuído para o aumento da peroxidação dos lipídios hepáticos. Provavelmente, a não identificação do isômero 10*t*,12*c*-CLA nos tecidos analisados pode ser atribuída à sua metabolização antes de ser captado pelos tecidos.

Palavras-chave: ácido linoléico conjugado, cromatografia gasosa, ácidos graxos, antioxidantes.

7.1 Introdução

Desde os primeiros relatos da associação dos ácidos graxos *trans* com o desenvolvimento das doenças cardiovasculares (WILLET et al., 1993), investigações buscaram identificar as evidências clínicas e experimentais dos mecanismos que justificam tais resultados epidemiológicos (ALLISON et al., 1995; ASCHERIO et al., 1994). No entanto, alguns estudos apresentaram efeitos positivos de isômeros específicos, particularmente os isômeros conjugados do ácido linoléico, coletivamente denominados CLA (LEE et al., 1994; NICOLOSI et al., 1997).

Os principais isômeros biologicamente ativos do CLA são o *9c,11t*-CLA e o *10t,12c*-CLA. O isômero *9c,11t*-CLA é a forma natural mais abundante de CLA (PARODI, 1977), enquanto o *10t,12c*-CLA é encontrado em quantidades menores nas fontes naturais, mas em quantidades substanciais nas preparações comerciais (BAUMAN e GRINARI, 2001).

Os efeitos fisiológicos relatados sobre o CLA podem ser resultantes das interações dos seus isômeros biologicamente ativos com diversas rotas metabólicas de sinalização (DE LA FUENTE et al., 2006). Daí, a importância de se avaliar a incorporação destes ácidos graxos em tecidos específicos.

A separação, identificação e quantificação dos isômeros do CLA são desafios analíticos consideráveis, principalmente em produtos lácteos e em amostras biológicas (DE LA FUENTE et al., 2006).

As técnicas cromatográficas de separação de ácidos graxos evoluíram bastante nos últimos anos. Entretanto, de acordo com SEPPÄNEN-LAAKSO et al. (2002), as amostras lipídicas que contêm misturas de isômeros geométricos e de posição de determinados ácidos graxos são as principais causas da maioria dos problemas de identificação, pela dificuldade de separação destes compostos. Na análise de ácidos graxos por cromatografia gasosa, as colunas capilares muito polares são capazes de separar vários isômeros do CLA e do C18:1 (MOSSOBA, 2001).

Assim como os demais ácidos graxos insaturados, os ácidos linoléicos conjugados também estão sujeitos à oxidação. Desta forma, segundo BALL (1998), a utilização de compostos antioxidantes pode proteger estes ácidos graxos contra a oxidação, permitindo que desempenhem integralmente seu papel biológico.

Os compostos com atividade de vitamina E, principalmente o α -tocoferol, são potentes antioxidantes das moléculas lipídicas (UPSTON et al., 1999). Neste sentido, o α -tocoferol tem sido amplamente utilizado na tentativa de minimizar os efeitos deletérios decorrentes da oxidação dos lipídios, particularmente, no desenvolvimento da aterosclerose (JACHÉC et al., 2003; van AALST et al., 2004; ZHAO et al., 2005).

O objetivo deste estudo foi verificar a incorporação tecidual do isômero 10*t*,12*c*-CLA, quando suplementado isoladamente ou em associação com a vitamina E.

7.2 Materiais e Métodos

7.2.1 Animais e Dietas

Foram utilizados camundongos LDLR $-/-$, modelos para hipercolesterolemia familiar, procedentes do biotério do Laboratório de Bioquímica Nutricional (LABIN), do Departamento de Bioquímica e Imunologia, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de aço inoxidável, em ambiente com temperatura controlada ($21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo de 12 horas.

Os animais do grupo controle receberam dieta semipurificada e os animais dos grupos experimentais foram divididos em quatro grupos:

- AT2: dieta hiperlipídica + 1 % de colesterol;
- CLA: dieta semipurificada + 1% de 10*t*,12*c*-CLA;
- TOC: dieta semipurificada + 1% de acetato de vitamina E;
- CLA/TOC: dieta semipurificada + 1% de 10*t*,12*c*-CLA + 1% de acetato de vitamina E.

As cápsulas de CLA foram gentilmente cedidas pela empresa Rainha Laboratório Nutracêutico Ltda. e continham, em média, $62,70 \pm 2,60$ mg de 10*t*,12*c*-CLA/100 mg de óleo.

O consumo das dietas foi monitorado diariamente e a evolução do peso, semanalmente, para o cálculo do coeficiente de eficácia alimentar (ABDULLAH e OTHMAN, 2000). Durante todo o período experimental, os animais receberam água e dieta *ad libitum*, exceto no período de 12 horas anteriores à eutanásia, quando foram colocados em jejum.

O tecido adiposo peri-renal, o fígado e o intestino delgado foram removidos, lavados em PBS, congelados em nitrogênio líquido e mantidos a 80 °C negativos.

O trabalho seguiu as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA (1991).

7.2.2 Avaliação da peroxidação lipídica

A medida do grau de peroxidação dos lipídios hepáticos foi realizada pelo método FOX-2 (NOUROOZ-ZADEH et al., 1994).

7.2.3 Análise dos lipídios

7.2.3.1 Extração dos lipídios

Os lipídios dos órgãos, tecidos e dietas, foram extraídos pelo método de FOLCH et al. (1957). Os extratos lipídicos foram esterificados para obtenção dos ésteres metílicos dos ácidos graxos, utilizando o método CBA (*Combined base- and acid-catalyzed methylation method*), descrito por YU et al. (2003).

7.2.3.2 Identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos

A identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa, comparando-se os tempos de retenção dos ésteres presentes nas amostras com os dos padrões: FAME mix (Supelco[®], EUA), 10*t*,12*c*-CLA, 9*c*,11*t*-CLA e 9*t*,11*t*-CLA (Matreya[®], EUA). O ácido tridecanóico (Sigma-Aldrich[®], EUA) foi utilizado como padrão interno.

Utilizou-se cromatógrafo a gás GC-17A Shimadzu/Class GC, equipado com detector de ionização de chama e com coluna cromatográfica de sílica fundida SP-2560 (*Biscyanopropil polysiloxane*) de 100 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno.

As temperaturas do detector e do injetor foram iguais a 240 °C. A temperatura da coluna variou da seguinte forma: início a 70 °C, permanecendo nesta temperatura por 4 minutos; aquecimento até 100 °C, a uma taxa de 5 °C por minuto; aquecimento até 175 °C, a uma taxa de 10 °C por minuto, permanecendo nesta temperatura por 20

minutos; aquecimento até 225 °C, a uma taxa de 5 °C por minuto, permanecendo nesta temperatura por 27,5 minutos. O tempo total da programação foi de 75 minutos.

O gás de arraste foi o nitrogênio, com fluxo da coluna de 1,47 mL/minuto, velocidade linear de 22,96 cm/segundo, split de 1:20, fluxo total de 35 mL/minuto e pressão da coluna de 257 Kpa.

7.2.4 Análise Estatística

Foi utilizado o software SigmaStat[®], versão 3.0, para a análise estatística. O teste de normalidade empregado foi o de *Kolmogorov-Smirnov*. Para as comparações entre três ou mais grupos independentes, foi realizada a análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey e, quando os dados não apresentaram distribuição normal, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de Dunn's.

O nível de significância utilizado foi de 95 %, com o valor de $p < 0,05$. Os resultados foram expressos como mediana ou como média \pm desvio-padrão.

7.3 Resultados e Discussão

7.3.1 Ganho de peso e consumo alimentar

As dietas experimentais não interferiram na evolução do ganho de peso (**Figura 7.1**) e no ganho de peso total dos animais, contudo, o consumo alimentar foi menor no grupo AT (**Tabela 7.1**).

Observou-se que em função da alta densidade energética da dieta aterogênica, os animais do grupo AT2 tiveram um menor consumo alimentar quando comparados aos animais que consumiram os outros tipos de dieta (isoenergéticas), mantendo, desta forma, pesos semelhantes. VALEILLE et al. (2005) encontraram resultados semelhantes em hamsters.

Os valores do coeficiente de eficácia alimentar confirmaram os resultados anteriores, indicando um menor consumo de dieta pelo grupo AT2, já que a conversão alimentar foi maior neste grupo ($p < 0,05$).

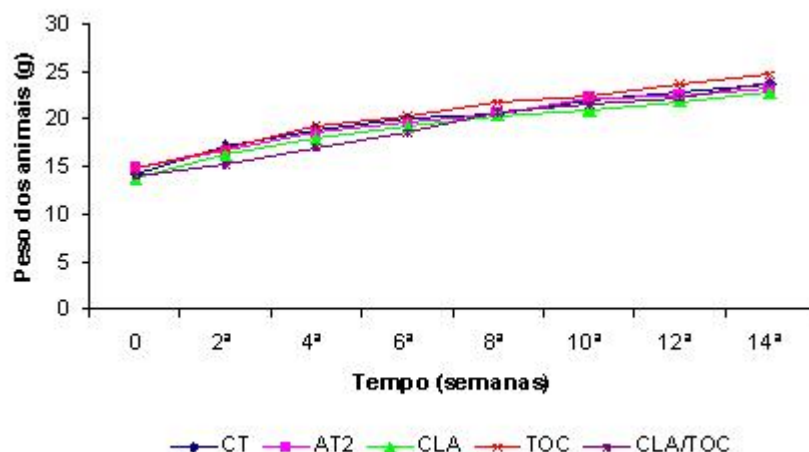


Figura 7.1 – Evolução do peso dos animais dos grupos controles e experimentais.

Grupo CT – dieta semipurificada / **Grupo AT2** – dieta aterogênica/ **Grupo CLA** – dieta semipurificada + 1% de 10*t*,12*c*-CLA/ **Grupo TOC** – dieta semipurificada + 1% de acetato de vitamina E/ **Grupo CLA/TOC** – dieta semipurificada + 1% de 10*t*,12*c*-CLA + 1% de acetato de vitamina E.

Tabela 7.1 – Peso corporal e consumo alimentar dos grupos controles e experimentais.

	GRUPOS				
	CT	AT2	CLA	TOC	CLA/TOC
Peso (g)					
Início	14,2 ± 1,1	14,7 ± 2,1	13,7 ± 1,7	14,9 ± 1,5	14,0 ± 2,3
Final	23,7 ± 2,3	23,1 ± 1,4	22,9 ± 2,5	24,5 ± 2,4	23,8 ± 4,2
CEA[†]					
Fase I	2,5 ± 0,5	3,5 ± 1,1*			
Fase II	0,9 ± 0,5	1,4 ± 0,5	0,9 ± 0,6	1,0 ± 0,6	1,5 ± 0,8
CEA_{AL}					
Fase I	0,4 ± 0,1	0,09 ± 0,03*			
Fase II	0,13 ± 0,1	0,04 ± 0,01*	0,10 ± 0,05 [#]	0,10 ± 0,04 [#]	0,12 ± 0,1 [#]

Grupo CT – dieta semipurificada / **Grupo AT2** – dieta aterogênica/ **Grupo CLA** – dieta semipurificada + 1% de 10*t*,12*c*-CLA/ **Grupo TOC** – dieta semipurificada + 1% de acetato de vitamina E/ **Grupo CLA/TOC** – dieta semipurificada + 1% de 10*t*,12*c*-CLA + 1% de acetato de vitamina E/ **CEA** – Coeficiente de Eficácia Alimentar / **CEA_{AL}** – Coeficiente de eficácia alimentar aparente dos lipídios. Resultados expressos como média ± desvio-padrão. [*] p<0,05 vs. grupo CT; [#] p< 0,05 vs. grupo AT / Análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

$$\dagger \text{CEA} = \frac{\text{ganho de peso (g)}}{\text{consumo de dieta (g)}}$$

Foi avaliado também o coeficiente de eficácia alimentar aparente dos lipídios (CEA_{AL}) (Tabela 7.1). Verificou-se que as diferenças entre os coeficientes de eficácia alimentar podem ser atribuídas à ingestão de lipídios, uma vez que um menor consumo

de gordura pelo grupo AT2 resultou em uma evolução ponderal semelhante aos outros grupos.

