

EDENIL COSTA AGUILAR

**EFEITOS DO ÓLEO DE PEQUI (*Caryocar brasiliense* Camb.)
SOBRE A ATEROGÊNESE E O ESTRESSE OXIDATIVO EM
CAMUNDONGOS LDL RECEPTOR KNOCKOUT
ALIMENTADOS COM DIETA ATEROGÊNICA**

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

2010

EDENIL COSTA AGUILAR

**EFEITOS DO ÓLEO DE PEQUI (*Caryocar brasiliense* Camb.)
SOBRE A ATEROGÊNESE E O ESTRESSE OXIDATIVO EM
CAMUNDONGOS LDL RECEPTOR KNOCKOUT
ALIMENTADOS COM DIETA ATEROGÊNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Dra. Jacqueline I. Alvarez-Leite

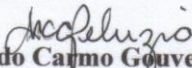
BELO HORIZONTE-MG
FEVEREIRO – 2010




Universidade Federal de Minas Gerais -
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
 31270-901 - Belo Horizonte - MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3499-2615

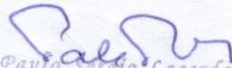


ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE EDENIL COSTA AGUILAR. Aos quatro dias do mês de fevereiro de 2010 às 9:30 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Efeito do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) sobre a aterogênese e o estresse oxidativo em camundongos LDL receptor knockout alimentados com dieta aterogênica" requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia. Abrindo a sessão a Presidente da Comissão Profa. Jacqueline Isaura Alvarez Leite da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Maria do Carmo Gouveia Peluzio da Universidade Federal de Viçosa, aprovado; Dra. Miriam Martins Chaves da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite, orientadora, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado APROVADO. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo tratar a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 4 de fevereiro de 2010.


 Profa. Maria do Carmo Gouveia Peluzio – UFV


 Profa. Miriam Martins Chaves – UFMG


 Profa. Jacqueline Isaura Alvarez Leite – orientadora – UFMG


 Prof. Paulo Sérgio Lacerda Beirão
 Coordenador "pro tempore" do Curso
 de Pós Graduação em
 Bioquímica - Imunologia
 ICB - UFMG

Aguilar, Edenil Costa

Efeitos do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) sobre a aterogênese e o estresse oxidativo em camundongos LDL receptor knockout alimentados com dieta aterogênica. [manuscrito] / Edenil Costa Aguilar. – 2010.

99 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Jacqueline I. Alvarez-Leite.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Óleo de pequi – Teses. 2. Ácidos graxos – Teses. 3. Lipídeos - Teses. 4. Aterosclerose – Teses. 5. Estresse oxidativo – Teses. 6. Bioquímica – Teses. I. Alvarez-Leite, Jacqueline Isaura. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Bioquímica e Imunologia. III. Título.

CDU: 616.13-004.6

“... E a ciência se multiplicará”.

Daniel 12:4

Aos meus queridos pais que tanto amo, Adenito da C. Aguilár e Dalvany A. Aguilár,
à minha querida irmã Edinalva A. Aguilár, que sempre se faz presente,
e a minha sobrinha Débora A. Fagundes, que tanto tem alegrado nossos corações,
dedico.

Agradecimentos

À minha orientadora professora Jacqueline I. Alvarez Leite, pelo grande apoio e direcionamento.

Aos professores do departamento de Bioquímica e Imunologia, pelos ensinamentos na singular disciplina Bases Moleculares da Estrutura e Função da Célula. E aos funcionários, pelo serviço prestado.

À técnica Maria Helena, pelo seu essencial cuidado com os animais utilizados nos experimentos.

Aos grandes amigos do LABiN, pelo companheirismo e auxílio nos trabalhos desenvolvidos e pelas diversas demonstrações de amizade. Em especial, as minhas colaboradoras Tatianna e Lílian, que tanto prestaram sua ajuda para que esse trabalho se concretizasse.

Aos colegas de Bases ..., pelos momentos de estudos e também de diversão.

À Ana Cecília, Juliana e Luciana pelo auxílio em diversas técnicas no laboratório.

Ao Luciano pelos ensinamentos técnicos

À Analina, nossa *labiniana* agregada, pelo companheirismo e ensinamentos.

À Érica e ao Juan, pela grande e fundamental ajuda técnica.

Aos laboratórios deste e de outros departamentos que abriram as portas, sendo fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Às instituições financiadoras, CAPES, FAPEMIG e CNPq, pelo incentivo financeiro.

À minha família, que é muito especial para mim e, embora longe, está sempre perto, dentro do meu coração.

Agradeço especialmente Àquele que é o responsável por tudo acima alcançado: Deus.

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas	VII
Lista de Figuras	X
Lista de tabelas	XII
Resumo	XIII
Astract.....	XIV
1- Introdução	15
2- Revisão de Literatura	17
2.1- O <i>Caryocar brasiliense</i>	18
2.2- Metabolismo lipídico	21
2.3- Lipídeos da dieta e dislipidemias	23
2.4- Aterosclerose.....	24
2.5- Estresse oxidativo	28
I- <i>Espécies Reativas de Oxigênio</i>	30
II- <i>Danos das ROS ao organismo</i>	31
III- <i>Estresse oxidativo e aterosclerose</i>	32
IV- <i>Sistema antioxidante</i>	33
2.6- Modelo murino de aterosclerose.....	35
3- Justificativa	37
4- Objetivos	39
4.1- Objetivo geral.....	40

4.2- Objetivos específicos.....	40
5-Materiais e Métodos	41
5.1-Animais e grupos experimentais	42
5.2- Preparo das dietas	43
5.3- Verificação do consumo da dieta	44
5.4- Avaliação da evolução ponderal e ganho de peso corporal	44
5.5- Avaliação do metabolismo lipídico	44
5.5.1- Exames bioquímicos séricos.....	45
I- Colesterol Total.....	45
II- HDL-colesterol	46
III- Triglicerídeos.....	47
5.5.2- Verificação do perfil lipídico hepático e cecal	48
5.6- Avaliação da glicemia	49
5.7- Avaliação da aterosclerose	50
5.7.1-Área de lesão na aorta	50
5.7.2-Lesões ateroscleróticas na válvula aórtica	51
5.7.3- Avaliação da deposição de colágeno na válvula aórtica	52
5.8- Avaliação do estresse oxidativo.....	52
5.8.1- Peroxidação lipídica.....	52
5.8.2- Investigação da presença de anticorpos anti-LDL oxidada.....	53
I- Separação da LDL	54
II- Oxidação da LDL	54
III- Quantificação das Imunoglobulinas Anti - LDL Oxidada	55

5.8.2- Verificação da produção de espécies reativas de oxigênio por macrófagos peritoneais.....	56
5.9-Avaliação da atividade de enzimas antioxidantes	56
5.9.1- Determinação da atividade de superóxido dismutase	57
5.9.2- Determinação da atividade de catalase	57
5.10- Métodos estatísticos de tratamento dos dados	58
6- Resultados	59
6.1- Consumo alimentar e peso corporal	60
6.2- Metabolismo lipídico e glicemia	60
6.2.1- Perfil lipídico e glicêmico sanguíneo	61
6.2.2- Perfil lipídico hepático e cecal	61
6.3- Avaliação da aterosclerose	62
6.4- Estresse oxidativo	66
6.4.1- Peroxidação lipídica no fígado	66
6.4.2- Atividade de enzimas antioxidantes.....	67
6.4.3- Determinação de anticorpos anti-LDL oxidada.....	67
6.4.4- Verificação da produção de espécies reativas de oxigênio por macrófagos peritoneais.....	68
7- Discussão	71
8- Conclusão	81
9- Referências bibliográficas.....	83
ANEXO	98
Anexo A- Parecer do Comitê de Ética em experimentação animal.....	99

Lista de abreviaturas e siglas

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
$\mu\text{mol/g}$	Micromol por grama
$\mu\text{mol/L}$	Micromol por litro
μM	Micro molar
apo	Apoproteínas
apo E ^{-/-}	Deficiente na apoproteína E
BHT	Hidroxitolueno butilado
°C	Grau centígrado
CT	Colesterol total
Cu ²⁺	Íon cuproso
CuCl ₂	Cloreto de cobre
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPPH	2-difenil-1-picril hidrazil
ecSOD	Superóxido dismutase extra celular
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético
ELISA	“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”

GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSH	Glutaciona oxidada
HDL-c	HDL-colesterol
HE	Hematoxilina-eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HOCl	Hiperclorito
H ₂ SO ₄	Ácido sulfurico
ICAM	Molécula-1 de adesão intercelular
IDL	Lipoproteínas de densidade intermediária
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLr ^{-/-}	Deficiente no receptor de LDL
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
mg/dL	Miligrama por decilitro
mg/kg	Miligramas por quilograma de peso
MDA	Malondialdeído
MCP1	Moléculas quimiotáticas para monócitos
MnSOD	Superóxido dismutase mitocondrial
MTT	brometo de dimetiltiazol-difeniltetrazolium
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nm	Nanômetro
NO [•]	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal

O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH [·]	Radical hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OPD	ortofenileno-diamino
PBS	Salina tamponada com fosfato
PUFA	Ácidos graxos poli-insaturados
QM	Quilomícrons
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
rpm	Rotações por minuto
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TG	Triglicerídeos
U/mg	Unidades por miligrama
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VCAM-1	Molécula-1 de adesão vascular
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

Lista de Figuras

- Figura 1- *Caryocar brasiliense*. A. Pequizeiro nativo da região de Montes Claros – MG. B. Flor do pequizeiro. C. Frutificação do pequizeiro.19
- Figura 2- Foto dos frutos do pequizeiro. A. Fruto seccionado. B. Putâmens. C. Putâmen seccionado permitindo visualização da amêndoa.19
- Figura 3 - Tamanho aproximado e densidade das lipoproteínas do soro.22
- Figura 4 – Representação esquemática do processo de formação da aterosclerose nas artérias.26
- Figura 5 - Composição celular da placa aterosclerótica.26
- Figura 6 - Relações entre espécies reativas de oxigênio (ROS), defesa antioxidante (AO) (incluindo reparação) sistemas e estresse oxidativo.29
- Figura 7- Mimetismo molecular entre epítomos da LDL oxidada, célula apoptótica e fosforilcolina (PC – *Phosphorylcholine*) de patógenos.33
- Figura 8- Fórmula molecular do aduto formado na reação entre o ácido tiobarbitúrico e o malondialdeído na técnica de TBARS. Sua coloração róseo-alaranjada é detectável espectrofotometricamente a 535nm.53
- Figura 9- Área de lesão aterosclerótica na válvula aórtica dos camundongos LDLr-/- após seis semanas sob dieta controle (óleo de soja) ou enriquecida com óleo de pequi.63
- Figura 10- Deposição de colágeno na válvula aórtica dos camundongos LDLr-/- após seis semanas sob dieta controle (óleo de soja) ou enriquecida com óleo de pequi.64
- Figura 11- Área de lesão nas aortas dos camundongos LDLr-/- após seis semanas sob dieta controle (óleo de soja) ou enriquecida com óleo de pequi. 65
- Figura 12- Peroxidação lipídica no fígado dos camundongos LDLr-/- após seis semanas sob dieta controle (óleo de soja) ou enriquecida com óleo de pequi. 66

Figura 13- Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) (A) e catalase (B) no fígado dos camundongos LDLr^{-/-} após seis semanas sob dieta controle (óleo de soja) ou enriquecida com óleo de pequi.67

Figura 14- Imunoglobulinas anti-LDL oxidada no soro de camundongos LDLr^{-/-} após seis semanas sob dieta controle (óleo de soja) ou enriquecida com óleo de pequi.68

Figura 15- Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por macrófagos peritoneais residentes retirados de camundongos LDLr^{-/-} após duas semanas sob dieta controle (óleo de soja) ou enriquecida com óleo de pequi.69

Lista de tabelas

Tabela 1- Composição percentual em ácidos graxos do óleo de soja* e do óleo da polpa pequi**	20
Tabela 2- Composição das dietas controle e experimental ofertadas aos animais, baseadas na dieta padrão (AIN-93G), acrescida de 1,25% de colesterol.....	43
Tabela 3- Consumo alimentar semanal, por grupo, peso inicial, peso final e ganho de peso dos camundongos LDLr-/- submetidos a dieta controle (óleo de soja) ou enriquecida com óleo de pequi durante seis semanas	60
Tabela 4- Perfil lipídico e glicêmico sanguíneo dos camundongos LDLr-/- após seis semanas sob dieta controle (óleo de soja) ou enriquecida com óleo de pequi.....	61
Tabela 5 – Perfil lipídico do fígado e conteúdo cecal dos camundongos LDLr-/- após seis semanas sob dieta controle (óleo de soja) ou enriquecida com óleo de pequi	62

Resumo

O *Caryocar brasiliense*, ou pequi, é amplamente usado como alimento pela população do nordeste brasileiro. O óleo extraído do pequi possui alta concentração de ácidos graxos monoinsaturados (componente ateroprotetivo), embora a quantidade de ácidos graxos saturados, principalmente de ácido palmítico, seja bem expressiva, o que é associado ao risco para aterosclerose. Alta quantidade de carotenóides e compostos fenólicos no óleo de pequi confere a ele propriedades antioxidantes, o que é outro fator benéfico na aterogênese. Assim, nosso objetivo foi estudar o efeito do óleo de pequi no metabolismo lipídico, aterosclerose e estresse oxidativo em modelo experimental de aterosclerose. Os animais foram divididos em grupo controle e óleo de pequi, recebendo dieta aterogênica rica em óleo de soja ou óleo de pequi, respectivamente. Ao final do experimento, os animais recebendo óleo de pequi apresentaram piora do perfil lipídico quando comparados ao grupo controle. A lesão aterosclerótica foi também maior no sinus aórtico no grupo que recebeu óleo de pequi em comparação com os controles. Surpreendentemente, quando as lesões iniciais da aorta torácica foram analisadas, houve uma redução da área aterosclerótica nos animais alimentados com óleo de pequi. O grupo recebendo óleo de pequi também apresentou menor estresse oxidativo, indicado pela menor peroxidação lipídica e menor concentração sérica de anticorpos anti-LDL oxidada. Experimento *ex vivo*, utilizando macrófagos peritoneais extraídos de animais de ambos os grupos, mostrou redução na liberação de espécies reativas de oxigênio nos animais do grupo óleo de pequi. A partir destes dados, sugerimos que o óleo, pela sua atividade antioxidante e teor de monoinsaturados, reduz a velocidade de evolução da aterogênese (como visto nas lesões aórticas), mas com o aumento crescente da colesterolemia induzido pelo seu alto teor de ácido palmítico, este efeito é suplantado, dando lugar à grande migração destas LDL para o subendotélio, aumentando assim o aparecimento de placas maiores e mais maduras. Em conclusão, dietas suplementadas com óleo de pequi são fatores de risco para aterosclerose a longo prazo e apesar de sua ação antioxidante, devem ser dadas com cautela para pacientes com risco aumentado de infarto agudo do miocárdio ou lesão comprovada de aterosclerose.

Palavras-chave: Pequi; ácidos graxos; lipídeos; aterosclerose; estresse oxidativo.

Astract

The Caryocar brasiliense, or pequi, is a popular food in northeastern of Brazil. The oil extracted from pequi has a high concentration of both monounsaturated and saturated fatty acids. The first one is a well established antiatherogenic factor, although the second one is associated with increased risk of atherosclerosis. The high amount of carotenoids and phenolic compounds in pequi oil, gives it antioxidant properties, which is also a beneficial factor in atherogenesis. Thus, our objective was to study the effect of pequi oil on lipid metabolism, atherosclerosis and oxidative stress in experimental model of atherosclerosis. The LDL receptor deficient mice were divided into control and pequi oil groups, receiving soybean or pequi oil supplemented atherogenic diet, respectively. After 6 experimental weeks, animals from pequi oil group showed a worse lipid profile when compared to the control one. The atherosclerotic lesion was also increased in the aortic sinus in the group receiving oil from pequi. Surprisingly, when the early lesions presented in thoracic/abdominal aorta were analyzed, we found a reduction of the atherosclerotic lesion in animals fed on pequi oil. The pequi oil group also showed a lower oxidative stress, indicated by the reduction on lipid peroxidation and decreased serum concentrations of anti-oxidized LDL antibody. In an "ex vivo" experiment using macrophages extracted from animal peritoneum showed a reduction in the release of reactive oxygen species in pequi oil group. Based on these data, we suggest that the pequi oil, due to its antioxidant activity and content of monounsaturated fat, slows atherogenesis in initial stages (as seen in aortic lesions). However, the increasing of serum cholesterol and atherogenic fractions induced by its high content of palmitic acid, induces a more important LDL migration toward intima of arteries, increasing a larger and more mature atherosclerotic plaque. In conclusion, pequi oil supplemented diet is a risk factor for dislipidemia and atherosclerosis, despite its antioxidant action, and it is not indicated for patients with increased risk of acute myocardial infarction or advantaged atherosclerosis.

Keywords: Pequi oil; fatty acid; lipids; atherosclerosis; oxidative stress.

1- Introdução

O pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) é uma espécie arbórea nativa do Cerrado, cujo fruto (polpa e amêndoa) é de grande importância na alimentação e na fitomedicina tradicional da população desse bioma. O pequi possui características nutricionais importantes como elevada concentração de β -caroteno e principalmente de lipídeos, incrementando o conteúdo energético da dieta destas comunidades. O óleo extraído da polpa é bastante utilizado no preparo de pratos típicos e também com finalidades medicinais (CETEC, 1983; ALMEIDA et al., 1998; ROESLER et al., 2008).

O consumo de alimentos ricos em lipídeos e seus efeitos na saúde humana tem sido um importante ponto de interesse da pesquisa em nutrição (SABARENSE, 2003), já que estão diretamente associados à dislipidemia e aterosclerose. A composição em ácidos graxos dos alimentos tem efeito direto no perfil lipídico sanguíneo, sendo que os ácidos graxos insaturados tem implicações benéficas enquanto que os saturados promovem elevação do colesterol sérico gerando quadros de dislipidemias. As dislipidemias são a principal causa da ocorrência de aterosclerose, uma vez que esta consiste em uma alteração patológica em que há depósito de colesterol na camada íntima arterial desencadeando processos inflamatórios.

O óleo de pequi possui concentração em ácidos graxos bastante heterogênea, sendo, portanto, um promissor alvo de pesquisa quanto aos seus efeitos no perfil lipídico do organismo e no desenvolvimento da aterosclerose. Além disso, por ser um fruto rico em carotenóides, é possível que sua ingestão apresente efeitos antioxidantes e, por consequência, altere outro importante fator associado à aterosclerose: o estresse oxidativo.

2- Revisão de Literatura

2.1- O *Caryocar brasiliense*

O Cerrado é um importante bioma brasileiro, destacando-se por ser o segundo maior do país, ocupando cerca de 22% do território nacional. A variedade em tipos fisionômicos presente lhe confere ampla biodiversidade, sendo o *Caryocar brasiliense* Camb. uma espécie de grande destaque (ROESLER et al., 2008).

O pequi é uma espécie arbórea do Cerrado pertencente à família Caryocaraceae (Figura 1), e seu fruto é conhecido popularmente como pequi, piqui, piquiá ou piqui-do-cerrado (ALMEIDA et al., 1998). O nome, de origem indígena, onde **py** significa pele e **qui**, espinho, está relacionado a grande quantidade de espinhos presente no endocarpo do fruto (MAGALHÃES, 1988).

O fruto do *C. brasiliense* é drupóide contendo de um a quatro putâmens ou pirênios, vulgarmente conhecidos como caroços, envolvidos pelo mesocarpo externo, de coloração verde claro, e epicarpo, verde escuro (Figura 2). Cada putâmem é constituído por uma semente, que contém a amêndoa, envolvida por um endocarpo rígido e espinhoso e pelo mesocarpo interno, pigmentado de amarelo intenso. O mesocarpo interno constitui a parte comestível do fruto: a tradicional polpa do pequi. Embora a amêndoa também seja comestível. Esta é menos apreciada devido à dificuldade em seccionar os putamêns, uma vez que possui muitos espinhos (ALMEIDA et al., 1998).



Figura 1- *Caryocar brasiliense*. A. Pequieiro nativo da região de Montes Claros – MG. B. Flor do pequieiro. C. Frutificação do pequieiro. (Fonte: Laboratório de Botânica da Universidade Estadual de Montes Claros – UNIMONTES).



Figura 2- Foto dos frutos do pequieiro. A. Fruto seccionado. B. Putâmens. C. Putâmen seccionado permitindo visualização da amêndoa. (Fonte: Laboratório de Processamento de Alimentos da Universidade Estadual de Montes Claros – UNIMONTES).

O óleo da polpa do pequi tem sido equiparado, pelo seu elevado teor vitamínico, aos óleos de fígado de bacalhau e de cação (MAGALHÃES, 1988). Sua composição em ácidos graxos insaturados é de 61,35%, sendo que o oléico compõe o principal (Tabela 1). O ácido graxo palmítico ocupa a maior parcela dos saturados (LIMA et al., 2007). Esses valores são similares aos já anteriormente descritos por Handro e Barradas (1971) podendo se observar que o teor em ácidos graxos saturados é bastante expressivo no óleo da polpa de pequi, sendo, inclusive, superior a outros óleos comumente utilizados, como o óleo de soja, por exemplo. Na Tabela 1 pode-se observar as diferenças da composição em ácidos graxos entre o óleo de soja e o óleo de pequi.

Tabela 1- Composição percentual em ácidos graxos do óleo de soja* e do óleo da polpa pequi**

Ácidos graxos	Nº carbonos	O. Soja*	O. Pequi**
Láurico	C12:0	0,12	0,04
Mirístico	C14:0	<0,1	0,13
Palmítico	C16:0	9,0	35,17
Palmitoléico	C16:1	0,2	1,03
Esteárico	C18:0	5,8	2,25
Oléico	C18:1 n-9	22,6	55,87
Cis-vacênico	C18:1 n-7	nd	1,9
Linoléico	C18:2	52,4	1,53
α-linoléico	C18:3	8,2	0,45
Araquidônico	C20:0	nd	0,23
Gadoléico	C20:1	nd	0,27
Docosaxeaenóico	C22:6	nd	nd
Total de saturados		15,82	38,97
Monoinsaturados		22,8	59,07
Poli-insaturados		60,6	2,28
Não identificados		<0,1	0,68

nd= não identificados

*Fonte: OLIVEROS et al., 2003 (adaptado)

**Fonte: LIMA et al., 2007 (adaptado)

Diversos estudos têm demonstrado atividades antioxidantes de extratos do pequi, como a capacidade de seqüestrar radicais livres 2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH), redução da degradação oxidativa de 2-deoxyribose, redução da peroxidação lipídica de microsomas hepáticos de ratos e ação protetora contra danos oxidativos ao DNA (PAULA-JUNIOR, 2006; KHOURI et al., 2007; ROESLER et al., 2007; MIRANDA-VILELA et al., 2009a; ROESLER et al., 2008). Redução de marcadores inflamatórios também tem sido associada à ingestão de pequi (MIRANDA-VILELA et al., 2009b). As características antioxidantes do pequi podem ter implicações importantes em relação ao estresse oxidativo.

Outros estudos com extratos do pequi têm demonstrado atividade antifúngica e ação moluscicida (Passos et al., 2002; SILVA et al., 2003b). O uso terapêutico do pequi é bastante diversificado, tais como regulador do fluxo menstrual, tonificante, contra bronquites, como expectorante, e ao óleo também é atribuído um efeito controlador de tumores (ALMEIDA et al., 1998).

2.2- Metabolismo lipídico

Os lipídeos são a principal forma de estoque energético no organismo, mas também constituem os componentes essenciais das membranas celulares. Estes compostos possuem atividades físico-químicas diversas sendo representados principalmente pelos triglicerídeos (TG), fosfolipídeos e colesterol (ROSS, 1995; FRANSSEN et al., 2008).

Os lipídeos são compostos apolares e, por isso, insolúveis em água. Sendo assim, a associação de lipídeos com proteínas ocorre para a formação de partículas solúveis em água. Desse modo são constituídas as lipoproteínas para o transporte de lipídeos no plasma sanguíneo (CHAMPE et al., 2007; FRANSSEN et al., 2008).

As proteínas componentes das lipoproteínas são denominadas apoproteínas (apo). Além de atuarem no transporte de lipídeos, elas possuem

diversas outras funções tais como proporcionar locais para o reconhecimento de receptores da superfície celular, e servindo como ativadores ou coenzimas para as enzimas envolvidas no metabolismo das lipoproteínas. Algumas das apolipoproteínas são exigidas como componentes estruturais essenciais das partículas e não podem ser removidas, enquanto outras são transferidas livremente entre lipoproteínas. Apolipoproteínas estão divididos por função e estrutura em cinco grandes categorias, de A a E (CHAMPE et al., 2007).

As lipoproteínas diferem em tamanho e composição (Figura 3). Os quilomícrons (QM) são as lipoproteínas de menor densidade e maior tamanho. As lipoproteínas de densidade muito baixa (*very low density lipoprotein* – VLDL) e as lipoproteínas de densidade baixa (*low density lipoprotein* – LDL) são sucessivamente mais densas, com maiores proporções de proteínas em relação aos lipídeos. As lipoproteínas de densidade alta (*high density lipoprotein* – HDL) são as partículas mais densas (CHAMPE et al., 2007).

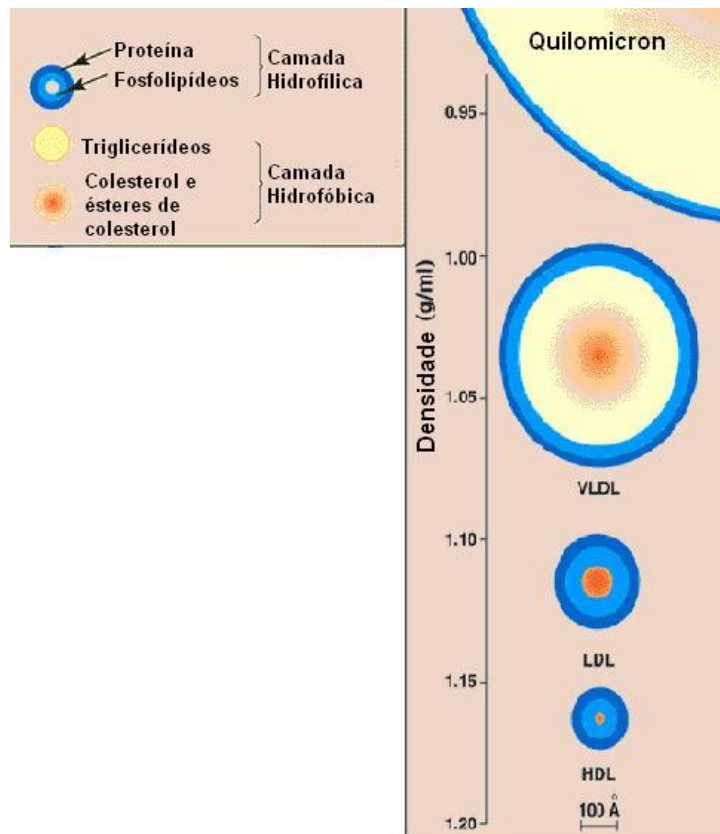


Figura 3 - Tamanho aproximado e densidade das lipoproteínas do soro. CHAMPE et al., 2007

Lipoproteínas ricas em TGs são secretadas na circulação sanguínea pelo fígado como VLDL e pelo sistema digestivo, como quilomícrons. Sendo estes, oriundos dos lipídeos da dieta (FRANSSEN et al., 2008). A ação da enzima lipase lipoproteica presente na membrana basal das células endoteliais dos vasos sanguíneos leva à remoção dos triglicerídeos das lipoproteínas. A remoção dos TG dos quilomícrons gera os quilomícrons remanescentes que são removidos da circulação pelo fígado. Já a remoção dos triglicerídeos das VLDL leva à formação das lipoproteínas de densidade intermediária (*intermediary density lipoprotein* – IDL). Cerca de 50% das partículas de IDL são removidas da circulação pelo fígado e o restante é convertido em LDL pela lipase lipoprotéica ou transformados em LDL no plasma após a perda de apoproteína-E, dentre outras modificações (ALVAREZ-LEITE, 1995).