7.3.2 Hidroperóxidos hepáticos

No fígado dos animais do grupo TOC foram encontradas as maiores concentrações de hidroperóxidos lipídicos (**Figura 7.2**). Com exceção deste grupo, os demais grupos experimentais apresentaram concentrações hepáticas de hidroperóxidos semelhantes ao controle.

Aparentemente, na concentração utilizada, a suplementação dietética com vitamina E teve um efeito pró-oxidante dos lipídios hepáticos ($p < 0,05$) considerando os valores de hidroperóxidos hepáticos mais elevados quando comparados com os valores obtidos para os animais do grupo controle. Ao contrário, a suplementação isolada com 10*t*,12*c*-CLA, bem como a sua associação com vitamina E, conferiram maior estabilidade oxidativa aos lipídios hepáticos.

Ao contrário do observado em nosso estudo, outros pesquisadores têm atribuído ao α -tocoferol a capacidade de prevenir a formação de hidroperóxidos lipídicos no fígado (BANUDEVI et al., 2006) e em cultura de células HepG2 (IGARASHI e MIYAZAWA, 2001). Contudo, IGARASHI e MIYAZAWA (2001), em consonância com resultados deste estudo, encontraram uma menor formação de hidroperóxidos lipídicos em células HepG2 tratadas com CLA + α -tocoferol.

Outros autores também têm relatado o efeito pró-oxidante da vitamina E quando utilizada em altas dosagens (OHKAWA et al., 2004; McANULTY et al., 2005). De acordo com SETIADI et al. (2003), como a vitamina E é reciclada biologicamente, uma molécula de α -tocoferol pode converter numerosos radicais HOO• em H₂O₂. Estes peróxidos, se não forem removidos enzimaticamente na mesma taxa de sua formação, ficam acumulados nas células; sendo esta a possível causa do efeito pró-oxidante da vitamina E. Desta forma, a alta concentração de vitamina E utilizada em nosso estudo pode ter contribuído para o aumento da peroxidação dos lipídios hepáticos.

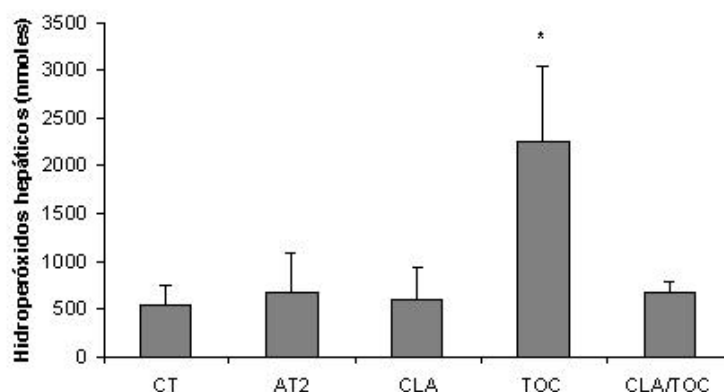


Figura 7.2 – Concentração hepática de hidroperóxidos lipídicos dos grupos controles e experimentais.

Grupo CT – dieta semipurificada / **Grupo AT2** – dieta aterogênica/ **Grupo CLA** – dieta semipurificada + 1% de 10*t*,12*c*-CLA/ **Grupo TOC** – dieta semipurificada + 1% de acetato de vitamina E/ **Grupo CLA/TOC** – dieta semipurificada + 1% de 10*t*,12*c*-CLA + 1% de acetato de vitamina E/ Resultados expressos como média ± desvio-padrão. [*] $p < 0,05$ vs. grupo CT / Análise de variância (ANOVA), complementado pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

7.3.3 Perfil de ácidos graxos teciduais

A deposição de ácidos graxos nos tecidos varia em função da quantidade de energia ingerida e da composição de lipídios da dieta (CHA e JONES, 1996). Os perfis de ácidos graxos das dietas são apresentados na **Tabela 7.2**.

Para a quantificação dos ácidos graxos, quando não foi possível identificar os isômeros geométricos e de posição, optou-se por fazer o somatório das concentrações destes compostos. Este procedimento foi adotado para a quantificação dos isômeros do C16:1.

Apesar de ser possível obter uma resolução com qualidade razoável dos espectros utilizando cromatografia gasosa com colunas capilares (MOSSOBA, 2001) não foi possível separar os isômeros do C18:2. Neste caso, também se optou por apresentar o somatório destes ácidos graxos.

Nenhum dos tratamentos produziu grandes modificações na composição de ácidos graxos e na proporção entre AGS, AGMI e AGPI nos tecidos analisados (**Figura 7.3; Tabelas 7.3, 7.4 e 7.5**). A composição de ácidos graxos de todos estes tecidos refletiu o conteúdo fornecido nas dietas, no entanto, em nenhum deles foi possível identificar a incorporação de 10*t*,12*c*-CLA.

Tabela 7.2 – Perfil de ácidos graxos das dietas controle e experimentais.

Ácidos graxos (%)	CT		AT		CLA		TOC		CLA/TOC	
	Mediana	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	Média ± DP
C14:0	2,11	1,60 ± 0,86	1,42	1,38 ± 0,07	0,43	0,47 ± 0,10	0,76	0,74 ± 0,04	n.d.	n.d.
C16:0	12,59	11,92 ± 1,93	22,76	22,94 ± 0,32	10,76	10,66 ± 0,19	4,81	4,70 ± 0,37	11,02	10,91 ± 0,35
C18:0	3,72	3,60 ± 0,22	9,53	9,85 ± 0,56	3,44	3,38 ± 0,12	3,56	3,56 ± 0,05	3,33	3,32 ± 0,11
Σ Saturados	18,48	17,12 ± 2,11	33,70	34,17 ± 0,81	14,68	14,51 ± 0,38	9,01	11,36 ± 4,43	14,35*	14,22 ± 0,46
ΣC16:1	n.d.	n.d.	2,05	2,08 ± 0,05	n.d.	n.d.	7,22	5,15 ± 4,30	n.d.	n.d.
C18:1 n9	22,29	22,17 ± 0,17	43,48	43,26 ± 0,39	21,83	22,13 ± 0,86	21,94	22,14 ± 0,40	22,53	22,56 ± 0,13
Σ Monoinsaturados	22,29	22,17 ± 0,17	45,53	45,33 ± 0,34	21,83	22,13 ± 0,86	29,82	27,29 ± 4,45	22,53	22,56 ± 0,13
Σ C18:2	55,01	56,07 ± 1,62	19,59	19,33 ± 0,45	57,80	57,60 ± 1,12	55,36	55,33 ± 0,32	57,71	57,69 ± 0,31
C18:3 n3	6,27	6,11 ± 0,39	n.d.	n.d.	5,84	5,95 ± 0,19	5,87	6,02 ± 0,32	5,50	5,53 ± 0,06
Σ Poliinsaturados	61,3	62,18 ± 1,24	19,59	19,33 ± 0,45	63,97	63,55 ± 1,17	61,38	61,35 ± 0,17	63,20	63,22 ± 0,36

CT - dieta semipurificada/ AT – dieta aterogênica/ CLA - dieta semipurificada + 1% de CLA/ TOC – dieta semipurificada + 1% de acetato de vitamina E/ CLA/TOC – dieta semipurificada + 1% de CLA + 1% de acetato de vitamina E/ n.d. – não detectado. Valores expressos em mediana (média ± desvio-padrão).

De acordo com ALDAI et al. (2006), a despeito de todos os métodos empregados nas análises da composição de ácidos graxos em tecidos animais, existem opiniões contraditórias sobre o método mais satisfatório e apropriado para superar as dificuldades apresentadas nas análises de misturas complexas, incluindo os isômeros do CLA.

A cromatografia gasosa (CG) é o método clássico utilizado nestas análises. Para isto, são necessárias colunas de grande extensão e programações com duração superior a 50 minutos. Além disto, os ácidos graxos necessitam passar por uma etapa de metilação antes de serem analisados por CG (LIU et al., 2005). Desta forma, a escolha da programação e do método de metilação deve ser feita com diligência.

Neste estudo, foram preenchidos os requisitos necessários para a separação de CLA por CG, incluindo a utilização de uma coluna capilar de 100 metros de comprimento e o tempo programado para a separação (75 minutos). Inclusive o método de metilação escolhido foi adequado segundo YU et al. (2003).

Estudos têm demonstrado a deposição de isômeros do CLA em células plasmáticas (BURDGE et al., 2004) e em diversos tecidos (GÖTTSCHE e STRAARUP, 2006), porém, segundo KELLEY et al. (2006), o isômero *9c,11t*-CLA é preferencialmente incorporado em detrimento do *10t,12c*-CLA.

A baixa biodisponibilidade do isômero *10t,12c*-CLA na forma livre ou a sua rápida metabolização no organismo dos animais são alternativas que podem explicar a não identificação deste composto nas amostras analisadas.

Existem evidências de que a posição do CLA no triacilglicerol altera a sua biodisponibilidade, sendo que, quando este ácido graxo ocupa a posição *sn-2* na cadeia do glicerol, a sua incorporação tecidual é superior (CHARDIGNY et al., 2003).

Além disto, há diferenças na incorporação tecidual dos isômeros individuais do CLA. Três alternativas podem explicar este fato: a captação preferencial quando em concentrações elevadas, a rápida metabolização e a discriminação da sua captação quando em baixas concentrações (GNÄDIG, 2002).

Há indicações de que os isômeros do CLA sejam rapidamente metabolizados nas células, formando ácidos graxos com cadeias de diferentes comprimentos, contendo uma estrutura dieno-conjugada (BANNI et al., 2004; MÜLLER et al., 2005).

Supõe-se que estes metabólitos sejam originados dos processos de alongação, dessaturação e β -oxidação mitocondrial do CLA (BANNI et al., 2001; PARK et al., 2005) e, de acordo com RINGSEIS et al. (2006), isto indica que os efeitos antiaterogênicos destes ácidos graxos não sejam atribuídos somente ao CLA, mas também aos seus metabólitos poliinsaturados de cadeia longa.