A principal função das partículas de LDL é fornecer o colesterol aos tecidos periféricos. Por meio dos receptores nas superfícies celulares que reconhecem a apoproteína B-100, as LDL entram em contato com os tecidos e ocorre a deposição de colesterol nas membranas (CHAMPE et al., 2007).

A remoção do excesso de colesterol livre dos tecidos periféricos e lipoproteínas, e subsequente depósito no fígado para secreção é chamado transporte reverso de colesterol. O colesterol é secretado pelo fígado através da bile. Esse processo é mediado pela HDL e suas principais fontes são o fígado, intestino e os remanescentes de lipoproteínas (ALVAREZ-LEITE, 1995).

2.3- Lipídeos da dieta e dislipidemias

Devido aos inúmeros fatores de risco dietéticos que afetam os lipídeos séricos, têm-se investigado a quantidade e a qualidade das gorduras, colesterol e outras substâncias dietéticas para verificar como elas afetam o perfil lipídico do organismo (KRAUSE, 2003).

A quantidade e qualidade da gordura ingerida influenciam diretamente a concentração do colesterol plasmático (MORAIS et al., 2003), cujos níveis

elevados aumentam o risco de doenças cardiovasculares (CHAMPE et al., 2007).

O consumo de dieta rica em gordura afeta o perfil lipídico sérico e a composição em ácidos graxos é um importante fator na modulação do metabolismo lipídico do organismo. Uma maior ingestão de ácidos graxos saturados aumenta os níveis de LDL e reduz HDL sendo que, esta, é uma conhecida condição para o desenvolvimento de doença arterial coronariana, pois o HDL é inversamente relacionado à aterosclerose, enquanto o LDL é um importante fator de risco para eventos cardiovasculares (PUIGGRÓS et al., 2002; ÁGUILA et al., 2002; GERMAN e DILLARD, 2004). Portanto, o balanço de ácidos graxos insaturados é importante ao selecionar os alimentos, e dieta rica em monoinsaturados e poli-insaturados deve ser usada preferencialmente uma vez que reduz o risco de aterosclerose (BINKOSKI et al., 2005; CASÓS et al., 2008)

2.4- Aterosclerose

O termo aterosclerose é derivado do grego *athero*, significando “grosso”, e *sclerosis*, significando “endurecimento”. A aterosclerose é uma doença multifatorial e progressiva com um importante componente inflamatório associado a mudanças no perfil lipídico, como já anteriormente mencionado. Pode ser considerada uma forma de inflamação crônica resultante da interação entre lipoproteínas modificadas oxidativamente, macrófagos e células T. Tal resposta inflamatória ocorre em estímulo à presença de um agente inflamatório, sendo esse, freqüentemente, a LDL oxidada. A agregação de lipoproteínas na íntima arterial tem sido proposta como sendo primordial na aterosclerose (ROSENSON, 2004; HANSSON e LIBBY, 2006; MALLIKA et al., 2007; CASÓS et al., 2008).

O fluxo sanguíneo gera importantes forças físicas que agem nas células endoteliais, denominadas forças de cisalhamento ou *shear stress*, que tem

efeito sobre a morfologia dessas células. Células em regiões tubulares das artérias, onde o fluxo sanguíneo é uniforme e laminar, possuem forma elipsóide e são alinhadas na direção do fluxo. Células em regiões da ramificação arterial ou curvatura, onde o fluxo é perturbado ou possuem baixo *shear stress*, tem formas poligonais e sem orientação específica. Estas últimas áreas mostram aumento da permeabilidade a macromoléculas, tais como LDL e são locais preferenciais para a formação de lesões ateroscleróticas (LUSIS, 2000).

Concentrações elevadas de LDL na corrente sanguínea facilitam sua migração por entre as células endoteliais que interagem com proteoglicanos da matriz subendotelial resultando em sua adesão. A ação de espécies reativas de oxigênio produzidas por macrófagos residentes, células musculares lisas e células endoteliais leva à oxidação das LDL aprisionadas (STEFFENS e MACH, 2004). As LDLs oxidadas ativam a síntese de moléculas quimiotáticas para monócitos (MCP1) e a expressão de moléculas de adesão celular como P-Selectinas, VCAM e ICAM. As moléculas MCP1, então, atraem os monócitos que se ligam às P-selectinas aumentando o rolamento e, por fim, se aderem firmemente às demais moléculas de adesão, levando à sua migração via endotélio para a camada íntima do vaso (CASÓS et al., 2008). Os monócitos transformam-se, então, em macrófagos que expressam receptores *scavenger* CD36 e SR-A que se ligam às LDLs oxidadas e as fagocitam gerando a formação de células espumosas (Figura 4) devido ao acúmulo de lipídeos nesses macrófagos. Isso ocorre porque não há uma regulação negativa, ou seja, a expressão desses receptores não é regulada pelo conteúdo de partículas captadas (MANNING-TOBIN et al., 2009). Assim, dá-se início a formação da estria gordurosa, que constitui a primeira fase da lesão (MITCHINSON e BALL, 1987).

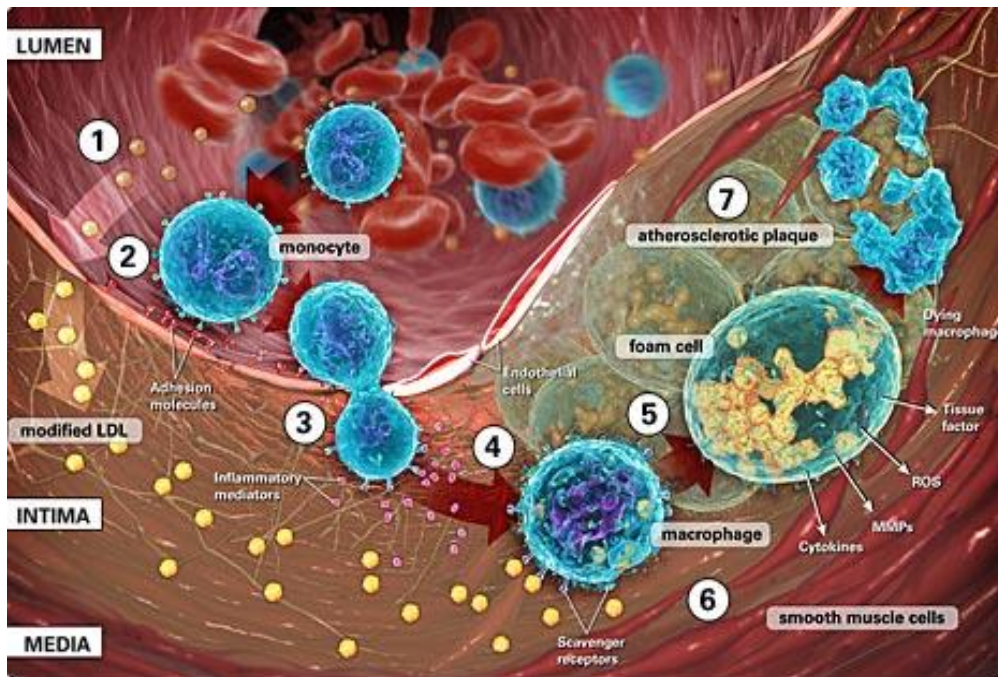


Figura 4 – Representação esquemática do processo de formação da aterosclerose nas artérias.

A entrada de LDL modificada oxidativamente na cama íntima da artéria gera a expressão de moléculas de adesão celular que levam à adesão endotelial de monócitos e sua posterior migração para a camada íntima onde se diferenciam em macrófagos. Estes por meio de receptores *scavenger* captam as partículas de LDL oxidadas formando as células espumosas (*foam cell*) e o conseqüente desenvolvimento da placa aterosclerótica. Fonte: http://www.resverlogix.com/product_development/nexvas_platform/nexvas_vascular_inflammation.html

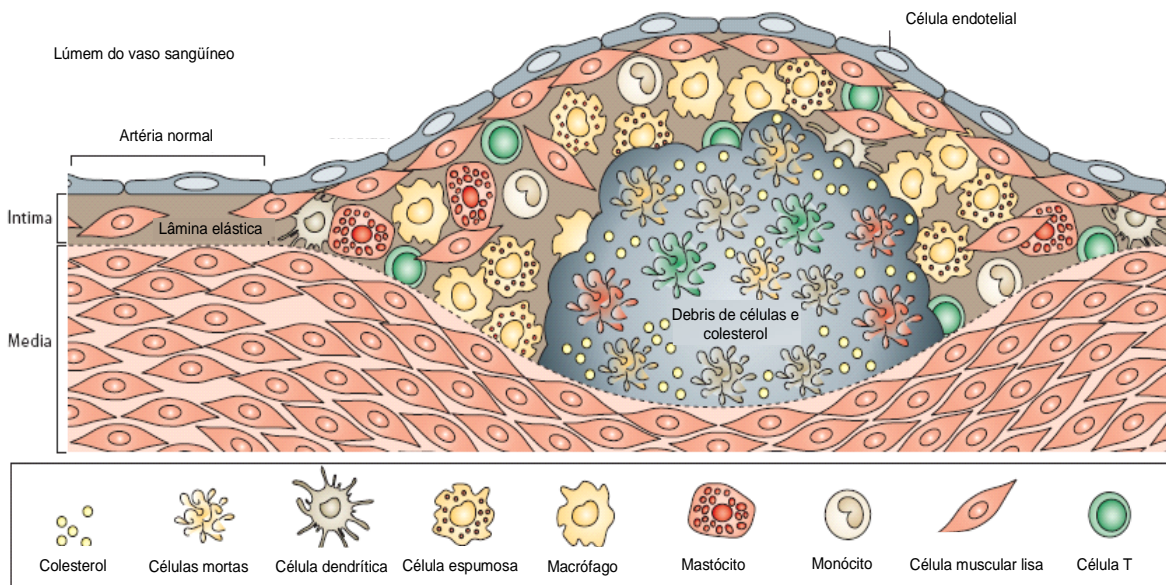


Figura 5 - Composição celular da placa aterosclerótica.

O centro da placa aterosclerótica contém lipídios e debris de células mortas. Ao entorno do centro, a capa fibrosa contém células musculares lisas e fibras de colágeno que estabilizam a placa. Células imunes, incluindo macrófagos, células T e mastócitos são populosos na placa e estão frequentemente no estado ativado. Estes produzem citocinas, proteases, moléculas pró-trombóticas e substâncias vasoativas sendo que estas afetam a inflamação da placa e a função vascular. Fonte: HANSSON e LIBBY, 2006.

Na evolução da placa ocorre uma transição de estria gordurosa, relativamente simples, para lesão fibrogordurosa. Esta é caracterizada pela migração de células musculares lisas da camada média da parede arterial para a íntima ou espaço subendotelial. Estas células podem proliferar e também captar lipoproteínas modificadas formando células espumosas. As células musculares lisas sintetizam proteínas da matriz extracelular como colágeno, elastina e proteoglicanos, e levam à formação da capa fibrosa (Figura 5) (ROSENSON, 2004; HANSSON e LIBBY, 2006; MALLIKA et al., 2007). Essas lesões, em estágio intermediário, desenvolvem um núcleo de material rico em lipídeos, sugerindo que elas representam um precursor para lesões mais avançadas, as placas fibrosas (ROSS, 1995).

As placas maduras ou fibrosas apresentam uma estrutura mais complexa. No centro da placa estão as células espumosas, os lipídeos extracelulares e as células necróticas, envolvidos por uma capa de células musculares lisas e fibras de colágeno. Células dendríticas, mastócitos e poucas células B também estão presentes na placa, sendo a região de interface do centro e capa fibrosa abundante em células T (Figura 5). Calcificações são freqüentemente encontradas próximas ao centro necrótico (ROSS, 1995; HANSSON e LIBBY, 2006).

O estresse oxidativo é um fator importante que está associado à progressão das lesões ateroscleróticas podendo aumentar a vulnerabilidade e conseqüente ruptura da placa (PARTHASARATHY et al., 2008). Aspectos sobre o estresse oxidativo e a oxidação de LDL serão melhores abordados posteriormente, bem como suas implicações no desenvolvimento da aterosclerose.

2.5- Estresse oxidativo

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*), de nitrogênio (RNS – *reactive nitrogen species*), entre outras espécies reativas, é parte integrante do metabolismo do organismo sendo observada em diversas condições fisiológicas. Por outro lado, a produção exacerbada de compostos oxidantes e produção insuficiente dos mecanismos de defesa do organismo, gerando um desequilíbrio no sistema pro e antioxidante, culmina numa condição denominada estresse oxidativo. Este pode, então, causar dano aos tecidos e órgãos e está envolvido em grande número de doenças em humanos (BUONOCORE e GROENENDAAL, 2007; GOETZ e LUCH, 2008).

O termo ROS refere-se a espécies oxidantes de oxigênio que estão em um estado mais reativo que o oxigênio molecular, e, portanto, o oxigênio pode ser reduzido em diferentes graus (GENESTRA, 2007). As ROS podem apresentar-se como radicais livres ou não. Dentre as espécies radicais mais importantes no contexto biológico são os íons superóxido, hidroxil e óxido nítrico. As espécies não-radical principais são peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e oxigênio *singlet* (MONAGHAN et al., 2009).

Para proteger contra a ação das ROS e do estresse oxidativo, um sistema antioxidante bem organizado trabalha de forma coordenada para resistir ao distúrbio redox. O termo antioxidante é amplamente definido como qualquer substância que atrasa ou evita a oxidação de um substrato. Quando o sistema antioxidante é suficiente para balancear o ataque das ROS, o organismo evita o estresse oxidativo – Figura 6 (MONAGHAN et al., 2009; POWERS e JACKSON, 2008).

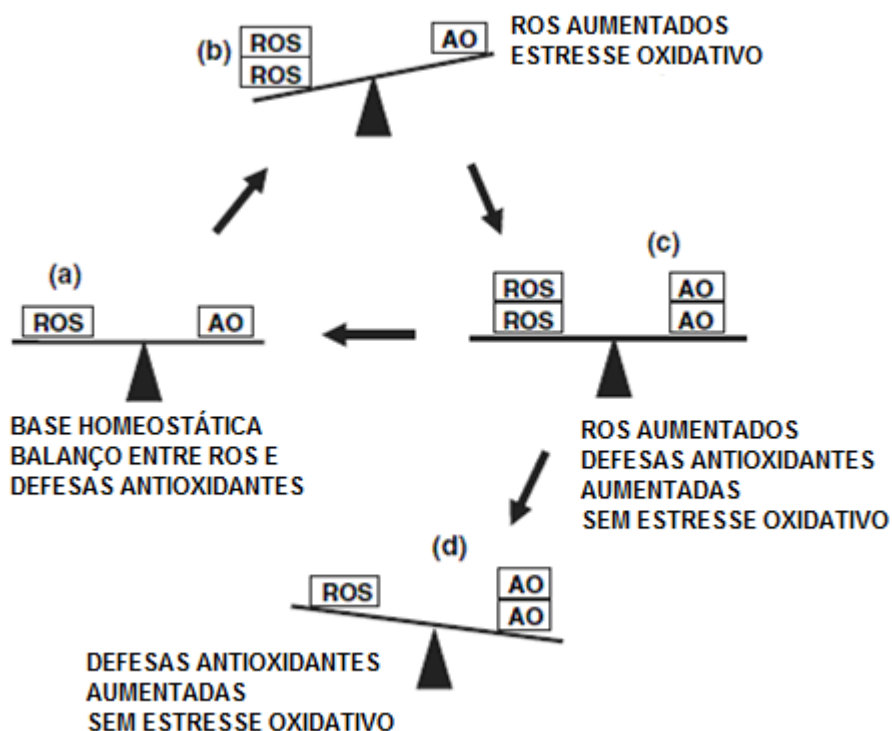


Figura 6 - Relações entre espécies reativas de oxigênio (ROS), defesa antioxidante (AO) (incluindo reparação) sistemas e estresse oxidativo.

(a) Na condição basal homeostática, os níveis de ROS e antioxidantes (AO) são baixos, com defesas suficientes para equilibrar a produção de ROS para que não haja estresse oxidativo. (b) Um aumento na produção ROS pode inicialmente exceder a capacidade do sistema antioxidante, levando a um período do estresse oxidativo. (c) Se o aumento de ROS é pequeno, pode ser compensado pelo aumento da utilização de antioxidantes, impedindo ainda mais o estresse oxidativo. Se a elevação de ROS é apenas temporário, haverá, então, um retorno à posição homeostática. (d) a exposição mais prolongada à elevação de ROS pode induzir o organismo permanentemente a aumentar seus níveis basais antioxidante, tornando-o mais apto a lidar com eventos futuros oxidativo. (Adaptado de MONAGHAN et al., 2009).

I- Espécies Reativas de Oxigênio

O radical ânion superóxido (O_2^-) é produzido em sistemas biológicos por meio de uma redução de oxigênio catalisada enzimaticamente pela NADPH oxidase. Essa reação ocorre geralmente nas membranas mitocondriais. É formado principalmente como um intermediário nas reações bioquímicas. Uma vez gerado o O_2^- pode agir como radical livre fraco, como elétron redutor ou como elétron oxidante. Possui uma longa meia-vida que permite a difusão dentro da célula e, conseqüentemente, o aumento do número dos alvos potenciais. Como espécie redox ativo, superóxido pode reduzir alguns materiais biológicos, por exemplo, citocromo c, e oxidar outros, tais como ascorbato (GOETZ e LUCH, 2008; POWERS e JACKSON, 2008).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um composto reativo que pode facilmente gerar radicais livres como a hidroxila (OH^\cdot) em circunstâncias específicas. Pode ser gerado a partir da ação de uma enzima antioxidante, a superóxido dismutase (SOD). O peróxido de hidrogênio é estável, permeável às membranas, e tem uma meia-vida relativamente longa no interior da célula. É citotóxico, mas é considerado um agente oxidante relativamente fraco (GOETZ e LUCH, 2008; POWERS e JACKSON, 2008).

Os radicais hidroxila (OH^\cdot) são altamente reativos com forte poder oxidante. Resulta da transferência de elétrons entre peróxido de hidrogênio e metais de transição. São as ROS mais prejudiciais, visto que interagem com biomoléculas imediatamente após sua geração. Pressupõe-se que o radical OH^\cdot contribua para várias doenças e fenômenos biológicos como câncer, envelhecimento, diabetes, fagocitose, isquemia e reperfusão (GOETZ e LUCH, 2008; POWERS e JACKSON, 2008).

O oxigênio *singlet* é outra forma reativa de oxigênio que pode ser gerado em alguns materiais biológicos. Tem meia vida muito curta, mas é capaz de difusão e é permeável às membranas. É produzido durante a contração esquelética muscular, durante o exercício (POWERS e JACKSON, 2008).

O óxido nítrico (NO^{\cdot}) é sintetizado a partir do aminoácido arginina por muitos tipos celulares. A síntese ocorre através da óxido nítrico sintase (NOS), a qual ocorre em três tipos principais: NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) e NOS induzível (iNOS). É um agente redutor fraco, reage com o oxigênio e com o superóxido, produzindo peroxinitrito (GOETZ e LUCH, 2008; POWERS e JACKSON, 2008).

O peroxinitrito (ONOO^{\cdot}) ou sua forma protonada (ONOOH) é formado a partir da reação do superóxido com o óxido nítrico. É um forte oxidante e pode levar ao esgotamento de grupos tiol, danos ao DNA e nitração de proteínas. É classificado como espécies reativas de nitrogênio, que inclui também o óxido nítrico (GOETZ e LUCH, 2008; POWERS e JACKSON, 2008).

O hipoclorito (HOCl) é formado pela ação da mieloperoxidase utilizando o peróxido de nitrogênio. É predominantemente formada por neutrófilos e pode, na sua forma ácida, (ácido hipocloroso), atravessar membranas celulares e pode causar fragmentação e agregação de proteínas (POWERS e JACKSON, 2008).

II- Danos das ROS ao organismo

As ROS podem causar danos a biomoléculas como a oxidação de proteínas e aminoácidos, podendo induzir mudanças conformacionais que levam ao aumento da hidrofobicidade e subsequente desnaturação, agregação e precipitação. Eventualmente, esse processo contribui para a inflamação tecidual e morte celular (GOETZ e LUCH, 2008).

Danos aos lipídeos causados pelas ROS possuem grande significância particularmente pelo fato de que a peroxidação lipídica nas membranas celulares podem causar lesões que podem culminar no início da morte celular. Esses danos podem ser diretos, por meio da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados presentes em lipídeos, ou indiretamente através da inibição síntese de lipídeos ou ativação de lípases (GOETZ e LUCH, 2008; MONAGHAN et al.,

2009). Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA - *Polyunsaturated fatty acids*) são muito menos resistentes à peroxidação lipídica do que os monoinsaturados ou saturados. Sendo assim, a proporção de PUFA na membrana pode influenciar a taxa de dano oxidativo à célula (MONAGHAN et al., 2009).

Modificações oxidativas podem também ocorrer ao DNA por ação das espécies reativas de oxigênio. Além do DNA nuclear, o mitocondrial é alvo desses danos, sendo ainda mais vulnerável, pois pertence a um sítio de geração das ROS (MONAGHAN et al., 2009). Em condições fisiológicas regulares, o balanço global da quantidade de dano oxidativo ao DNA foi estimada em 1 por 130.000 modificações de nucleotídeos no DNA. Os danos ao DNA são causados principalmente por radicais hidroxila. Ao longo dos últimos anos tornou-se claro que fatores exógenos como radiação, produtos químicos, dieta com alta ingestão calórica, altas taxas metabólicas e doenças inflamatórias afetam os níveis de danos oxidativos ao DNA. (GOETZ e LUCH, 2008).

III- Estresse oxidativo e aterosclerose

O estresse oxidativo está associado a várias doenças cardiovasculares, incluindo a aterosclerose, sendo a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade um fator importante para o desenvolvimento dessa patologia, como anteriormente citado (HEISTAD, 2006; KATO et al., 2009).

A oxidação das moléculas de LDL leva à exposição de moléculas de fosforilcolina oxidada gerando um tipo de mimetismo molecular capaz de ativar o sistema imune (Figura 7) e o conseqüente reconhecimento pelos receptores *scavenger* dos macrófagos, desencadeando os processos envolvidos na formação da aterosclerose (BINDER et al., 2002).

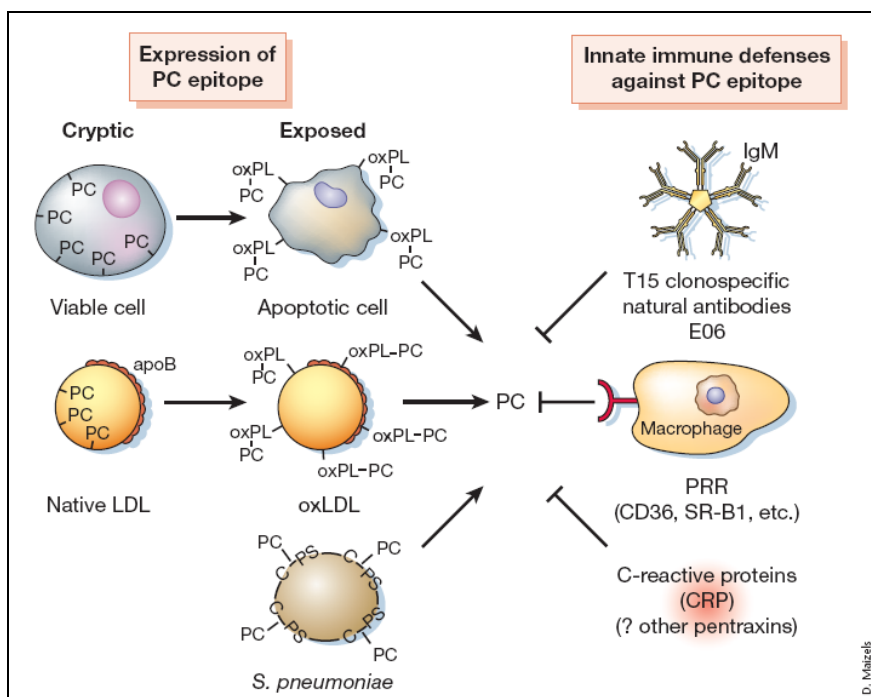


Figura 7- Mimetismo molecular entre epítomos da LDL oxidada, célula apoptótica e fosforilcolina (PC – *Phosphorylcholine*) de patógenos. Fosforilcolina quando oxidada fica exposta podendo ser reconhecida pelo sistema imune (BINDER et al., 2002).

O estresse oxidativo desempenha um papel importante na disfunção endotelial, que também está associada à aterosclerose. Ânions superóxidos inativam óxido nítrico, que é um potente vasodilatador, levando à disfunção endotelial favorecendo a entrada de LDL e desenvolvimento da placa aterosclerótica (HEISTAD et al., 2006; MALLIKA, 2007).

IV- Sistema antioxidante

O organismo contém antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que atuam como uma unidade complexa de regulação das ROS (POWERS e JACKSON, 2008; TRACHOOTHAM et al., 2008).

A superóxido dismutase (SOD) constitui a primeira linha de defesa contra os radicais superóxido (O_2^-), transformando-os em peróxido de

hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2). Existem três isoformas nos mamíferos que catalisam a reação de dismutação dos íons superóxidos sendo todas ligadas a um metal de transição no sítio ativo para realizar sua ação. A CuZnSOD está localizada no citoplasma, a MnSOD na mitocôndria e a SOD extra celular (ecSOD) localiza-se no espaço extra celular e também apresenta como cofator Cu e Zn. As três isoformas também são conhecidas como SOD1, SOD2 e SOD3, respectivamente (HEISTAD et al., 2006; AFONSO et al., 2007; POWERS e JACKSON, 2008).

A glutathiona peroxidase (GPx) catalisa a redução de peróxidos de hidrogênio ou hidroperóxidos orgânicos para água e álcool. A redução do H_2O_2 , ocorre pela conversão da glutathiona reduzida (GSH) a glutathiona oxidada (GSSH) que é catalisada pela GPx. A ação da GPx é particularmente importante na mitocôndria, uma vez que outra enzima capaz de reduzir o peróxido de hidrogênio, a catalase, encontra-se nos peroxissomos (POWERS e JACKSON, 2008; TRACHOOTHAM et al., 2008; LU, 2009).

A catalase atua em várias funções bioquímicas, mas seu principal objetivo é catalisar a reação de transformação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. É necessário que o ferro aja como cofator em seu sítio ativo (OTTAVIANO et al., 2008; POWERS e JACKSON, 2008).

Além dessas enzimas, existe numerosos antioxidantes não enzimáticos nas células, como a glutathiona, ácido úrico, bilirrubina, vitamina C e E (POWERS e JACKSON, 2008).