Para a separação e a identificação destes metabólitos do CLA são necessários métodos mais refinados de análise, como a utilização de um espectrômetro de massa acoplado ao cromatógrafo a gás (MÜLLER et al., 2005; RINGSEIS et al., 2006) ou a separação dos isômeros por Ag⁺-HPLC, antes da sua identificação por CG (KRAMER et al., 2004; DE LA FUENTE et al., 2006).

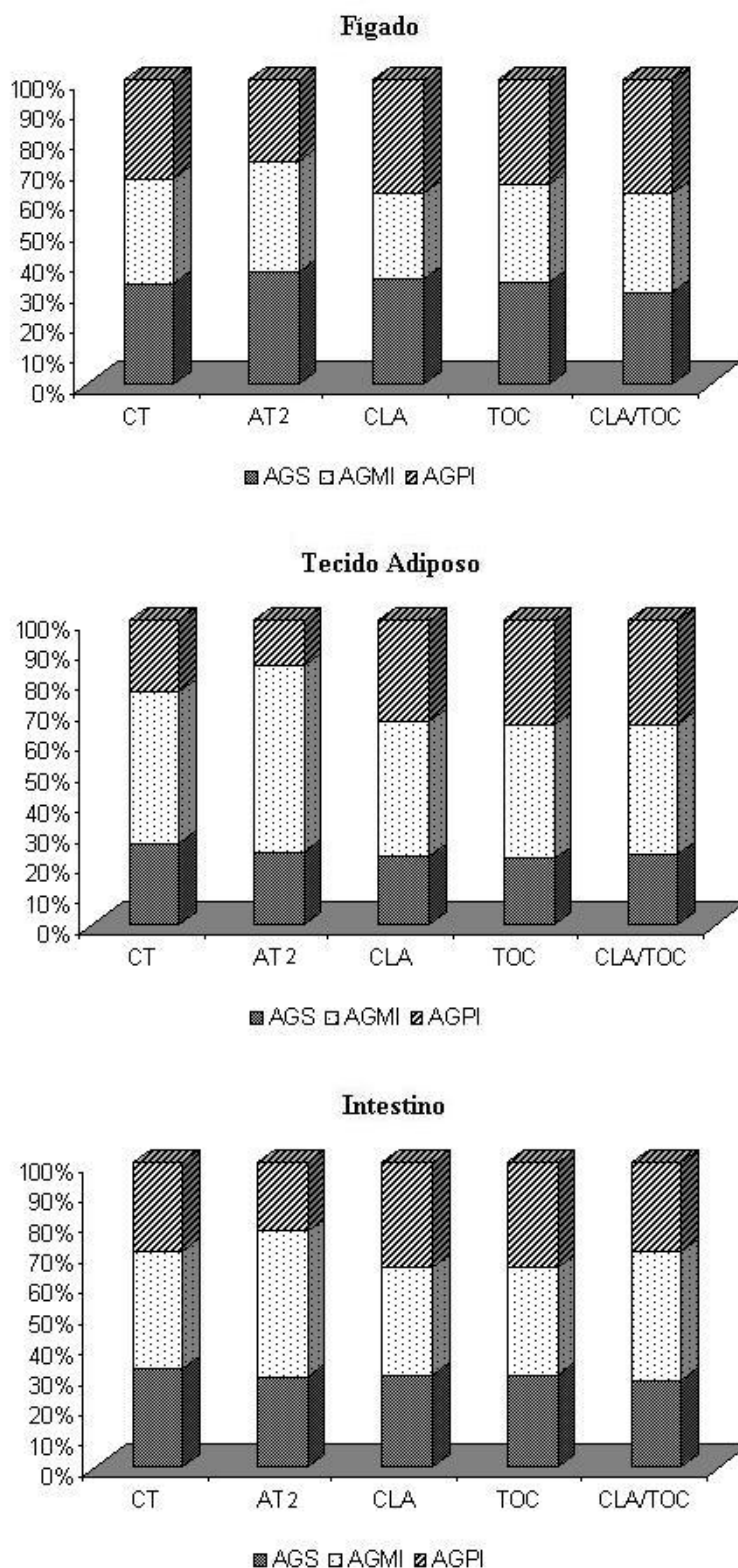


Figura 7.3 – Proporção de ácidos graxos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) e poliinsaturados (AGPI) em diferentes órgãos e tecidos.

Grupo CT – dieta semipurificada / **Grupo AT2** – dieta aterogênica/ **Grupo CLA** – dieta semipurificada + 1% de 10*t*,12*c*-CLA/ **Grupo TOC** – dieta semipurificada + 1% de acetato de vitamina E/ **Grupo CLA/TOC** – dieta semipurificada + 1% de 10*t*,12*c*-CLA + 1% de acetato de vitamina E.

7.3.3.1 Composição de ácidos graxos do fígado

Como esperado, houve uma maior incorporação de ácidos graxos poliinsaturados no fígado dos animais dos grupos experimentais em relação ao grupo AT2 que consumiram uma menor quantidade destes ácidos graxos na dieta (**Figura 7.3; Tabela 7.3**).

Não foi constatada diferença estatisticamente significativa, na proporção de ácidos graxos poliinsaturados no fígado, inclusive do Σ C18:2, embora tenham sido observados valores levemente superiores destes ácidos graxos nos grupos suplementados com CLA. Desta forma, estes resultados sugerem que o metabolismo do CLA teve um papel mais importante do que a interferência da metodologia escolhida para a separação dos isômeros dienóicos com 18 átomos na cadeia carbônica (GNÄDIG, 2002).

A taxa de dessaturação do ácido linoléico da dieta no fígado, medida pela relação C20:4/C18:2, não foi diferente entre os grupos experimentais e o controle. Entretanto, apesar da menor concentração de C18:2 na dieta aterogênica, foi constatado um estímulo à dessaturação neste grupo, que apresentou maior deposição de ácido araquidônico.

Há uma seletividade para a ação da Δ^6 dessaturase, preferencialmente para os ácidos graxos poliinsaturados e entre estes, primeiro o ácido α -linolênico seguido do ácido linoléico. Outra prioridade é a concentração de cada ácido graxo (HORNSTRA, 2001). Considerando que a dieta do grupo AT2 não continha o ácido α -linolênico, pode-se supor que houve maior eficiência de síntese do ácido araquidônico nos animais deste grupo. O estímulo a esta via promove um aumento da disponibilidade de ácido araquidônico para a formação de prostaglandinas, favorecendo a síntese de eicosanóides neste tecido e, conseqüentemente, a resposta inflamatória.

Tabela 7.3 – Perfil de ácidos graxos do tecido hepático dos grupos controles e experimentais.

Ácidos graxos (%)	Grupo CT		Grupo AT2		Grupo CLA		Grupo TOC		Grupo CLA/TOC	
	Mediana	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	Média ± DP
C14:0	5,51	5,15 ± 3,21	10,19	8,05 ± 6,85	9,63	9,13 ± 3,58	8,89	7,46 ± 3,23	0,66*:#	1,23 ± 1,09
C16:0	20,63	20,59 ± 2,49	17,96	18,04 ± 1,53	17,32	17,24 ± 5,27	18,51	19,04 ± 1,69	21,44*	21,71 ± 1,23
C18:0	6,46	6,73 ± 1,46	8,30	8,13 ± 1,36	6,41	6,72 ± 1,27	6,38*	6,22 ± 0,82	5,53	7,39 ± 3,16
Σ Saturados	32,40	32,47 ± 3,02	37,26	34,22 ± 6,34	34,08	33,09 ± 4,53	32,81	32,73 ± 2,53	29,55	30,19 ± 2,55
ΣC16:1	4,61*	4,95 ± 1,40	2,49	2,40 ± 1,05	3,78	3,74 ± 0,64	4,24*	4,11 ± 0,84	4,05	5,29 ± 4,13
C18:1 n9	29,34	28,10 ± 4,95	34,73	33,09 ± 8,44	27,00	26,43 ± 3,74	25,55*	28,54 ± 3,08	26,12	25,66 ± 5,77
Σ Monoinsaturados	34,58	33,69 ± 5,52	37,11	36,27 ± 7,92	30,82	29,74 ± 5,08	32,46	31,03 ± 3,92	31,66	30,82 ± 3,27
Σ C18:2	21,95	21,93 ± 4,06	14,69	14,44 ± 1,66	24,00*	24,52 ± 3,86	22,10*	23,93 ± 4,49	26,25*	23,04 ± 7,78
C18:3 n6	0,69*	0,61 ± 0,25	0,01	0,01 ± 0,01	0,64*	0,66 ± 0,38	0,69*	0,72 ± 0,19	0,73*	0,65 ± 0,18
C18:3 n3	1,21	1,11 ± 0,44	0,01	0,01 ± 0,01	1,21*	1,18 ± 0,22	1,20*	1,26 ± 0,31	1,48*	1,45 ± 0,34
C20:2	0,27	0,79 ± 0,33	0,28	0,15 ± 0,10	0,35	0,15 ± 0,02	n.d.	n.d.	0,16	0,15 ± 0,09
C20:4 n6	8,08*	8,33 ± 0,19	11,78	12,67 ± 2,59	8,75*	19,22 ± 14,48	8,02*	7,93 ± 0,91	7,79*	8,75 ± 3,63
Σ Poliinsaturados	31,97	32,80 ± 5,87	27,08	28,09 ± 3,86	36,66*	36,32 ± 4,90	33,57*	34,34 ± 4,97	36,52*	34,62 ± 6,99
N.I.	1,97	1,60 ± 0,74	1,81	0,95 ± 0,38	3,09	3,88 ± 3,02	3,37*	5,88 ± 3,35	2,72	2,88 ± 1,85

Grupo CT - dieta semipurificada/ **Grupo AT2** – dieta aterogênica/ **Grupo CLA** - dieta semipurificada + 1% de CLA/ **Grupo TOC** – dieta semipurificada + 1% de acetato de vitamina E/ **Grupo CLA/TOC** – dieta semipurificada + 1% de CLA + 1% de acetato de vitamina E/ **N.I.** – não identificado/ **n.d.** – não detectado. Valores expressos em mediana (média ± desvio-padrão). Teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de comparações múltiplas de Dunn's. [*] p<0,05 vs. Grupo AT; [#] p<0,05 vs. Grupo CLA.

7.3.3.2 Composição de ácidos graxos do tecido adiposo peri-renal

De acordo com PERONA et al. (2000), os ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados são preferencialmente armazenados nos triacilgliceróis do tecido adiposo em detrimento dos ácidos graxos saturados.

Em todos os grupos, verificou-se que o armazenamento de gordura no tecido adiposo ocorreu principalmente sob a forma de ácidos graxos monoinsaturados, particularmente no grupo AT2. Já nos grupos experimentais, o armazenamento de C18:1 n9 foi semelhante ao verificado no grupo controle (**Tabela 7.4**).

A incorporação de C18:2 no tecido adiposo não variou entre os grupos experimentais. Mas em todos eles, a deposição de ácidos graxos poliinsaturados foi mais acentuada que nos grupos controles ($p < 0,05$). Como este ácido graxo não é sintetizado em organismos animais, sendo obtido somente pela dieta, o armazenamento provê uma forma de garantir o seu suprimento, quando este não for consumido em quantidades suficientes na dieta.