Os carotenóides são pigmentos amplamente distribuídos na natureza, que também desempenham importante papel na proteção às células dos organismos por serem compostos biológicos capazes de inativarem moléculas eletronicamente excitadas e radicais livres, devido às suas propriedades antioxidantes (DI MASCIO et al., 1991).

Alguns estudos epidemiológicos indicam que o aumento na ingestão de vitaminas antioxidantes, e o aumento dessas na corrente sanguínea podem

proteger contra doenças cardiovasculares, embora outros não demonstrem o mesmo efeito (CLARKE e ARMITAGE, 2002).

2.6- Modelo murino de aterosclerose

Um número substancial de estudos em aterosclerose tem sido realizado em diferentes modelos animais, particularmente, em camundongos geneticamente modificados. Isto se deve às vantagens oferecidas ao utilizar estes modelos. Dentre elas podemos citar a viabilidade de numerosos descendentes congênitos, novas informações genéticas, novas ferramentas biológicas e recursos, manutenção fácil, bem como o tamanho pequeno do camundongo (OHASHI et al., 2004).

Os camundongos selvagens são altamente resistentes ao desenvolvimento de aterosclerose (BRESLOW, 1996; JAWIEN et al., 2004, CASÓS et al., 2008), tendo como principal fator as elevadas concentrações sanguíneas das lipoproteínas HDL, uma vez que são responsáveis pelo transporte de mais de 85% do colesterol plasmático em camundongos, o que difere dos seres humanos nos quais as principais carreadoras de colesterol são as LDL, com 65-85% (BRESLOW, 1996, HOFKER et al., 1998; NEUZIL et al., 1998; FAZIO e LINTON, 2001). Outras características que diferem os camundongos dos humanos são: ausência da proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP) no plasma de camundongos (em humanos, essa proteína transfere ésteres de colesterol da HDL para VLDL e transfere triglicerídeos na direção oposta); lipase lipoprotéica solúvel em camundongos e ligada a membrana em humanos; reduzida síntese de apo B-100 em camundongos; alta eficiência da apo E murina no que diz respeito à remoção de lipoproteínas remanescente, quando comparada à apo E humana (FAZIO e LINTON, 2001). Apesar dessas diferenças, camundongos e humanos possuem, com poucas exceções, o mesmo conjunto de genes que controlam o metabolismo de lipoproteínas (HOFKER et al., 1998).

A deficiência da apo E ou do receptor de LDL em camundongos modificados geneticamente (deleção dos respectivos genes – *knockout*) leva ao desenvolvimento de placas ateroscleróticas nesses animais (MEIR e LEITERSDORF, 2004). Essas lesões têm sido extensivamente caracterizadas e apresentam semelhanças com as encontradas em humanos (PALINSK et al., 1994).

O camundongo deficiente no receptor de LDL ($LDLr^{-/}$) possui elevadas concentrações plasmáticas das lipoproteínas aterogênicas LDL e IDL, uma vez que possui o *clearance* de LDL, IDL e VLDL reduzido (BRESLOW, 1996). O perfil de lipídeos do plasma desses camundongos é mais similar ao de humanos com hiperlipidemia do que o modelo apo E^{-/-} (OHASHI et al., 2004).

Em resposta a uma dieta normolipídica, os camundongos $LDLr^{-/}$ desenvolvem hipercolesterolemia moderada e não desenvolvem lesões ateroscleróticas avançadas (ISHIBASHI et al., 1994). A ingestão de dieta aterogênica, no entanto, leva-os ao desenvolvimento de hipercolesterolemia grave e lesões ateroscleróticas avançadas (FAZIO e LINTON, 2001). Essa condição, provavelmente, está relacionada ao fato de que, diferentemente dos humanos, os camundongos sintetizam duas versões da apoproteína B, a apo B-100 e a apo B-48, sendo ambas incorporadas em VLDL. As VLDL contendo apo B-48 geram remanescentes que por aceitarem apo E tornam-se capazes de se ligar a receptores de quilomicrons e serem rapidamente retiradas da circulação. Portanto, uma dieta comum para esse modelo murino não é capaz de elevar os níveis séricos de colesterol a concentrações semelhantes à hipercolesterolemia familiar homozigótica. As demais partículas de VLDL que apresentam apo B-100 (característica comum em humanos e camundongos) formam remanescentes IDL, também contendo a apo B-100, que são retiradas do plasma pelos receptores de LDL que reconhecem essa apoproteína. Vale ressaltar que a apo B-48, em humanos, são secretadas apenas no intestino compondo os QM (ISHIBASHI et al., 1994).

3- Justificativa

Nosso estudo anterior sobre o efeito da suplementação dietética com polpa e amêndoa de pequi no perfil lipídico de camundongos demonstrou elevação significativa dos níveis séricos do colesterol (AGUILAR, 2006). Assim, devido à composição em ácidos graxos saturados do óleo de pequi e seu elevado teor em substâncias antioxidantes, sua incorporação à dieta poderia apresentar implicações importantes no desenvolvimento da aterosclerose e estresse oxidativo.

4- Objetivos

4.1- Objetivo geral

Avaliar os efeitos do óleo de pequi no metabolismo lipídico, desenvolvimento da aterosclerose e estresse oxidativo em camundongos deficientes para o receptor de LDL.

4.2- Objetivos específicos

- Acompanhar o consumo alimentar e a evolução ponderal dos animais;
- Avaliar o metabolismo lipídico pela mensuração dos lipídeos totais e Colesterol total hepático e cecal;
- Analisar o efeito da ingestão do óleo de pequi em fatores de risco para aterosclerose como Colesterol total, HDL-colesterol e Triglicerídeos, e Glicemia de jejum;
- Avaliar o desenvolvimento da aterosclerose na aorta e válvula aórtica;
- Determinar a deposição de colágeno na válvula aórtica;
- Avaliar o efeito antioxidante do óleo de pequi por meio da medida do estresse oxidativo no fígado, níveis circulantes de anticorpos anti-LDL oxidada e produção de espécies reativas de oxigênio por macrófagos peritoneais.
- Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase.

5-Materiais e Métodos

5.1-Animais e grupos experimentais

Foram utilizados camundongos deficientes para o receptor de LDL (rLDL-/-) fêmeas, com 6-8 semanas de idade, divididos em dois grupos: grupo controle e grupo pequi. O experimento foi desenvolvido durante seis semanas, sendo a dieta e água disponibilizadas *ad libitum*.

Os animais foram obtidos do Biotério Ênio Cardillo Vieira do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), onde também foram mantidos em ambiente climatizado sob temperatura de 22 a 24°C e com ciclo de 12 horas claro e escuro.

Os animais foram separados homogeneamente de acordo com peso e colesterol total. Para isso, previamente ao início do experimento, foram coletadas amostras de sangue dos animais (da cauda) para dosagem do colesterol total (CT) no tempo zero, após três dias para adaptação à dieta. Ao término do período experimental, os animais foram anestesiados intraperitonealmente (xilazina-quetamina, 12mg/kg e 75mg/kg de peso corporal, respectivamente) e o sangue foi coletado, pelo plexo inguinal, após jejum noturno. As amostras sanguíneas foram centrifugadas a 6.000rpm durante 5 minutos. O soro foi, então, armazenado a -80° C para análises posteriores.

Durante o sacrifício foram coletados fígado, coração e aorta, após perfusão com salina tamponada com fosfato (PBS), e os mesmos foram armazenados a -80°C. O Ceco foi removido e o conteúdo cecal armazenado.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFMG (CETEA/UFMG): n° do protocolo 225/2008 (Anexo).

5.2- Preparo das dietas

O óleo da polpa de pequi utilizado no experimento foi adquirido no mercado Central de Belo Horizonte advindo da região de Montes Claros – MG. O óleo foi armazenado sob refrigeração até o preparo da dieta para evitar a oxidação.

Foi utilizada dieta padrão para camundongos AIN-93G acrescida de 1,25% de colesterol, visto que, o modelo animal utilizado (LDLr^{-/-}) requer uma dieta aterogênica para desenvolver placas ateroscleróticas. Para a dieta experimental, o óleo de soja foi substituído pelo óleo de pequi (Tabela 2).

Tabela 2- Composição das dietas controle e experimental ofertadas aos animais, baseadas na dieta padrão (AIN-93G), acrescida de 1,25% de colesterol

INGREDIENTES	DIETA CONTROLE (gramas)	DIETA EXPERIMENTAL (gramas)
Amido de milho ¹	529,5	529,5
Caseína ²	200,0	200,0
Sacarose	100,0	100,0
Óleo de soja ³	70,0	-
Óleo de pequi	-	70,0
Celulose	50,0	50,0
Mix de minerais ⁴	35,0	35,0
Colesterol ⁵	12,5	12,5
BHT	0,014	0,014
Mix de vitaminas ⁴	10,0	10,0
Bitartarato de colina	2,5	2,5
Metionina	3,0	3,0

¹ Milhena, Emifor Indústria de Alimentos S.A.

² Proquimios

³ Liza, Cardill Agrícola S.A.

⁴ Rhoster, Indústria e Comércio LTDA

⁵ Sigma Chemical

5.3- Verificação do consumo da dieta

Para a quantificação do consumo alimentar, as dietas ofertadas foram pesadas semanalmente. O restante de dieta ofertada foi quantificado pela soma da sobra e o resto no fundo da gaiola (obtido por peneiração da maravalha). A diferença entre dieta ofertada e o restante não consumido forneceu o consumo semanal de dieta.

5.4- Avaliação da evolução ponderal e ganho de peso corporal

Os camundongos foram pesados semanalmente para acompanhamento da evolução ponderal. O ganho de peso corporal total foi obtido pela diferença entre peso final e peso inicial.

5.5- Avaliação do metabolismo lipídico

O metabolismo lipídico dos animais submetidos à dieta controle e experimental foi avaliado por meio da obtenção dos níveis bioquímicos séricos do Colesterol total (CT), HDL-colesterol (HDL-c), fração aterogênica, índice aterogênico e Triglicerídeos e dos lipídeos totais e CT hepático e cecal.

5.5.1- Exames bioquímicos séricos

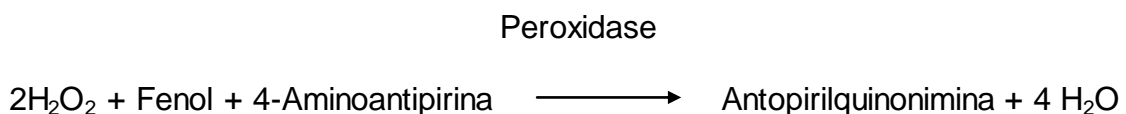
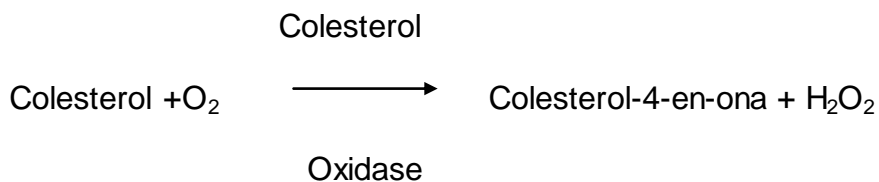
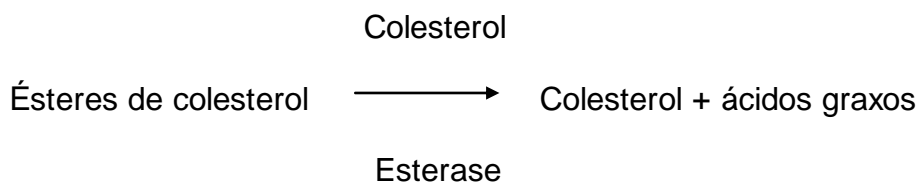
No soro foram realizadas dosagens dos níveis de colesterol total (CT), HDL-colesterol (HDL-c) e triglicerídeos (TG). A fração aterogênica (FA) foi obtida pela diferença entre CT e HDL-c, e o índice aterogênico foi obtido pela razão entre FA e HDL-c.

Os métodos para determinação utilizados são descritos a seguir:

I- Colesterol Total

O CT foi obtido pelo método da colesterol oxidase (ALLAIN et al.,1974), utilizando-se kit comercial (Labtest, Brasil).

O colesterol total é determinado de acordo com as seguintes reações:



O método consiste na hidrólise de ésteres de colesterol pela colesterol esterase produzindo colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre, em presença da colesterol oxidase e de oxigênio, é oxidado a colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio que pela ação da peroxidase em presença de fenol e 4-aminoantipirina produz um composto róseo-avermelhado (Antopirilquinonimina) com absorção máxima em 500nm. A intensidade da cor formada é diretamente proporcional à concentração de colesterol na amostra.

As concentrações de colesterol no soro ou plasma dos animais foram determinados por um ensaio em microplaca de 96 poços (FAZIO et al., 1997). Resumidamente, 5µl das amostras de soro foram diluídas em água deionizada na proporção 1:200, para adequar as leituras de absorbância à variação linear do teste. 100µl de reagente de colesterol total foram adicionados aos 100µl de soro diluído. Após um período de incubação de 15 minutos a 37°C, a absorbância foi lida a 492nm em um leitor de microplaca. As dosagens foram feitas em duplicata.

II- HDL-colesterol

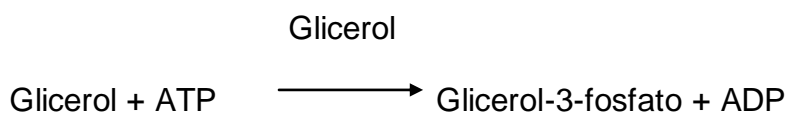
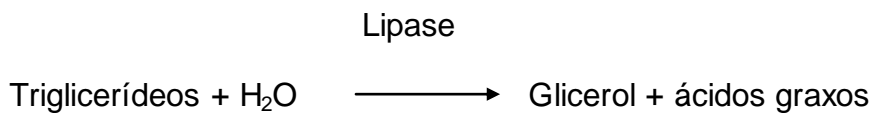
As concentrações de HDL-colesterol no soro foram obtidas por meio do kit enzimático Labtest, Brasil, cujo princípio se baseia na precipitação seletiva e quantitativa das lipoproteínas LDL e VLDL pelo ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio. Após centrifugação (12.000rpm por 5 minutos), o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (HDL) é determinado no sobrenadante.