A incorporação de ácidos graxos saturados foi estatisticamente menor no grupo TOC em relação ao controle (**Figura 7.3**). Apesar de consumirem uma dieta com maior proporção de ácidos graxos saturados, no tecido adiposo dos animais do grupo AT2 a deposição de ácidos graxos foi semelhante aquela observada no grupo controle e nos demais grupos experimentais. Uma alta proporção de ácidos graxos saturados na dieta pode ser convertida em ácidos graxos monoinsaturados, pela via de dessaturação do C18:0 em C18:1 (SUMMERS et al., 2000), já que estes ácidos graxos são preferencialmente armazenados no tecido adiposo (PERONA et al., 2000).

Tabela 7.4 – Perfil de ácidos graxos do tecido adiposo dos grupos controles e experimentais.

Ácidos graxos %	CT		AT2		CLA		TOC		CLA/TOC	
	Mediana	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	Média ± DP
C14:0	2,11	2,45 ± 1,09	3,26	3,26 ± 1,25	2,66	2,34 ± 0,68	2,26	2,06 ± 0,68	2,47	2,31 ± 0,42
C16:0	20,80	20,96 ± 0,96	18,44	18,40 ± 1,66	18,16	17,97 ± 2,71	18,49	16,62 ± 4,93	18,59	18,45 ± 1,62
C18:0	1,51	1,93 ± 1,35	2,56	2,51 ± 0,31	1,45	1,36 ± 0,76	1,21*	0,95 ± 1,56	2,09	2,20 ± 1,56
∑ Saturados	26,51	25,35 ± 2,50	23,60	24,17 ± 2,20	22,40	21,67 ± 2,22	21,56[#]	19,63 ± 5,76	22,98	22,97 ± 2,94
∑ C16:1	10,97	10,93 ± 3,27	8,02	7,91 ± 1,16	8,93	9,16 ± 2,13	8,23	7,98 ± 2,66	6,97	7,14 ± 1,31
C18:1 n9	35,90	37,82 ± 5,46*	52,05	51,63 ± 2,70	36,76*	35,69 ± 2,87	35,89*	33,42 ± 10,2	35,86*	35,25 ± 2,95
∑ Monoinsaturados	49,86	48,76 ± 3,57	60,14	59,54 ± 1,95	44,53*	44,85 ± 1,59	43,99*	41,41 ± 12,47	42,59*	42,39 ± 1,96
∑ C18:2 n6	22,38	23,92 ± 4,18	14,28	14,35 ± 0,84	30,43*	30,93 ± 2,70	31,04*	28,22 ± 8,81	31,81*	32,03 ± 3,58
C18:3 n3	1,50	1,38 ± 0,81	0,03	0,04 ± 0,03	1,99*	2,02 ± 0,36	2,12*	2,06 ± 0,74	2,04*	2,19 ± 0,46
C20:4 n6	n.d.	n.d.	0,35	0,43 ± 0,27	0,34	0,27 ± 0,20	0,32	0,18 ± 0,14	0,40	0,34 ± 0,23
∑ Poliinsaturados	23,21	25,30 ± 4,77	14,68	15,00 ± 1,03	33,17[#]	33,22 ± 3,13	34,20[#]	33,27 ± 3,39	33,65[#]	34,56 ± 3,86

Grupo CT - dieta semipurificada/ **Grupo AT2** – dieta aterogênica/ **Grupo CLA** - dieta semipurificada + 1% de CLA/ **Grupo TOC** – dieta semipurificada + 1% de acetato de vitamina E/ **Grupo CLA/TOC** – dieta semipurificada + 1% de CLA + 1% de acetato de vitamina E/ **N.I.** – não identificado/ **n.d.** – não detectado. Valores expressos em mediana (média ± desvio-padrão). Teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de comparações múltiplas de Dunn's. [*] p<0,05 vs. Grupo AT; [#] p<0,05 vs. grupo CT.

7.3.3.3 Composição de ácidos graxos do intestino delgado

As propriedades funcionais dos enterócitos podem ser modificadas por alterações na composição de ácidos graxos das suas membranas, causadas pela dieta (IBRAHIM e GHAFOORUNISSA, 2001).

No presente estudo, o perfil de ácidos graxos do intestino delgado representou o conteúdo lipídico constitucional das células intestinais, uma vez que a remoção dos tecidos para análise foi feita após um período de jejum.

Foi constatada uma maior incorporação de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados nos grupos CLA e TOC em relação ao controle. No grupo CLA/TOC observou-se que a incorporação de ácidos graxos monoinsaturados foi maior do que a de ácidos graxos poliinsaturados (**Tabela 7.5**). Este efeito pode ser prejudicial, uma vez que a maior deposição de ácidos graxos monoinsaturados no intestino delgado reflete a existência de uma membrana mais rígida e com alteração na permeabilidade (KOROTKOVA e STRANDVIK, 2000).

Tabela 7.5 – Perfil de ácidos graxos do intestino dos grupos controles e experimentais.

Ácidos graxos %	CT		AT2		CLA		TOC		CLA/TOC	
	Mediana	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	Média ± DP
C14:0	3,20	2,52 ± 1,47	2,24	2,19 ± 0,71	2,15	2,13 ± 1,10	2,38	1,94 ± 1,57	2,08	1,94 ± 0,99
C16:0	20,38	20,30 ± 0,57	18,46	17,67 ± 3,19	19,44	19,18 ± 2,03	18,80	18,96 ± 1,55	19,84	19,51 ± 1,41
C18:0	7,92	9,07 ± 2,44	9,11	8,81 ± 2,06	7,90	7,85 ± 3,16	7,73	7,94 ± 3,27	6,44	7,23 ± 2,93
Σ Saturados	31,50	31,89 ± 3,47	28,88	28,67 ± 4,04	31,06	29,16 ± 4,56	30,34	28,83 ± 4,15	28,61	28,69 ± 4,03
Σ C16:1	5,50	6,11 ± 1,78	3,69	4,88 ± 2,75	5,83	7,05 ± 3,00	5,49	5,46 ± 1,10	5,28	5,44 ± 1,50
C18:1 n9	31,81	32,93 ± 5,92	42,98	45,20 ± 7,74	30,51*	29,43 ± 4,48	29,18*	31,54 ± 6,56	36,90	35,53 ± 4,50
Σ Monoinsaturados	38,10	39,04 ± 6,92	46,28	50,09 ± 10,11	36,81*	36,47 ± 6,16	35,80*	37,00 ± 6,87	42,19	40,96 ± 5,35
Σ C18:2 n6	19,80	20,26 ± 3,09	16,37	16,46 ± 1,33	23,99*	25,34 ± 3,74	25,96*	25,89 ± 3,40	22,59	21,35 ± 7,77
C18:3 n3	1,13	0,66 ± 0,55	n.d.	n.d.	1,30	0,83 ± 0,67	1,38	1,10 ± 0,63	1,01	1,10 ± 0,30
C20:4 n6	6,72	8,08 ± 2,85	7,46	5,96 ± 3,65	8,57	7,74 ± 3,50	7,24	7,32 ± 2,76	4,12	4,85 ± 3,01
Σ Poliinsaturados	28,64	28,90 ± 4,45	22,08	22,42 ± 3,10	35,58*	33,19 ± 4,27	34,88*	34,31 ± 3,96	29,33	27,31 ± 7,95
N.I.	0,36	0,54 ± 0,32			1,14	0,65 ± 0,44				

Grupo CT - dieta semipurificada/ **Grupo AT2** – dieta aterogênica/ **Grupo CLA** - dieta semipurificada + 1% de CLA/ **Grupo TOC** – dieta semipurificada + 1% de acetato de vitamina E/ **Grupo CLA/TOC** – dieta semipurificada + 1% de CLA + 1% de acetato de vitamina E/ **N.I.** – não identificado/ **n.d.** – não detectado. Valores expressos em mediana (média ± desvio-padrão). Teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de comparações múltiplas de Dunn's. * p<0,05 vs. Grupo AT.

7.4 Conclusões

A peroxidação dos lipídios hepáticos foi maior nos animais suplementados com vitamina E, sugerindo que a alta concentração de vitamina E utilizada em nosso estudo pode ter contribuído para este aumento.

Ao contrário de estudos com outros modelos experimentais, em camundongos LDLR ^{-/-}, não foi possível detectar a incorporação de 10*t*,12*c*-CLA. Contudo, a similaridade na composição de ácidos graxos entre os grupos controle e experimentais pode reforçar a hipótese da metabolização anterior deste isômero, impossibilitando a sua deposição nos diferentes tecidos estudados.

8 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste estudo, a vitamina E apresentou-se mais efetiva na diminuição da lesão aterosclerótica do que na lipoperoxidação hepática. Entretanto, o CLA não contribuiu para modificar tais processos.

Desta forma, mais parâmetros devem ser avaliados a fim de identificar outros efeitos que os componentes avaliados possam ter exercido nos animais.

Sob esta perspectiva, sugere-se:

- Analisar a indução da expressão de PPAR γ nas lesões ateroscleróticas, já que o CLA tem sido relacionado com o aumento da expressão destes receptores, que induzem a diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias.

E para estudos futuros que sejam avaliados:

- A eficiência de doses menores de suplementação com vitamina E na evolução da aterosclerose e na peroxidação dos lipídios plasmáticos e hepáticos;
- A existência de efeitos diferentes do isômero 9 c ,11 t -CLA no desenvolvimento da aterosclerose em camundongos LDLR -/-;
- As cinéticas de absorção do isômero 10 t ,12 c -CLA na forma livre e na forma esterificada;
- A incorporação tecidual dos metabólitos de poliinsaturados de cadeia longa do CLA;
- A presença do CLA e dos seus metabólitos nas células endoteliais.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH, A.; OTHMAN, A. Growth and lipid metabolism responses in rats fed different dietary fatty sources. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 51, p. 159 – 167, 2000.
- ADDIS, M.; CABIDDU, A.; PINNA, G.; DECANDIA, M.; PIREDDA, G.; PIRISI, A.; MOLLE, G. Milk and cheese fatty acid composition in sheep fed Mediterranean forages with reference to conjugated linoleic acid *cis-9,trans-11*. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 3443 – 3454, 2005.
- ALDAI, N.; OSORO, K.; BARRÓN, L.J.R.; NÁJERA, A.I. Gas–liquid chromatographic method for analysing complex mixtures of fatty acids including conjugated linoleic acids (*cis9trans11* and *trans10cis12* isomers) and long-chain (n-3 or n-6) polyunsaturated fatty acids: Application to the intramuscular fat of beef meat. **Journal of Chromatography A**, v. 1110, p. 133 – 139, 2006.
- ALLAIN, C.C.; POON, L.S.; CHAN, C.S.G.; RICHMOND, W.; FU, P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical Chemistry**, v. 20, p. 470 – 475, 1974.
- ALLISON, D.B.; DENKE, M.A.; DIETSCHY, J.M.; EMKEN, E.A.; KRIS-ETHERTON, P.M.; NICOLOSI, R.J. Trans fatty acids and coronary heart disease risk. Report of the expert panel on trans fatty acids and coronary heart disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, p. 655S – 708S, 1995.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemistry. **Official Methods of Analysis of A.O.A.C.** 14 ed. Washington: A.O.A.C., 1989.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemistry. **Official Methods of Analysis.** 13 ed. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 1980, 1015p.
- ARBONÉS-MAINAR, J.M.; NAVARRO, M.A.; GUSMÁN, M.A.; ARNAL, C.; SURRA, J.C.; ACÍN, S.; CARNICER, R.; OSADA, J. ROCHE, H.M. Selective effect of conjugated linoleic acid isomers on atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E knockout mice. **Atherosclerosis**, v. 189, n. 2, p. 318 – 327, 2006.
- ARROL, S.; MACKNESS, M.I.; DURRINGTON, P.N. Vitamin E supplementation increases the resistance of both LDL and HDL to oxidation and increases cholesteryl ester transfer activity. **Atherosclerosis**, v. 150, p. 129 – 134, 2000.

- ASCHERIO, A.; HENNEKENS, C.H.; BURING, J.E.; MASTER, C.; STAMPFER, M.J. Trans fatty acids intake and risk of myocardial infarction. **Circulation**, v. 89, p. 94 – 101, 1994.
- BALL, G.F.M. **Bioavailability and analysis of vitamins in foods**. Londres: Chapman & Hall, 1998. 569p.
- BANNI, S.; PETRONI, A.; BLASEVICH, M.; CARTA, G.; ANGIONI, E.; MURRU, E.; DAY, B.W.; MELIS, M.P.; SPADA, S.; IP, C. Detection of conjugated C16 PUFAs in rat tissues as possible partial beta-oxidation products of naturally occurring conjugated linoleic acid and its metabolites. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1682, p. 120 – 127, 2004.
- BANNI, S.; CARTA, G.; ANGIONI, E.; MURRU, E.; SCANU, P.; MELIS, M.P.; BAUMAN, D.E.; FISCHER, S.M.; IP, C. Distribution of conjugated linoleic acid and metabolites in different lipid fractions in the rat liver. **Journal of Lipid Research**, v. 42, p. 1056 – 1061, 2001.
- BANNI, S.; MARTIN, J.C. Conjugated linoleic acid and metabolites. In: SÉBÉDIO, J.M.; CHRISTIE, W.W. **Trans fatty acids in human nutrition**. Dundee, Scotland: The Oily Press Lipid Library, 1998. 189p
- BANUDEVI, S.; KRISHNAMOORTHY, G.; VENKATARAMAN, P.; VIGNESH, C.; ARULDHAS, M.M.; ARUNAKARAN, J. Role of α -tocopherol on antioxidant status in liver, lung and kidney of PCB exposed male albino rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 2040 – 2046, 2006.
- BAUMAN, D.E.; GRIINARI, J.M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. **Livestock Production Science**, v. 70, p. 15 – 29, 2001.
- BAUMAN, D.E.; GRIINARI, J.M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: Low-fat milk syndrome. **Livestock Production Science**, v. 70, p. 15 – 29, 2000.
- BELURY, M.A.; MOYA-CAMARENA, S.Y.; LU, M.; SHI, L.; LEESNITZER, .L.M.; BLANCHARD, S.G. Conjugated linoleic acid is an activator and ligand for peroxissome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ). **Nutrition Research**, v. 22, p. 817 – 824, 2002.
- BESSA, R.J.B.; SANTOS-SILVA, J.; RIBEIRO, J.M.R.; PORTUGAL, A.V. Reticulo-rumen biohydrogenation and the enrichment of ruminant edible products with

- linoleic acid conjugated isomers. **Livestock Production Science**, v. 63, p. 201 – 211, 2000.
- BLANKSON, H.; STAKKESTAD, J.A.; FAGERTUN, H.; THOM, E.; WADSTEIN, J.; GUDMUNDTSEN. Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans. **The Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2943 – 2948, 2000.
- BOCCA, C.; BOZZO, F.; GABRIEL, L.; MIGLIETTA, A. Conjugated linoleic acid inhibits Caco-2 cells growth via ERK-MAPK signaling pathway. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, p. 332 – 340, 2007.
- BONGIORNO, D.; CERAULO, L.; FERRUGIA, M.; FILLIZOLA, F.; LONGO, A.; MELE, A.; RUGGIRELLO, A.; LIVERI, V.T. Interactions of α -tocopherol with biomembrane models: binding to dry lecithin reversed micelles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 312, p. 96 – 104, 2006.
- BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. **Annual Review of Biochemistry**; v. 52, p. 223 – 61, 1983.
- BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, v. 332, p. 34 – 47, 1986.
- BUIJSSE, B.; FESKENS, E.J.M.; SCHLETTWEIN-GSELL, D.; FERRY, M.; KOK, F.J.; KROMHOUT, D.; DE GROOT, L.C.P.G.M. Plasma carotene and α -tocopherol in relation to 10-y all-cause and cause specific mortality in Europe elderly: The Survey in Europe on Nutrition in the Elderly, a Concerted Action (SENECA). **The American journal of Clinical nutrition**. v. 82, p. 879 – 886, 2005.
- BURDGE, G.C.; LUPOLI, B.; RUSSEL, J.J.; TRICON, S.; KEW, S.; BANERJEE, T.; SHINGFIELD, K.J.; BEEVER, D.R.; GRIMBLE, R.F.; WILLIAMS, C.M.; YAQOOB, P.; CALDER, P.C. Incorporation of *cis*-9,*trans*11 or *trans*-10,*cis*-12 conjugated linoléico acid into plasma and cellular lipids in healthy men. **Journal of Lipid Research**, v. 45, p. 736 – 741, 2004.
- BURTON, G.W.; INGOLD, K.U. Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 570, p. 7 – 22, 1989.

- CARRERO, J.J.; LÓPEZ-HUERTAS, E.; SALMERÓN, L.M.; BARÓ, L.; ROS, E. Daily supplementation with (n-3) PUFAs, oleic acid, folic acid, and vitamins B-6 and E increases pain-free walking distance and improves risk factors in men with peripheral vascular disease. **The Journal of Nutrition**, v. 135, p. 1393 – 1399, 2005.
- CHA, M.C.; JONES, P.J.H. Tissue fatty acid deposition is influenced by an interaction of dietary oil source and energy intake level in rats. **Nutritional Biochemistry**, v. 7, p. 650 – 658, 1996.
- CHARDIGNY, J.M.; MASSON, E.; SERGIEL, J.P.; DARBOIS, M.; LOREAU, O.; NOËL, J.P.; SÉBÉDIO, J.L. The position of rumenic acid on triacylglycerols alters its bioavailability in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 133, p. 4212 – 4214, 2003.
- CHENG, W.L.; LII, C.K.; CHEN, H.W.; LIN, T.H.; LIU, K.L. Contribution of conjugated linoleic acid to the suppression of inflammatory responses through the regulation of the NF- κ B pathway. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 71 – 78, 2004.
- CHIN, S.F.; LIU, W.; STORKSON, J.M.; HA, Y.L.; PARIZA, M.W. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid a newly recognized class of anticarcinogens. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.5, p.185 – 197, 1992.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – COBEA. **Princípios Éticos na Experimentação Animal**, 1991. <http://www.cobea.org.br/etica.htm#3>.
- COLLINS, T.; READ, M.A.; NEISH, A.S.; WHITLEY, M.Z.; THANOS, D.; MANIATIS, T. Transcriptional relation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. **The FASEB Journal**, v.9, p. 899 – 909, 1995.
- COLLOMB, M.; BÜ TIKOFER, U.; SIEBER, R.; JEANGROS, B.; BOSSET, J.O. Composition of fatty acids in cow's milk fat produced in the lowlands, mountains and highlands of Switzerland using high resolution gas chromatography. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 649 – 659, 2002.
- CYRUS, T. TANG, L.X., ROKACH, J. Lipid peroxidation and platelet activation in murine atherosclerosis. **Circulation**, v. 104, p. 1940 – 1945, 2001.

- CYRUS, T.; YAO, Y.; ROKACH, J.; TANG, L.X.; PRATICÒ, D. Vitamin E reduces progression of atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient mice with established vascular lesions. **Circulation**, v. 107, p. 512 – 523, 2003.
- DE LA FUENTE, M.A.; LUNA, P.; JUÁREZ, M. Chromatographic techniques to determine conjugated linoleic acid isomers. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, p. 917 – 926, 2006.
- DEPARTAMENTO DE ATEROSCLEROSE DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, p. 1 – 19, 2007.
- DEVARAJ, S.; JIALAL, I. α -tocopherol decreases tumor necrosis factor- α mRNA and protein from activated human monocytes by inhibition of 5-lipoxygenase. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 38, p. 1212 – 1220, 2005.
- DHIMAN, T.R.; ANAND, G.R.; SATTER, L.D.; PARIZA, M.W. Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2146 – 2156, 1999.
- DUVAL C.; CHINETTI, G.; TROTTEIN, F.; FRUCHART, J.C.; STAELS, B. The role of PPARs in atherosclerosis. **Trends in molecular medicine**, v. 8, p. 422 – 430, 2002.
- ENS, J.G.; MA, D.W.L.; COLE, K.S.; FIELD, C.J.; CLANDININ, M.T. An assessment of c9,t11 linoleic acid intake in a small group of young Canadians. **Nutrition Research**, v. 21, p. 955 – 960, 2001.
- ERKKILÄ, A.T.; MATTHAN, N.R.; HERRINGTON, D.M.; LICHTENSTEIN, A.H. Higher plasma docosahexaenoic acid is associated with reduced progression of coronary atherosclerosis in women with CAD. **Journal of Lipid Research**, v. 47, p. 2814 – 2819, 2006.
- FAZIO, S.; LINTON, M.F. Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis. **Frontiers in Bioscience**, v. 6, p. 515 – 525, 2001.
- FERREIRA, V.; van DIJK, K.W.; GROEN, A.K.; VOS, R.M.; van der KAA, J.; GIJBELS, M.J.J.; HAVEKES, L.M.; PANNEKOEK, A.K. Macrophage-specific inhibition of NF- κ B activation reduces foam-cell formation. **Atherosclerosis**, v. 192, p. 283 – 290, 2007.