O sobrenadante foi plaqueado (10µL) em duplicata em uma microplaca de 96 poços, em seguida, adicionados a 200µL do reagente de cor (Colesterol Liquiform - Labtest - Brasil). Após incubação de 15 minutos a 37° C, a absorbância foi lida a 492nm.

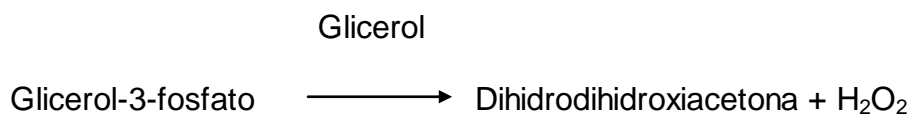
Para a determinação do padrão foi plaqueado 10 μ L do reagente padrão. Para o cálculo das concentrações do HDL-colesterol foi feita a determinação do Fator de Calibração através da seguinte equação: Fator de calibração = 40/média da Absorbância do Padrão. Então, segue-se o cálculo: HDL= Absorbância da amostra x Fator de calibração.

III- Triglicerídeos

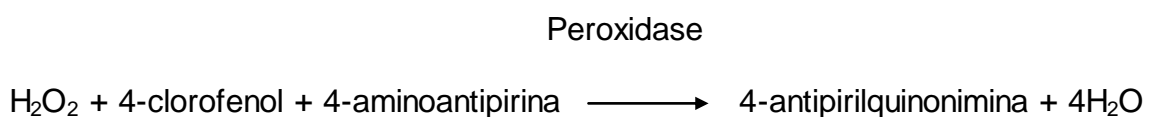
A determinação dos triglicerídeos foi feita utilizando-se kit comercial (Doles, Brasil), de acordo com o método enzimático colorimétrico segundo Fossati e Prencipe (1982). A quantificação ocorre de acordo com as seguintes reações:



Quinase



Fosfato



O método consiste na hidrólise de triacilgliceróis do soro pela lipase lipoprotéica produzindo glicerol livre, que é fosforilado pela glicerol quinase, cujo produto sofre a ação da glicerol fosfato a qual, em presença de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio. Este, sob ação da peroxidase em presença de um reagente fenólico (4-clorofenol) e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo avermelhado, com máximo de absorção a 510nm.

As dosagens e a curva padrão foram feitas em microplacas de 96 poços. A diluição utilizada foi de 5 μ L de soro em 495 μ L (diluição 1:100) de água deionizada. 100 μ l de reagente de cor foram adicionados aos 100 μ l de soro diluído. Após um período de incubação de 15 minutos a 37°C, a leitura foi realizada a 492nm.

5.5.2- Verificação do perfil lipídico hepático e cecal

Os fígados foram retirados e congelados a -80°C para posterior quantificação dos níveis de lipídeos. O ceco também foi retirado e o conteúdo cecal armazenado a -80°C para posterior avaliação lipídica.

Os lipídeos totais hepáticos foram extraídos com o uso de solventes orgânicos de acordo com o método de Folch et al. (1957). 100mg de fígado foram triturados, durante um minuto, com 1900 μ L de solução de clorofórmio:metanol (2:1), usando-se homogeneizador de tecidos. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 3.000rpm, após adição de 400 μ L de metanol. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de ensaio com peso conhecido e posteriormente acrescido 800 μ L de clorofórmio e 640 μ L de solução de NaCl a 0,73%. Após nova centrifugação por 10 minutos a 3.000rpm, foi desprezada a fase superior. A parede interior de cada tubo foi lavada três vezes com 600 μ L de solução de Folch (solução de 3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água e 2% de NaCl a 0,29%). Após cada lavagem, a fase

superior foi descartada. Os extratos lipídicos obtidos foram secos em estufa *overnight* a 37°C, e os lipídeos quantificados gravimetricamente.

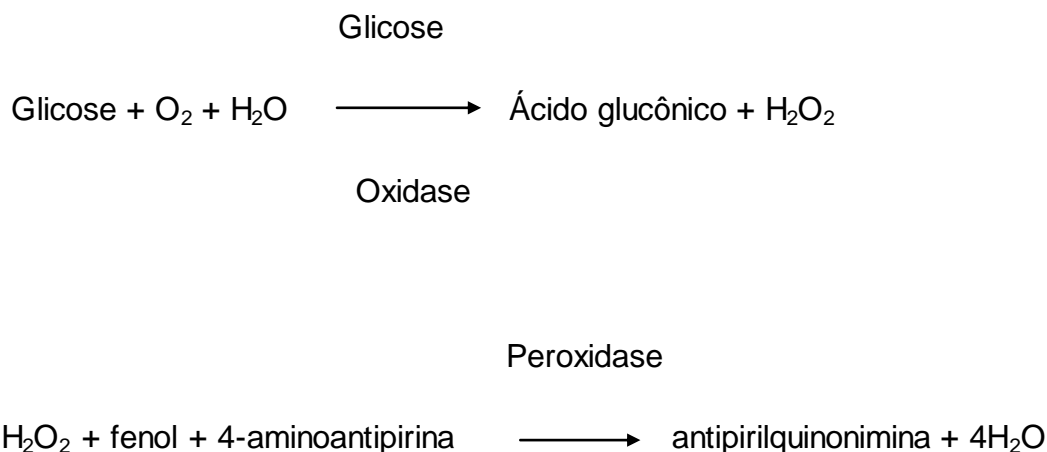
Para obtenção dos lipídeos totais do conteúdo cecal foram utilizados 25mg de conteúdo. Seguiram-se, então, os procedimentos como feitos para o tecido hepático.

Os extratos lipídicos foram ressuspensos em 500µL de isopropanol para a determinação dos níveis de colesterol total. Para as dosagens do CT no extrato lipídico, seguiu-se o método enzimático já anteriormente descrito.

5.6- Avaliação da glicemia

Para avaliação da glicemia dos animais, foram dosados os níveis de glicose plasmática ao término do experimento.

Os níveis de glicose no plasma foram dosados por meio do kit enzimático Labtest (Brasil), cujo princípio se baseia na oxidação da glicose a ácido glucônico, pela ação da glicose oxidase, com liberação de peróxido de hidrogênio. Esse, pela ação da peroxidase em presença de fenol e 4-aminoantipirina, produz uma antipirilquinonimina de coloração róseo-avermelhado com absorvância entre 490 e 520nm, segundo reações abaixo:



O sangue coletado com fluoreto contendo antiglicolítico foi centrifugado a 6.000rpm por cinco minutos para obtenção do plasma. Foram transferidos para uma microplaca de 96 poços 2 μ L de plasma e adicionados 200 μ L do reagente de cor, em duplicata. Após incubação de 15 minutos a 37 $^{\circ}$ C, a absorbância foi lida a 492nm em leitor de microplaca (Thermo Plate).

Para a determinação do padrão foi plaqueado 2 μ L do reagente padrão. Para o cálculo das concentrações de glicose, em mg/dL, foi utilizada a fórmula, indicada pelo Kit Labtest (Brasil): Média da absorbância da amostra / média da absorbância do padrão x 100.

5.7- Avaliação da aterosclerose

Para avaliar o desenvolvimento da aterosclerose foi observada a área de lesão na aorta e na válvula aórtica. Bem como a caracterização das lesões neste quanto à deposição de colágeno.

5.7.1-Área de lesão na aorta

Para avaliação da deposição lipídica, cada aorta foi cuidadosamente retirada, dissecada removendo toda a adventícia a partir da válvula aórtica até a bifurcação ilíaca e, em seguida, lavada em PBS e armazenada a -80 $^{\circ}$ para quantificação da placa através da coloração em Sudan IV.

Para a coloração, as aortas foram abertas longitudinalmente e fixadas *overnight* com solução de formol-sacarose (4% paraformoldeído, 5% de sacarose, 20 μ mol/L de BHT, e 2 μ mol/l EDTA, pH 7,4) a 4 $^{\circ}$ C. Depois de fixadas, as aortas foram submetidas a uma solução de 70% de etanol durante cinco

minutos para desidratação e, posteriormente, coradas por 10 minutos sob agitação em uma solução filtrada contendo 0,5% de Sudan IV, 35% de etanol, e 50% de acetona. Em seguida, as aortas foram descoradas por cinco minutos em solução de etanol 80%, de maneira que apenas as placas de gordura permanecem coradas, devido à afinidade do Sudan IV por lipídeos (PALINSKI et al., 1994).

As imagens das aortas coradas com Sudan IV foram capturadas por scanner e digitalizadas em computador. O programa analisador de imagens Image-Pro Plus versão 6.3 (Image-Pro Plus Software, Bethesda Maryland - USA) foi utilizado para obtenção das medidas.

O cálculo das lesões nas aortas foi realizado considerando a porcentagem da lesão em relação à área total da aorta.

5.7.2-Lesões ateroscleróticas na válvula aórtica

Os corações foram retirados e cortados na linha mediana, sendo utilizada a parte proximal, onde se localiza a válvula aórtica. Esta foi primeiramente fixada em solução de formol 10% por cinco horas e, em seguida, transferida para uma solução de sacarose a 30% em salina fisiológica por 24 horas, para desidratação do tecido. O tecido foi, então, incluído em Tissue Freezing Médium (Jung *Tissue Freezing Medium*; Leica Microsystems, Wetzlar - Germany) e cortados em criostato (secções de 10µm). Os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE). Esse material foi, então, codificado, examinado e submetido à análise morfométrica das lesões. Para isso, foram selecionados 10 cortes, amostrando uma extensão média de 250-300µm, com as estruturas anatômicas referenciais da válvula aórtica, que foram fotografados (aumento de 100x) e a medida das áreas de lesão feita com o auxílio do software analisador de imagens Image-Pro Plus. O cálculo da lesão média/animal foi feito somando-se todas as medidas dos 10 cortes, representando o valor da área da lesão.

5.7.3- Avaliação da deposição de colágeno na válvula aórtica

Para avaliação da deposição de colágeno, os cortes da válvula aórtica foram corados com Tricrômio de Gomori. Os cortes foram fotografados e a medida das áreas de colágeno feita pela quantificação da coloração em tom esverdeado com o auxílio do software analisador de imagens Image-Pro Plus. A quantidade é dada pela porcentagem de colágeno por área de lesão.

5.8- Avaliação do estresse oxidativo

Para avaliação do estresse oxidativo, foi analisada a peroxidação lipídica no fígado, investigada a presença de anticorpos anti-LDL oxidada, visto que o estresse oxidativo aumenta a oxidação das LDL plasmáticas, e verificada a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por macrófagos peritoneais.

5.8.1- Peroxidação lipídica

Para avaliar a peroxidação lipídica, procedeu-se a determinação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico no tecido hepático dos animais.

A determinação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico foi obtida pela técnica de TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances), de acordo com Wallin et al. (1993), cujo procedimento será descrito abaixo. Para isso, uma parte dos fígados foi lavada em PBS, envolvida em papel alumínio e borrifado nitrogênio gasoso para evitar oxidação do tecido. Em seguida foram armazenados a -80°C.

A formação de malondialdeído (MDA), resultante da quebra de ácidos graxos poli-insaturados, é um conveniente índice para se determinar o grau de

peroxidação lipídica. O ácido tiobarbitúrico reage com o MDA, formando um aduto na proporção de 2:1, sendo este detectado espectrofotometricamente a 535nm (Figura 8).

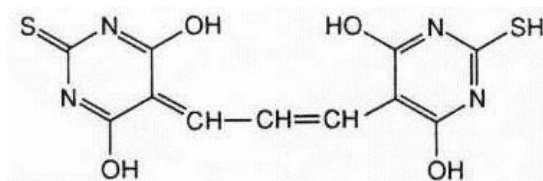


Figura 8- Fórmula molecular do aduto formado na reação entre o ácido tiobarbitúrico e o malondialdeído na técnica de TBARS. Sua coloração róseo-alaranjada é detectável espectrofotometricamente a 535nm.
Fonte: BUEGE e AUST, 1987.

A determinação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada segundo o método descrito por Buege e Aust (1978). Para tal, o homogenato do fígado foi obtido triturando-se 100mg de tecido em 1mL de PBS (pH = 7,4). Uma alíquota de 500 μ L do homogenato foi misturada a 1mL da solução de ácido tricloroacético 15% (p/v), ácido tiobarbitúrico 0.38% (p/v) e HCl a 0.25N. A mistura foi aquecida em banho-maria fervente por um período de 15 minutos. Após resfriamento em água corrente, adicionou-se 1,5mL de butanol, para extração do cromóforo, e a mistura foi centrifugada a 3.000rpm por 10minutos. A absorbância do sobrenadante foi lida a 535nm e o resultado foi normalizado por dosagem de proteínas pela técnica de Lowry et al. (1951), segundo o qual a concentração de proteínas nas amostras é calculada através de uma curva padrão, feita com albumina.

5.8.2- Investigação da presença de anticorpos anti-LDL oxidada

Para determinação de anticorpos anti-LDL oxidada no soro foi realizada a medida por ELISA. Para isso, foi necessária, primeiramente, a obtenção de LDL nativa e LDL oxidada, sendo, então, realizados os passos a seguir:

I- Separação da LDL

Após a coleta de 10mL do sangue de indivíduo saudável (voluntário) não fumante, em tubo *vacutainer* com EDTA 10%, procedeu-se a centrifugação a 3.000rpm por dez minutos, em centrífuga de mesa (Fanem Excelsa Baby, mod. 205N). O plasma foi coletado e adicionado os conservantes: aprotinina, benzamidina 2mM, solução de azida sódica 5% com EDTA 5% e clorafenicol 0,1% e, por fim, o PMSF 0,5mM em DMSO. O plasma teve sua densidade elevada para 1,21 (densidade da lipoproteína HDL) com solução de Brometo de potássio (KBr). Três mililitros deste plasma foram colocados em tubos de polipropileno, com volume total de 10mL, próprios para ultracentrífuga Sorvall Ultra pro-80/Du Pont, utilizando o rotor 875T. Após o plasma, foi adicionada a solução de KBr de densidade 1,006 até completar o volume total do tubo, formando assim o gradiente descontínuo de densidade de duas camadas. Os tubos devidamente equilibrados foram colocados para centrifugação por duas horas e meia a 50.000rpm e 4^oC, para separação das lipoproteínas de alta densidade. Terminada a rodada, foi retirada a camada composta pela LDL e a amostra foi submetida à diálise em solução de tampão fosfato (PBS), por um período de vinte e quatro horas a 4^oC, com três trocas do tampão. Em seguida, o material foi filtrado e guardado estéril em atmosfera de nitrogênio a 4^oC, em recipiente protegido da luz (CHUNG et al., 1986).

II- Oxidação da LDL

Para a oxidação da LDL foi acrescido CuCl₂ a 1mM, para concentração final de 5µM. Após 3 horas e 30 minutos de oxidação, a 37^oC, sob agitação constante e envolto em papel alumínio. A reação foi finalizada com EDTA 0,5M (proporção de 2 EDTA: 1 CuCl₂).

III- Quantificação das Imunoglobulinas Anti - LDL Oxidada

As Imunoglobulinas foram dosadas pelo ensaio ELISA (LEE et al., 1999), descritos resumidamente:

Microplacas de poliestireno (Nunc, Maxisorp, Denmark) foram incubadas 24 horas, em temperatura ambiente, com 100 μ L/ poço de solução do antígeno (LDL oxidada e nativa, com concentração 50 μ g/mL de proteína) diluído em salina fisiológica. Após o período de sensibilização, as placas foram incubadas por uma hora, com 200 μ L de uma solução BSA 1,0% em PBS, por poço, para bloqueio, à 37°. A solução de bloqueio foi desprezada e as placas foram lavadas 5 vezes com salina fisiológica contendo 0,05% de Tween 20 (SIGMA Chemical Co., St Louis, MO, USA). Em seguida, 100 μ L/poço das amostras de soro (diluído 1:10) foram incubadas a temperatura ambiente, *overnight*. As placas foram lavadas cinco vezes com salina-Tween 0,05% e incubadas, por duas hora a 37°C, com 100 μ L de uma solução de IgG peroxidase, na diluição 1:5000. As placas, após serem lavadas cinco vezes com salina-Tween, foram incubadas no escuro, com 100 μ L de uma solução de tampão citrato (10mL, pH=5,0) contendo 40 μ l de H₂O₂ e 10mg de ortofenileno-diamino (OPD) para o desenvolvimento de cor, por reação enzimaticamente catalisada. Após trinta minutos de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 30 μ L/poço de H₂SO₄ 1:20. A absorbância foi lida no comprimento de onda de 492nm por leitor automático (Model 450 microplate Reader, Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Os resultados foram obtidos pelo cálculo da média das repetições da LDL oxidada subtraída pela LDL nativa em cada grupo experimental, sendo o resultado dado em unidades arbitrárias.

5.8.2- Verificação da produção de espécies reativas de oxigênio por macrófagos peritoneais

Para verificar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por macrófagos peritoneais, foi realizado um estudo *ex vivo*, como avaliação indireta de estresse oxidativo.

Camundongos LDLr^{-/-} foram submetidos à dieta controle e experimental por duas semanas. Após esse período, os animais foram sacrificados e os macrófagos peritoneais residentes (ou seja, não ativados) foram retirados com PBS gelado e estéril. Após centrifugação, o PBS sobrenadante foi descartado e os macrófagos ressuspensos em meio de cultura (RPMI incolor estéril). Para medir a produção de ROS, os macrófagos foram plaqueados em triplicata numa concentração de 1×10^6 células por poço, e submetidos a estímulo com zymosan (partículas derivas da parede celular de fungo, ricas em β -glucana, que são reconhecidas e fagocitadas por macrófagos ativando a produção de ROS). Como reagente foi utilizado luminol e a luminescência foi lida por uma hora em intervalos de 60 segundos. A produção basal de ROS também foi acompanhada plaqueando os macrófagos sem uso de estímulo. A área sob a curva da produção de ROS foi calculada para comparação estatística entre os grupos submetidos ou não ao estimulador da produção de ROS zymozan.

5.9-Avaliação da atividade de enzimas antioxidantes

Para avaliar se o efeito antioxidante da dieta contendo óleo de pequi teve alguma relação com a atividade de enzimas antioxidante, foi quantificada a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase nos fígados dos animais.

5.9.1- Determinação da atividade de superóxido dismutase

A dosagem da atividade da superóxido dismutase (SOD) é baseada na sua habilidade em limpar radicais superóxidos (O_2^-), diminuindo a razão de auto-oxidação do pirogallol (adaptado de DIETERICH et al., 2000).

A técnica consiste em homogeneizar o tecido em tampão fosfato (50mM). 30 μ L de homogenato foi plaqueado em placa de 96 poços e acrescido de 99 μ L de tampão fosfato, 6 μ L de MTT (brometo de dimetiltiazol-difeniltetrazolium) e 15 μ L de pirogallol. Para o branco, o pirogallol foi substituído por tampão fosfato e para o padrão, a amostra foi substituída por tampão fosfato. Após cinco minutos de incubação a 37°C, a reação foi parada com 150 μ L de DMSO (dimetil sulfóxido) e a absorbância foi lida a 570nm. Para o cálculo do resultado foi considerado que 1 unidade (U) de SOD é capaz de evitar a autoxidação de 50% de pirogallol do padrão. O resultado foi expresso em Unidades por mg de proteína (U/mg proteínas).

5.9.2- Determinação da atividade de catalase

A dosagem da atividade de catalase se baseia no decaimento da absorbância do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) – (A_{240}) pela metabolização deste pela catalase ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$), de acordo com Nelson e Kiesow (1972).

Resumidamente, 25 μ L de homogenato de tecido em tampão fosfato (50mM) diluído (1:25) foram acrescentados a 1mL de tampão fosfato 50mM em uma cubeta de quartzo. Foram acrescentados 25L de solução de H_2O_2 0,3M e lida a absorbância (A_{240}) durante um minuto. Os cálculos foram feitos pela diferença de leitura no tempo final pelo tempo inicial, dividido pelo volume (mL) da amostra. O resultado é expresso por concentração de proteína (mg/mL), dosada pelo método de Lowry et al. (1951).

5.10- Métodos estatísticos de tratamento dos dados

Para detecção de *outliers* foi realizado o teste de *Grubbs*. Os dados foram analisados quanto à distribuição pelo teste de *D'Agostino and Pearson*, sendo, posteriormente, os paramétricos submetidos ao teste T de *student*, considerado como significativo $p < 0,05$, e os não paramétricos ao teste de *Mann Whitney*.

As análises foram realizadas utilizando-se o software *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, San Diego California - USA). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão, para os dados com distribuição normal, e como mediana, quando não paramétricos.

6- Resultados

6.1- Consumo alimentar e peso corporal

Para avaliar a aceitação das respectivas dietas foi observado o consumo semanal em cada grupo. Não foi encontrada diferença no consumo entre os grupos controle e experimental (Tabela 3).

Tabela 3- Consumo alimentar, peso inicial, peso final e ganho de peso dos camundongos LDLr-/- submetidos a dieta controle (óleo de soja) ou enriquecida com óleo de pequi durante seis semanas

	Controle	O. Pequi
Ingestão diária/animal (g)	3,5 ± 0,06	3,5 ± 0,1
Peso inicial (g)	15,22 ± 0,5	15,93 ± 0,5
Peso final (g)	19,14 ± 0,3	20,0 ± 0,4
Ganho de peso (g)	3,9 ± 0,3	4,3 ± 0,4

Os valores são apresentados como Média ± Erro padrão (n=12).

Para acompanhamento da evolução ponderal, os animais foram pesados semanalmente e, ao término do experimento, o ganho de peso total foi obtido pela diferença entre peso final e inicial. Não houve diferença no peso corporal dos camundongos durante o período experimental. O ganho de peso total também foi semelhante entre os grupos controle e óleo de pequi (Tabela 3).

6.2- Metabolismo lipídico e glicemia

Para avaliação do metabolismo lipídico, foi analisado o perfil lipídico sérico, hepático e cecal nos animais ao final do experimento. A avaliação da glicemia foi obtida por meio da dosagem dos níveis de glicose no plasma sanguíneo.

6.2.1- Perfil lipídico e glicêmico sanguíneo

O acréscimo de 1,25% de colesterol às dietas para torná-las aterogênicas promoveu hipercolesterolemia em ambos os grupos. A dieta enriquecida com óleo de pequi resultou em um significativo aumento nos níveis séricos dos fatores de risco para aterosclerose como o colesterol total, fração aterogênica, índice aterogênico e triglicerídeos, em comparação à dieta controle. Em contraste, o HDL-c não diferiu entre os grupos (Tabela 4).

Tabela 4- Perfil lipídico e glicêmico sanguíneo dos camundongos LDLr-/- após seis semanas sob dieta controle (óleo de soja) ou enriquecida com óleo de pequi

	Controle	O. Pequi
Colesterol total (mg/dL)	377 ± 28,2	939 ± 65,6*
HDL-colesterol (mg/dL)	35 ± 3,3	29 ± 2,3
Fração aterogênica^a (mg/dL)	343 ± 29,2	873 ± 48,2*
Índice aterogênico^b	10,8 ± 1,4	33,3 ± 4,2*
Triglicerídeos (mg/dL)	114 ± 17,6	178 ± 18,5*
Glicose (mg/dL)	123 ± 9,9	143 ± 11,7

Valores apresentados como média ± Erro padrão (n=12). *p<0,05.

^a CT – HDL-c. ^bFração aterogênica/HDL-c.

A concentração de glicose plasmática foi estatisticamente semelhante, demonstrando que as diferentes dietas não apresentaram efeito distinto para esse parâmetro (Tabela 4).

6.2.2- Perfil lipídico hepático e cecal

Os animais alimentados com dieta contendo óleo de pequi tiveram maior acúmulo de lipídio no fígado, uma vez que a quantidade de lipídeos totais hepáticos extraída foi significativamente superior no grupo experimental em

comparação ao controle (Tabela 4). Os lipídeos totais extraídos do conteúdo cecal, no entanto, foram estatisticamente semelhantes entre os grupos.

A dosagem de colesterol total nos lipídeos extraídos do fígado e conteúdo cecal demonstrou efeito da dieta enriquecida com óleo de pequi, já que maior concentração do CT foi encontrada para os animais experimentais (Tabela 5).

Tabela 5 – Perfil lipídico do fígado e conteúdo cecal dos camundongos LDLr-/- após seis semanas sob dieta controle (óleo de soja) ou enriquecida com óleo de pequi

	Controle	O. Pequi
Lipídeos totais hepático (mg/g)	123 ± 11	191 ± 17*
Lipídeos totais cecal (mg/g)	290 ± 48	210 ± 20
Colesterol total hepático (mg/g)	13 ± 2,3	25 ± 2,8*
Colesterol total cecal (mg/g)	9 ± 1,2	17 ± 2,6*

Os valores são apresentados como média ± Erro padrão para por apresentarem distribuição normal, exceto para colesterol total cecal que são apresentados como mediana, por não serem paramétricos (n=12). *p<0,05.

6.3- Avaliação da aterosclerose

O desenvolvimento da aterosclerose foi avaliado por meio da quantificação da área de lesão na válvula aórtica e na aorta. A escolha em avaliar estes dois sítios foi devido ao fato de que as lesões na aorta desenvolvem-se mais tardiamente em relação ao sinus, apresentando-se, portanto, em estágios mais iniciais.

A aterosclerose na raiz da aorta (na região da válvula aórtica) por ocorrer mais precocemente mostra-se em estágio mais avançado do que o

visto na aorta. Nessa região, as lesões no grupo pequi, acompanhando o risco aterogênico, apresentaram-se significativamente maiores em relação ao controle (Figura 9). Os animais do grupo controle apresentaram lesões intermediárias formadas por estrias gordurosas com várias camadas de células espumosas, já sendo possível perceber a formação da capa fibrosa. No grupo pequi, entretanto, nota-se lesões em estágio mais avançado com presença da capa fibrosa e deposição de cristais de colesterol em áreas de necrose.