- FLINTOFF-DYE, N.L.; OMAYE, S.T. Antioxidant effects of conjugated linoleic acid isomers in isolated human low-density lipoproteins. **Nutrition Research**, v. 25, p. 1 – 12, 2005.
- FOLCH, J. LEES, M. SLOANE-STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 226, p. 497 – 509, 1957.
- GAULLIER, J.M.; HALSE, J.; HØIVIK, H.O.; HØYE, K.; SYVERTSEN, C.; NURMINIEMI, M.; HASSFELD, C.; EINERHAND, A.; O'SHEA, M.; GUDMUNDSSEN, O. Six months supplementation with conjugated linoleic acid induces regional-specific fat mass decreases in overweight and obese. **The British Journal of Nutrition**, v. 97, p. 550 – 560, 2007.
- GAULLIER, J.M.; HALSE, J.; HØYE, K.; KRISTIENSEN, K.; FAGERTUN, H.; VIK, H.; GUDMUNDSSEN, O. Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y reduces body fat mass in healthy overweight humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 1118 – 1125S, 2004.
- GERRITSEN, M.E. Physiological and pathophysiological roles of eicosanoids in the microcirculation. **Cardiovascular Research**, v. 32, p. 720 – 732, 1996.
- GETZ, G.S.; REARDON, C.A. Diet and murine atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, p. 242 – 249, 2006.
- GNÄDIG, S. Conjugated linoleic acid: Effect of processing on CLA in cheese and the impact of CLA on the arachidonic acid metabolism. 2002. 170p. (Thesis) – INRA, Unité de Nutrition Lipidique, Institute of Biochemistry and Food Chemistry. University of Hamburg, Hamburg, 2002.
- GÖTTSCHE, J.R.; STRAARUP, E.M. Fatty acid profiles in tissues of mice fed conjugated linoleic acid. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 108, p. 468 – 478, 2006.
- GRIINARI, J.M.; CORI, B.; LACY, S.; CHOUINARD, P.; NURMELA, K.; BAUMAN, D. Conjugated linoleic acid synthesized endogenously in lactating dairy cows by delta-9 desaturase. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2285 – 2281, 2000.
- HAKALA, J.K.; OKSJOKI, R.; LAINE, P.; DU, H.; GRABOWSKI, G.A.; KOVANEN, P.T.; PENTIKÄINEN, M.O. Lysosomal enzymes are released from

- culture human macrophages, hydrolyze LDL in vitro, and are present extracellularly in human in human atherosclerotic lesions. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, p. 1430 – 1436, 2003.
- HAMER, M.; STEPTOE, A. Influence of specific nutrients on progression of atherosclerosis, vascular function, haemostasis and inflammation in coronary heart disease patients: a systematic review. **British Journal of Nutrition**, v. 95, p. 849 – 859, 2006.
- HANSSON, G.K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 1685 – 1695, 2005.
- HASTY, A.H.; GRUEN, M.L.; TERRY, E.S.; SURMI, B.K.; ATKINSON, R.D.; GAO, L.; MORROW, J.D. Effects of vitamin E on oxidative stress and atherosclerosis in a obese hyperlipidemic mouse model. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, p. 127 – 133, 2007.
- HODIS, H.N.; MACK, W.J.; LABREE, L.; MAHRER, P.R.; SEVANIAN, A.; LIU, C-ran.; LIU, C-hua.; HWANG, J.; SELZER, R.H.; AZEN, S.P. Alpha-tocopherol supplementation in healthy individuals reduces low-density lipoprotein oxidation but not atherosclerosis – The vitamin E Atherosclerosis Prevention Study (VEAPS). **Circulation**, v. 106, p. 1453 – 1459, 2002.
- HORNSTRA, G. Importance of polyunsaturated fatty acids of the n-6 and n-3 families for early human development. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.103, p. 379 – 389, 2001.
- IANNUZZI, A.; CELENTANO, E.; PANICO, S.; GALASSO, R.; COVETTI, G.; SACCHETTI, L.; ZARRILLI, F.; DE MICHELE, M.; RUBBA, P. Dietary and circulating antioxidant vitamins in relation to carotid plaques in middle-aged women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, p. 582 – 587, 2002.
- IBRAHIM, S.A.; GHAFOORUNISSA. Influence of dietary partially hydrogenated fat high in *trans* fatty acids on lipid composition and function of intestinal brush border membrane in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, p. 116 – 120, 2001.
- IGARASHI, M.; MIYAZAWA, T. The growth inhibitory effect of conjugated linoleic acid on a human hepatoma cell line, HepG2, is induced by a change in fatty acid

- metabolism, but not the facilitation of lipid peroxidation in the cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1530, p. 162 – 171, 2001.
- ISHIBASHI, S.; BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L.; GERARD, R.D.; HAMMER, R.E.; HERZ, J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 92, p. 883 – 893, 1993.
- IWAKIRI, Y.; SAMPSON, A.; ALLEN, G.D. Suppression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by conjugated linoleic acid in murine macrophages. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 67, p. 435 – 443, 2002.
- JACHÉC, W.; TOMASIK, A.; CEGLAREK, W.; WÓS, S.; WODNIECKI, J.; WOJCIECHOWSA, C.; SKRZEP-POLOCZEK, B.; WALICHIEWICZ, P.; WIDENKA, K. Lipid peroxidation and vitamin E in human coronary atherosclerotic lesions. **Clinica Chimica Acta**, v. 330, p. 121 – 129, 2003.
- JIANG, J.; WOLK, A.; VESSBY, B. Relation between the intake of milk fat and the occurrence of conjugated linoleic acid in human adipose tissue. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, p. 21 – 27, 1999.
- JIANG, J.; BJOERCK, L.; FONDEN, R.; EMANUELSON, M. Occurrence of conjugated *cis*-9, *trans*-11-octadecadienoic acid in bovine milk: effects of feed and dietary regimen. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 438 – 445, 1996.
- KAYDEN H.J.; TRABER, M.G. Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentration of vitamin E in humans. **Journal of Lipid Research**, v. 34, p. 343 – 358, 1993.
- KAPLAN, M.; HAYEK, T.; RAZ, A.; COLEMAN, R.; DORNFELD, L.; VAYA, J.; AVIRAM, M. Pomegrate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis. **The Journal of Nutrition**, v. 131, p. 2082 – 2089, 2001.
- KELLEY, D.S.; BARTOLINI, G.L.; NEWMAN, J.W.; VEMURI, M.; MACKEY, B.E. Fatty acid composition of liver, adipose tissue, spleen, and heart of mice fed diets containing *t10,c12*-, and *c9,t11*-conjugated linoleic acid. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 74, p. 331 – 338, 2006.

- KHALIL, A.; MILOCHEVITCH, C. Study of the antioxidant effect of α -tocopherol on low-density lipoprotein peroxidation induced at low and high γ -radiation dose rates. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 72, p. 347 – 353, 2005.
- KLIEWER, S.A.; SUNDSETH, S.S.; JONES, S.A.; BROWN, P.J.; WISELY, G.B.; KOBLE, C.S.; DEVCHAND, P.; WAHLI, W.; WILLSON, T.M.; LENHARD, J.M.; LEHMANN, J.M. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 94, p. 4318 – 4323, 1997.
- KOGA, T.; KWAN, P.; ZUBIK, L.; AMEHO, C.; SMITH, D.; MEYDANI, M. Vitamin E supplementation suppresses macrophage accumulation and endothelial cell expression of adhesion molecules in the aorta of hypercholesterolemic rabbits. **Atherosclerosis**, v. 176, p. 265 – 272, 2004.
- KOROTKOVA, M.; STRANDVIK, M. Essential fatty acid deficiency affects the fatty acid composition of the rat small intestinal and colonic mucosa differently. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1487, p. 319 – 325, 2000.
- KOWALA, M.C.; RECCE, R.; BEYER, S.; GU, C.; VALENTINE, M. Characterization of atherosclerosis in LDL receptor knockout mice: macrophage accumulation correlates with rapid and sustained expression of aortic MCP-1/JE. **Atherosclerosis**, v. 149, p. 323 – 330, 2000.
- KRAMER, J.K.G.; CRUZ-HERNANDEZ, C.; DENG, Z.; ZHOU, J.; JAHREIS, G.; DUGAN, M.R.R. Analysis of conjugated linoleic acid and *trans* 18:1 isomers in synthetic and animal products. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 1137S – 1145S, 2004.
- KRITCHEVSKY, D.; TEPPER, S.A.; WRIGHT, S.; CZARNECKI, S.K.; WILSON, T.A.; NICOLSI, R.J. Conjugated linoleic acid isomer effects in atherosclerosis: growth and regression of lesions. **Lipids**, v. 39, n. 7, p. 611 – 616, 2004.
- KRITCHEVSKY, D.; TEPPER, S.A.; WRIGHT, S.; CZARNECKI, S.K. Influence of graded levels of conjugated linoleic acid (CLA) on experimental in rabbits. **Nutrition Research**, v. 22, p. 1275 – 1279, 2002.
- KRITCHEVSKY, D.; TEPPER, S.A.; WRIGHT, S.; TSO, P.; CZARNECKI, S.K. Influence of conjugated linoleic acid (CLA) on establishment and progression of

- atherosclerosis in rabbits. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 19, p. 472S – 477S, 2000.
- LEE, S.H.; YAMAGUCHI, K.; KIM, J.S.; ELING, T.E.; SAFE, S.; PARK, Y.; BAEK, S.J. Conjugated linoleic acid stimulates an anti-tumorigenic protein NAG-1 in an isomer specific manner. **Carcinogenesis**, v. 27, p. 972 – 981, 2006.
- LEE, K.N.; KRITCHEVSKY, D.; PARIZA, M.W. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. **Atherosclerosis**, v. 108, p. 19 – 25, 1994.
- LEVY, Y.; ZALTSBERG, H.; BEN AMOTZ, A.; KANTER, Y.; AVIRAM, M. Dietary supplementation of a natural isomer mixture of beta-carotene inhibits oxidation of LDL derived from patients with diabetes mellitus. **Annals of Nutrition & Metabolism**, v. 44, p. 54 – 60, 2000.
- LIU, X.; CAO, Y.; CHEN, Y. Separation of conjugated linoleic acid isomers by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1095, p. 197 – 200, 2005.
- LOCK, A.L.; HORNE, C.A.M.; BAUMAN, D.E.; SALTER, A.M. Butter naturally enriched in conjugated linoleic acid and vaccenic acid alters tissue fatty acids and improves the plasma lipoprotein profile in cholesterol-fed hamsters. **The Journal of nutrition**, v. 135, p. 1934 – 1939, 2005.
- LOSOWSKY, M.S.; KELLEHER, J.; WALKER, B.E. Intake and absorption of tocopherol. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 203, p. 212 – 222, 1972. In: BALL, G.F.M. **Bioavailability and analysis of vitamins in foods**. Londres: Champman & Hall, 1998. 569p.
- LUONGO, D.; BERGAMO, P.; ROSSI, M. Effects of conjugated linoleic acid on growth and cytokine expression in Jurkat T cells. **Immunology Letters**, v. 90, p. 195 – 201, 2003.
- LUSIS, A.J. Atherosclerosis. **Nature**, v. 407, p. 233 – 241, 2000.
- MASHIMA, R.; WITTING, P.K. STOCKER, R. Oxidants and antioxidants in atherosclerosis. **Current Opinion in Lipidology**, v. 12, p. 411 – 418, 2001.
- McANULTY, S.R.; McANULTY, L.S.; NIEMAN, D.C.; MORROW, J.D.; SHOOTER, L.A.; HOLMES, S.; HEWARD, C.; HENSON, D.A. Effect of alpha-tocopherol supplementation on plasma homocysteine and oxidative stress in

- highly trained athletes before and after exhaustive exercise. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, p. 530 – 537, 2005.
- MICHELLETA, F.; NATOLI, S.; MISURACA, M.; SBARIGIA, E.; DICZFALUZY, U.; IULIANO, L. Vitamin E supplementation in patients with carotid atherosclerosis – Reversal of altered oxidative stress status in plasma but not in plaque. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, p. 136 – 140, 2004.
- MITCHELL, P.L.; LANGILLE, M.A.; CURRIE, D.L.; McLEOD, R.S. Effect of conjugated linoleic acid isomers on lipoproteins and atherosclerosis in the Syrian Golden hamster. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1734, p. 269 – 276, 2005.
- MOLONEY, F.; TOOMEY, S.; NOONE, E.; NUGENT, A.; ALLAN, B.; LOSCHER, C.E.; ROCHE, H.M. Antidiabetic effects of *cis*-9, *trans*-11–conjugated linoleic acid may be mediated via anti-inflammatory effects in white adipose tissue. **Diabetes**, v. 56, p. 574 – 582, 2007.
- MOSSOBA, M.M. Analytical techniques for conjugated linoleic acid (CLA) analysis. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 103, p. 594 – 632, 2001.
- MOYA-CAMARENA, S.Y.; van der HEUVEL, J.P.; BLANCHARD S.G., LEESNITZER, L.A.; BELURY, M.A. Conjugated linoleic acid is potent naturally occurring ligand and activator of PPAR α . **Journal of Lipid Research**, v. 40, p. 1426 – 1433, 1999.
- MÜLLER, A., RINGSEIS, R., DÜSTERLOH, K., GAHLER, S., EDER, K., STEINHART, H. Detection of conjugated dienoic fatty acids in human vascular smooth muscle cells treated with conjugated linoleic acid. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1737, p. 145 – 151, 2005.
- MUNDAY, J.S.; THOMPSON, K.G.; JAMES, K.A.C. Dietary conjugated linoleic acids promote fatty streak formation in the C57BL/6 mouse atherosclerotic model. **British Journal of Nutrition**, v. 81, p. 251 – 255, 1999.
- MUROHARA, T.; IKEDA, H.; OTSUKA, Y.; AOKI, M.; HARAMAKI, N.; KATOH, A.; TAKAJO, Y.; IMAIZUMI, T. Inhibition of platelet adherence to mononuclear cells by α -tocopherol – Role of P-selectin. **Circulation**, v. 110, p. 141 – 148, 2004.

- NAUMANN, E.; CARPENTIER, Y.A.; SAEBO, A.; LASSEL, T.S.; CHARDIGNY, J.M.; SÉBÉDIO, J.L.; MENSINK, R.P. *Cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA) do not affect the plasma lipoprotein profile in moderately overweight subjects with LDL phenotype B. **Atherosclerosis**, v. 188, p. 167 – 174, 2006.*
- NESTEL, P.; FUJII, A.; ALLEN, T. The *cis-9,trans-11* isomer of conjugated linoleic acid (CLA) lowers plasma triglyceride and raises HDL cholesterol concentrations but does not suppress aortic atherosclerosis in diabetic apoE-deficient mice. **Atherosclerosis**, v. 189, p. 282 – 287, 2006.
- NICOLOSI, R.J.; ROGERS, E.J.; KRITCHEVSKY, D.; SCIMECA, J.A.; HUTH, P.J. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. **Artery**, v. 22, p. 266 – 277, 1997.
- NOONE, E.; ROCHE, H.M.; NUGENT, A.P.; GIBNEY, M.J. The effect of dietary supplementation using isomeric blends of conjugated linoleic acid on lipid metabolism in healthy human subjects. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. 243 – 251, 2002.
- NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SARMADI, J.; WOLFF, S.P. Measurement of Plasma Hydroperoxide Concentrations by the Ferrous Oxidation-Xylenol Orange Assay in Conjunction with Triphenylphosphine. **Analytical Biochemistry**, v. 220, p. 403 – 409, 1994.
- NUDDA, A.; McGUIRE, M.A.; BATTACONE, G.; PULINA, G. Seasonal variation in conjugated linoleic acid and vaccenic acid in milk fatty of sheep and its transfer to cheese and ricotta. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 1311 – 1319, 2005.
- ODA, E.; HATADA, K.; KIMURA, J. AIZAWA, Y.; AIZAWA, Y.; THANIKACHALAN, P.V.; WATANABE, K. Relationships between serum unsaturated fatty acids and coronary risk factors. **International Heart Journal**, v. 46, p. 975 – 985, 2005.
- OHKAWA, S.; YONEYAMA, T.; SHIMOI, K.; TAKITA, T.; MARUYAMA, Y.; KUMAGAI, H. Pro-oxidative effect of α -tocopherol in the oxidation of LDL isolated from co-antioxidant-depleted non-diabetic hemodialysis patients. **Atherosclerosis**, v. 176, p. 411 – 418, 2004.

- OSTERUD, B.; BJORKKLID, E. Role of monocytes in atherogenesis. **Physiological Reviews**, v. 83, p. 1069 – 1112, 2003.
- OTERO, P.; BONET, B.; HERRERA, E.; RABANO, A. Development of atherosclerosis in the diabetic BALB/c mice prevention with vitamin E administration. **Atherosclerosis**, v. 182, p. 259 – 265, 2005.
- ÖZER, N.K.; NEGIS, Y.; AYTAN, N.; VILLACORTA, L.; RICCIARELLI, R.; ZINGG, J.M.; AZZI, A. Vitamin E inhibits CD36 scavenger receptor expression in hypercholesterolemic rabbits. **Atherosclerosis**, v. 184, p. 15 – 20, 2006.
- PARIZA, M.W.; HARGREAVES, W.A. A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7,12- dimethylbenz[a]anthrazene. **Carcinogenesis**, v. 6, p. 591 – 593, 1985.
- PARIZA, M.W.; PARK, Y.; COOK, M.E. Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. **Experimental Biology and Medicine**, v. 223, p. 8 – 13, 2000.
- PARK, Y.; STORKSON, J.M.; ALBRIGHT, K.J.; LIU, W.; PARIZA, M.W. Biological activities of conjugated fatty acid: conjugated eicosadienoic (conj. 20:2 delta (c11,t13/t12,c14), eicosatrienoic (conj. 20:3delta(c8,t12,c14)), and heneicosadienoic (conj. 21:2delta(c12,t14/c13,t15)) acids and other metabolites of conjugated linoleic acid. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1687, p. 120 – 129, 2005.
- PARODI, P.W. Conjugated octadecadienoic acids of milk fat. **Journal of Dairy Science**, v. 60, p. 1550 – 1553, 1977.
- PARODI, P.W. Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 1339 – 1349, 1999.
- PAIGEN, B.; MORROW, A.; BRANDON, C.; MITCHELL, D.; HOLMES, P. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. **Atherosclerosis**, v. 68, p. 231 – 240, 1987.
- PARTHASARATHY, S.; SANTANAM, N.; RAMACHANDRAN, S.; MEILHAC, O. Oxidants and antioxidants in atherogenesis. An appraisal. **Journal fo Lipid Research**, v. 40, p. 2143 – 2157, 1999.
- PELUZIO, M.C.G.; MIGUEL, JR. E.; DRUMOND, T.C.; CESAR, G.C.; SANTIAGO, H.C.; TEIXEIRA, M.M.; VIEIRA, E.C.; ARANTES, R.M.; ALVAREZ-LEITE,

- L.I. Monocyte chemoattractant protein-1 involvement in the alpha-tocopherol-induced reduction of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. **The British Journal of Nutrition**, v. 90, p. 3 – 11, 2003.
- PERONA, J.S.; PORTILLO, M.P.; MACARULLA, M.T.; TUEROS, A.I.; RUIZ-GUTIÉRREZ, V. Influence of different dietary fats on triacylglycerol deposition in rat adipose tissue. **The British Journal of nutrition**, v. 84, p. 765 – 774, 2000.
- PORTUGAL, L.R.; FERNANDES, L.R.; CESAR, G.C.; SANTIAGO, H.C.; OLIVEIRA, D.R.; SILVA, N.M.; SILVA, A.A.; LANNES-VIEIRA, J.; ARANTES, R.M.; GAZZINELLI, R.T.; ALVAREZ-LEITE, J.I. Infection with toxoplasma gondii increases atherosclerotic lesion in ApoE-deficient mice. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 3571 – 3576, 2004.
- PUNZALAN, F.E.R.; SY, R.G.; SANTOS, R.S.; CUTIONGCO, E.M.; GOSIENGFIAO, S.; FADRIGUILAN, E.; GEORGE, P.; LAURIE, A. Low density lipoprotein – receptor (LDL-R) gene mutations among Filipinos with familial hypercholesterolemia. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 12, p. 276 – 283, 2005.
- RAMACHANDRAN, S.; PENUMETCHA, M.; MERCHANT, N.K.; SANTANAM, N.; RONG, R.; PARTHASARATHY, S. Exercise reduces preexisting atherosclerotic lesions in LDL receptor knock out mice. **Atherosclerosis**, v. 178, p. 31 – 38, 2005.
- RIMM, E.B.; STAMPFER, M.J.; ASCHERIO, A.; GIOVANNUCCI, E.; COLDITZ, G.A.; WILLET, W.C.; Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. **The New England Journal of Medicine**, v. 328, p. 1450 – 1456, 1993.
- RINGSEIS, R.; MÜLLER, A.; DÜSTERLOH, K.; SCHLESER, S.; EDER, K.; STEINHART, H. Formation of conjugated linoleic acid metabolites in human vascular endothelial cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1761, p. 377 – 383, 2006.
- RITZENTHALER, K.L.; McGUIRE, M.K.; FALEN, R.; SHULTZ, T.D.; DASGUPTA, N.; McGUIRE, M.A. Estimation of conjugated linoleic acid intake by written dietary assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by food duplicate methodology. **The Journal of Nutrition**, v. 131, p. 1548 – 1554, 2001.

- ROCHE, H.M.; NOONE, E.; NUGENT, A.; GIBNEY, M.J. Conjugated linoleic acid: a novel therapeutic nutrient? **Nutrition Research Review**, v. 14, p. 173 – 187, 2001.
- RODRÍGUEZ, J.A.; NESPEREIRA, B.; PÉREZ-ILZARBE, M.; EGUINO, E.; PÁRAMO, J.A. Vitamins C and E prevent endothelial VEGF and VEGFR-2 overexpression induced by porcine hypercholesterolemic LDL. **Cardiovascular Research**, v. 65, p. 665 – 673, 2005.
- ROSELAAR, S.E.; KAKKANATHU, P.X.; DAUGHERTY, A. Lymphocyte populations in atherosclerotic lesions of apoE ^{-/-} and LDL receptor ^{-/-} mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 16, p. 1013 – 1018, 1996.
- ROSENBLAT, M.; AVIRAM, M. Oxysterol-induced activation of macrophage NADPH-oxidase enhances cell-mediated oxidation of LDL in the atherosclerotic apolipoprotein E deficient mouse: inhibitory role for vitamin E. **Atherosclerosis**, v. 160, p. 69 – 80, 2002.
- ROSS, R.; GLOMSET, J.A. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. **Science**, v. 180, p. 1332 – 1339, 1973.
- SCHLSER, S.; RINGSEIS, R.; EDER, K. Conjugated linoleic acids have no effect on TNF α -induced adhesion molecule expression, U937 monocyte adhesion, and chemokine release in human aortic endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 186, p. 337 – 344, 2006.
- SCOTT, J. Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 14, p. 271 – 279, 2004.
- SEPPÄNEN-LAAKSO, T.; LAAKSO, I.; HILTUNEN, R. Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. **Analytica Chimica Acta**, v. 465, p. 39 – 62, 2002.
- SETIADI, D.H.; CHASS, G.A.; TORDAY, L.L.; VARRO, A.; PAPP, J.G. Vitamin E models. Can the anti-oxidant and pro-oxidant dichotomy of α -tocopherol be related to ionic ring closing and radical ring opening redox reactions? **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, v. 620, p. 93 – 106, 2003.

- SMILDE, T.J.; WISSEN, S.V.; WOLLERSHEIM, H.; KASTELEIN, J.J.P.; STALENHOEF, A.F.H. Genetic and metabolic factors predicting risk of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia. **The Netherlands Journal of Medicine**, v. 59, p. 184 – 195, 2001.
- SNEDDON, A.A.; McLEOD, E.; WAHLE, K.J.; ARTHUR, J.R. Cytokine-induced monocyte adhesion to endothelial cells involves platelet-activating factor: suppression by conjugated linoleic acid. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1761, p. 793 – 801, 2006.
- STAMPFER, M.J.; HENNEKENS, C.H.; MANSON, J.E.; COLDITZ, G.A.; ROSNER, B.; WILLET, W.C. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in women. **The New England Journal of Medicine**, v. 328, p. 1444 – 1449, 1993.
- STAPRANS, I.; PAN, X.M.; RAPP, J.H.; GRUNFELD, C.; FEINGOLD, K.R. Oxidized cholesterol in the diet accelerates the development of atherosclerosis in LDL receptor- and apolipoprotein E- deficient mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 20, p. 708 – 714, 2000.
- STEINBERG, D.; WITZTUM, J.L. Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? **Circulation**, v. 105, p. 2107 – 2111, 2002.
- STEINBERG, D.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T.E.; KHOO, J.C.; WITZTUM, J.L. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. **The New England Journal of Medicine**, v. 320, p. 915 – 924, 1989.
- STOCKER, R.; KEANEY JR, J.F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiological Reviews**, v. 84, p. 1381 – 1478, 2003.
- STORKSON, J.M.; PARK, Y.; COOK, M.E.; PARIZA, M.W. Effects of *trans*-10,*cis*-12 conjugated linoléico acid and cognates on apolipoprotein B secretion in HepG2 cells. **Nutrition Research**, v. 25, p. 387 – 399, 2005.
- SUARNA, C.; WU, B.J.; CHOY, K.; MORI, T.; CROFT, K.; CYN Shi, O.; STOCKER, R. Protective effect of vitamin E supplements on experimental atherosclerosis is modest and depends on preexisting vitamin E deficiency. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 41, p. 722 – 730, 2006.

- SUMMERS, L.K.M.; BARNES, S.C.; FIELDING, B.A.; BEYSEN, C.; ILIC, V.; HUMPHREYS, S.M.; FRAYN, K.N. Uptake of individual fatty acids into adipose tissue in relation to their presence in the diet. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 1470 – 1477, 2000.
- TAKEI, A.; HUANG, Y.; LOPES-VIRELLA, M.F. Expression of adhesion molecules by human endothelial cells exposed to oxidized low density lipoprotein. Influences of degree of oxidation and location of oxidized LDL. **Atherosclerosis**, v. 154, p. 79 – 86, 2001.
- TANGIRALA, R.K.; RUBIN, E.M.; PALINSKI, W. Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. **Journal of Lipid Research**, v. 36, p. 2320 – 2328, 1995.
- TOOMEY, S.; HARHEN, B.; ROCHE, H.M.; FITZGERALD, D. BELTON, O. Profound resolution of early atherosclerosis with conjugated linoléico acid. **Atherosclerosis**, v. 187, p. 40 – 49, 2006.
- TOOMEY, S.; ROCHE, H.; FITZGERALD, D.; BELTON, O. Regression of pre-established atherosclerosis in the apoE^{-/-} mouse by conjugated linoleic acid. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, p. 1075 – 1079, 2003.
- TÖRNWALL, M.E.; VIRTAMO, J.; KORHONEN, P.A.; VIRTANEN, M.J.; TAYLOR, P.R.; ALBANES, D.; HUTTUNEN, J.K. Effect of α -tocopherol and β -carotene supplementation on coronary heart disease during the 6-year post-trial follow-up in the ATBC study. **European Heart Journal**, v. 25, p. 1171 – 1178, 2004.
- TRICON, S.; BURDGE, G.C.; KEW, S.; BANERJEE, T.; RUSSEL, J.J.; JONES, E.L.; GRIMBLE, R.F.; WILLIAMS, C.M.; YAQOOB, P.; CALDER, P.C. Opposing effects of *cis*-9,*trans*-11 and *trans*-10,*cis*-12 conjugated linoléico acid on blood lipids in healthy humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, p. 614 – 620, 2004.
- TURPEINEN, A.M.; MUTANEN, M.; ARO, A.; SALMINEN, I.; BASU, S.; PALMQUIST, D.L.; GRIINARI, J.M. Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, p. 504 – 510, 2002.

- UAUY D, R.; MARTÍNEZ A, J.I.; ROJAS B, C.V. Nutrición molecular, papel del sistema PPAR en el metabolismo lipídico y su importancia en obesidad y diabetes mellitus. **Revista Médica de Chile**, v. 128, p. 437 – 446, 2000.
- UEDA, T; IGARASHI, O. Determination of vitamin E in biological specimens and foods by HPLC-pretreatment of samples and extraction of tocopherols. **Journal of Micronutrient Analysis**, v.7, p. 79 – 96, 1990.
- UPSTON, J.M.; TARENTIS, A.C.; STOCKER, R. Tocopherol-mediated peroxidation of lipoproteins: implications for vitamin E as a potential antiatherogenic supplement. **The FASEB Journal**, v. 13, p. 977 – 994, 1999.
- URQUHART, P.; PARKIN, S.M.; ROGERS, J.S.; BOSLEY, J.A.; NICOLAOU, A. The effect of conjugated linoleic acid on arachidonic acid metabolism and eicosanoid production in human saphenous vein endothelial cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1580, p. 150 – 160, 2002.
- VALEILLE, K.; FÉRÉZOU, J.; PARQUET, M.; AMSLER, G.; GRIPOIS, D.; QUIGNARD-BOULANGÉ, A.; MARTIN, J.C. The natural concentration of the conjugated linoleic acid, *cis*-9,*trans*-11, in milk fat has antiatherogenic effects in hyperlipidemic hamsters. **The Journal of Nutrition**, v. 136, p. 1305 – 1310, 2006.
- VALLEILLE, K.; FÉRÉZOU, J.; AMSLER, G.; QUIGNARD-BOULANGÉ, A.; PARQUET, M.; GRIPOIS, D.; DOROVSKA-TARAN, V.; MARTIN, J.C. A *cis*-9,*trans*-11-conjugated linoleic acid-rich oil reduces the outcome of atherogenic process in hyperlipidemic hamster. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, p. H652 – H659, 2005.
- Van AALST, J.A.; BURMEISTER, W.; FOX, P.L.; GRAHAM, L.M. α -Tocopherol preserves endothelial cell migration in presence of cell-oxidized low-density lipoprotein by inhibiting changes in cell membrane fluidity. **Journal of Vascular Surgery**, v. 39, p. 229 – 237, 2004.
- VILLA-COLINAYO, V.; SHI, W.; ARAUJO, J.; LUSIS, A.J. Genetics of atherosclerosis: the search for genes acting at the level of the vessel wall. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 2, p. 380 -389, 2000.

- VIOLI, F.; CANGEMI, R.; SABATINO, G.; PIGNATELLI, P. Vitamin E for the treatment of cardiovascular disease. Is there a future? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1031, p. 292 – 304, 2004.
- VIRMANI, R.; KOLODGIE, F.D.; BURKE, A. P.; FARB, A; SCHWARTZ, S.M. Lessons from sudden coronary death. A comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 20, p. 1262 – 1275, 2000.
- von KNETHEN, A.; CALLSEND.; BRÜNE, B. Superoxide attenuates macrophage apoptosis by NF- κ B and AP-1 activation that promotes cyclooxygenase-2 expression. **The Journal of Immunology**, v. 163, p. 2858 – 2866, 1999.
- YU, L. Free radical scavenging properties of conjugated linoleic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3452 – 3456, 1991.
- YU, L.; ADAMS, D.; WATKINS, B.A. Comparison of commercial supplements containing conjugated linoleic acid. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 16, p. 419 – 428, 2003.
- YU, L. ADAMS, D.; GABEL, M. Conjugated linoleic acid isomers differ in their free radical scavenging properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4135 – 4140, 2002a.
- YU, Y., CORREL, P.H., VANDEN HEUVEL, J.P. Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR γ -dependent mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1581, p. 89 – 99, 2002b.
- WAHLE, K.W.J.; HEYS, S.D.; ROTONDO, D. Conjugated linoleic acid: are they beneficial or detrimental to health? **Progress in Lipid Research**, v. 43, p. 553 – 587, 2004.
- WANNAMETHEE, S.G.; LOWE, G.D.O.; RUMLEY, A.; BRUCKDORFER, K.R.; WHINCUP, P.H. Associations of vitamin C status, fruit and vegetable intakes, and markers of inflammation and hemostasis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, p. 567 – 574, 2006.
- WARNICK, G.R.; NAUCK, M.; RIFAI, N. HDL-cholesterol from ultracentrifugation to homogeneous assays . **Clinical Chemistry**, v. 47, p. 1579 – 96, 2001.

- WEINBERG, P.D. Analysis of the variable effect of dietary vitamin E supplements on experimental atherosclerosis. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 823 – 833, 2005.
- WILLET, W.C.; STAMPFER, M.J.; MASON, J.E. Intake of trans fatty acids and risk of coronary heart disease among women. **Lancet**, v. 341, p. 581 – 585, 1993.
- WILSON, T.A.; NICOLOSI, R.J.; SAATI, A.; KOTYLA, T.; KRITCHEVSKY, D. Conjugated linoleic acid isomers reduce blood cholesterol levels but not aortic cholesterol accumulation in hypercholesterolemic hamsters. **Lipids**, v. 41, n. 1, p. 41 – 48, 2006.
- WILSON, T.A.; NICOLOSI, R.J.; CHRYSAM, M.; KRITCHEVSKY, D. Conjugated linoleic acid reduces early aortic atherosclerosis greater than linoléico acid in hypercholesterolemic hamsters. **Nutrition research**, v. 20, p. 1795 – 1805, 2000.
- ZHAO, L.; PRATICÒ, D.; RADER, D.J.; FUNK, C.D. 12/15-Lipoxygenase gene disruption and vitamin E administration diminish atherosclerosis and oxidative stress in apolipoprotein E deficient mice through a final common pathway. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 78, p. 185 – 193, 2005.
- ZUREIK, M.; GALAN, P.; BERTRAIS, S.; MENNEN, L.; CZERNICHOW, S.; BLACHER, J.; DUCIMETIÈRE, P.; HERCBERG, S. Effects of long-term daily low-dose supplementation of antioxidant vitamins and minerals on structure and function of large arteries. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, p. 1485 – 1491, 2004.