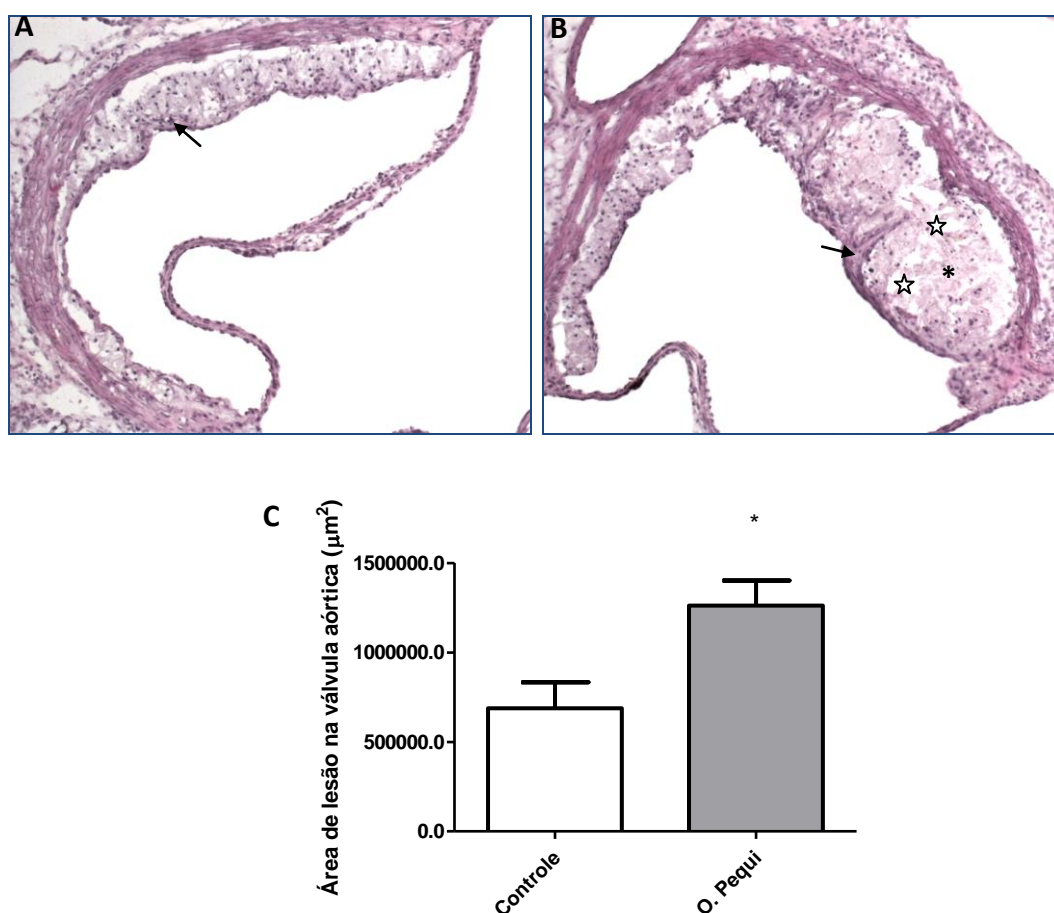


Figura 9- Área de lesão aterosclerótica na válvula aórtica dos camundongos LDLr^{-/-} após seis semanas sob dieta controle (óleo de soja) ou enriquecida com óleo de pequi.

(A) e (B) Histologia das válvulas aórticas mostrando características das lesões dos grupos controle e óleo de pequi, respectivamente. Cortes histológicos corados em Hematoxilina-Eosina, aumento de 100x. A seta indica presença de capa fibrosa, as estrelas indicam regiões onde se evidencia a existência de cristais de colesterol e o asterisco indica região de necrose. (C) Representação gráfica da área de lesão. Os valores são apresentados como média ± Erro padrão (n=12). *p<0,05.

A deposição de colágeno nas lesões da válvula aórtica constitui um fator importante para a estabilidade da placa. A quantidade de colágeno nas lesões apresentou-se estatisticamente semelhante entre o grupo controle e o experimental demonstrando que não houve interferência da dieta (Figura 10).

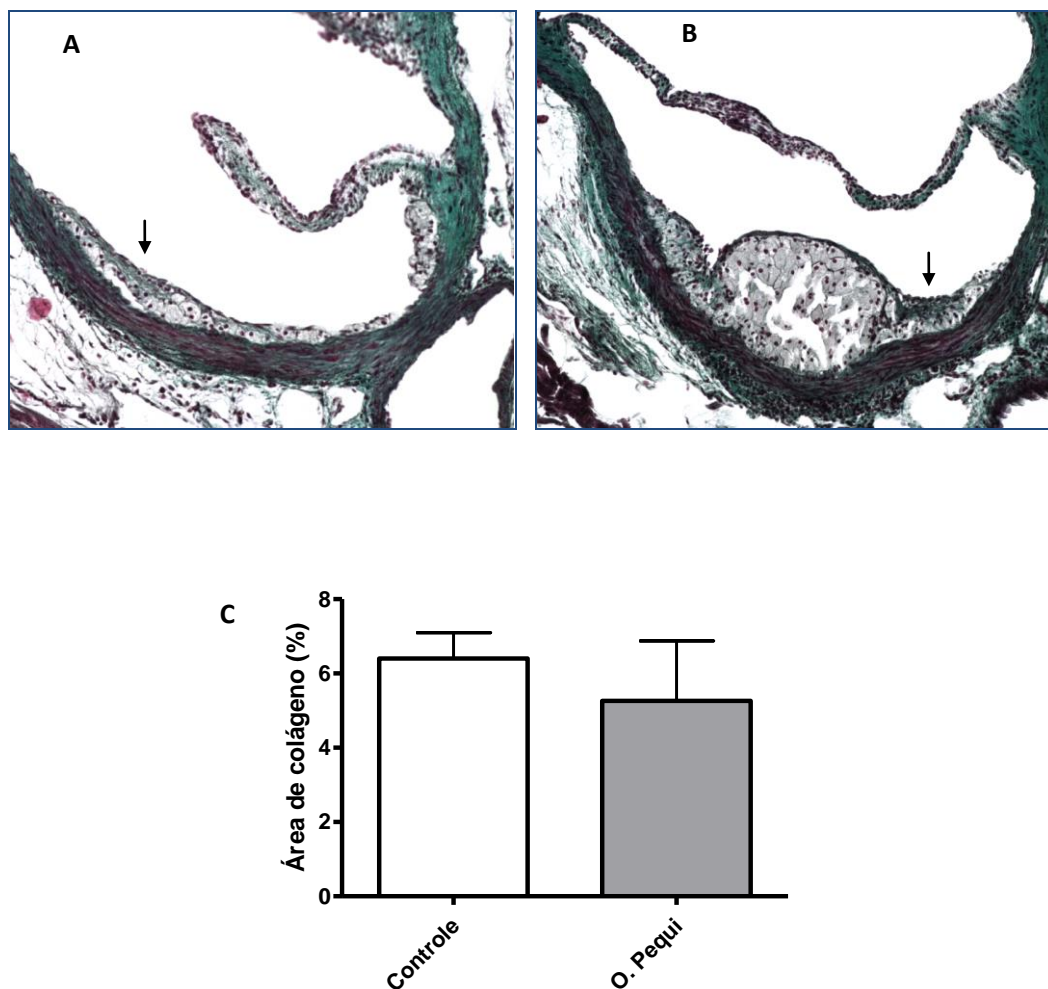


Figura 10- Deposição de colágeno na válvula aórtica dos camundongos LDLr^{-/-} após seis semanas sob dieta controle (óleo de soja) ou enriquecida com óleo de pequi. (A) e (B) Histologia das válvulas aórticas mostrando características das lesões dos grupos controle e óleo de pequi, respectivamente, quanto à deposição de colágeno, indicado pela cor verde (seta). Cortes histológicos corados em Tricrômio de Gômori e contraincolorados com hematoxilina, com aumento de 100x. (C) Representação gráfica da área de lesão. Os valores são apresentados como média \pm Erro padrão.

Aortas dos animais do grupo experimental, surpreendentemente, apresentaram uma significativa redução na área acometida por lesões ateroscleróticas após a ingestão do óleo de pequi (Figura 11). A redução foi de cerca de 50% da área acometida pela lesão em animais controles.

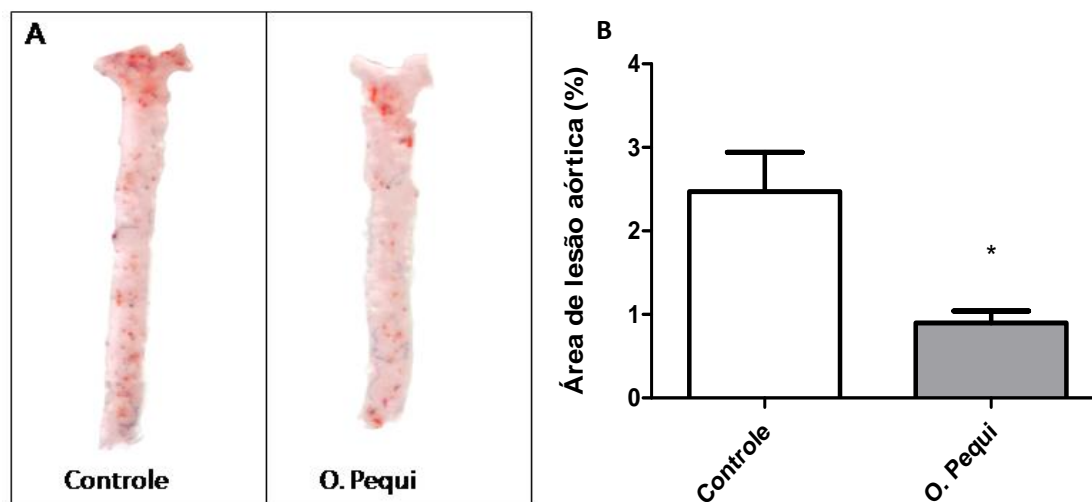


Figura 11- Área de lesão nas aortas dos camundongos LDLr-/- após seis semanas sob dieta controle (óleo de soja) ou enriquecida com óleo de pequi. (A) Foto das aortas coradas com Sudan IV. (B) Porcentagem da área de lesão. Os valores são apresentados como média \pm Erro padrão (n=10). *p<0,05.

Em resumo, os dados do metabolismo lipídico e lesão aterosclerótica mostraram que o óleo de pequi retarda o início do desenvolvimento da lesão (como visto na aorta), mas aumenta a aterogênese quando esta é analisada em um estágio mais avançado.

Como o aumento da placa seria o esperado para o perfil lipídico proaterogênico visto no soro de animais alimentados com óleo de pequi, nosso objetivo, a seguir, foi avaliar os efeitos do pequi que poderiam estar envolvidos na menor formação de placas em seus estágios iniciais (como visto na aorta). O alto nível de antioxidantes no pequi, descrito anteriormente, faz destas substâncias os primeiros candidatos à investigação de seus efeitos.

6.4- Estresse oxidativo

Devido à rica composição em substâncias antioxidantes do óleo de pequi foram, então, verificados possíveis efeitos de sua ingestão sobre o estresse oxidativo. A avaliação do estresse oxidativo foi realizada por meio da análise da peroxidação lipídica no fígado, determinação da presença de anticorpos anti-LDL oxidada no soro e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por macrófagos peritoneais.

6.4.1- Peroxidação lipídica no fígado

Como visto anteriormente, a ingestão de dieta com óleo de pequi aumentou o teor de lipídeos totais no fígado. Porém, vimos que essa dieta resultou em uma significativa diminuição da peroxidação lipídica hepática avaliada pela técnica de TBARS (Figura 12).

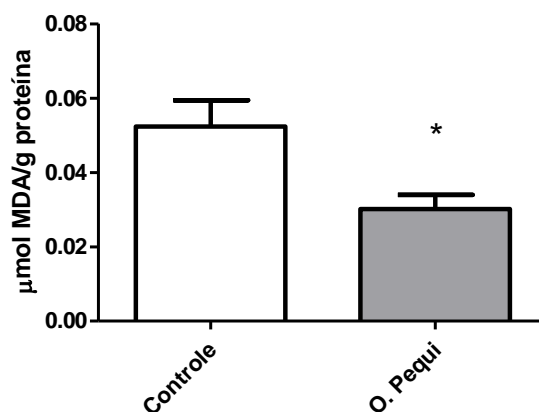


Figura 12- Peroxidação lipídica no fígado dos camundongos LDLr-/- após seis semanas sob dieta controle (óleo de soja) ou enriquecida com óleo de pequi. Os valores são apresentados como média ± Erro padrão (n=12). *p<0,05.

6.4.2- Atividade de enzimas antioxidantes

Foi avaliada uma possível relação entre o efeito antioxidante da dieta contendo óleo de pequi e a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase no tecido hepático.

Não foram encontradas diferenças entre os grupos quanto à atividade enzimática da superóxido dismutase e da catalase no fígado dos animais (Figura 13). Esses dados nos levam a concluir que o óleo de pequi age como um antioxidante direto e não indiretamente pela atividade destas enzimas.

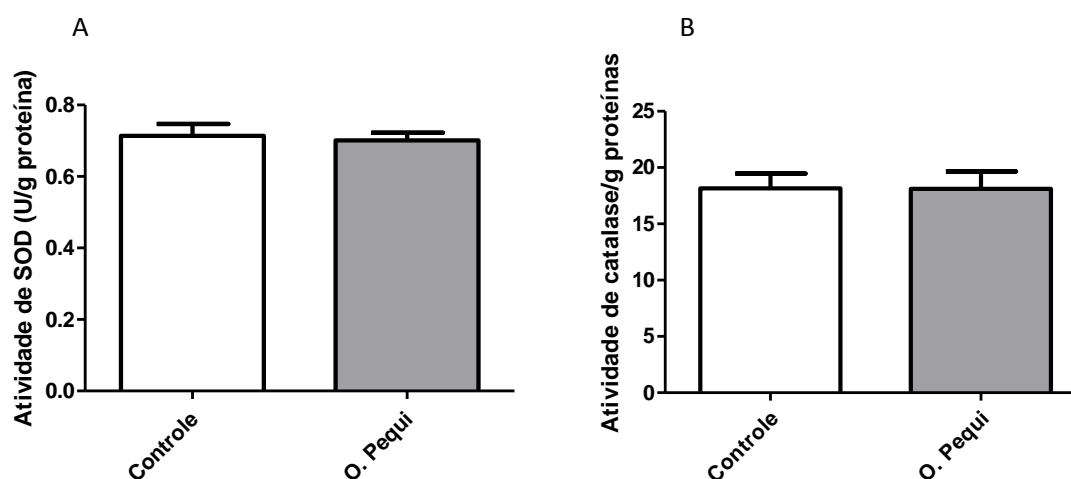


Figura 13- Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) (A) e catalase (B) no fígado dos camundongos LDLr-/- após seis semanas sob dieta controle (óleo de soja) ou enriquecida com óleo de pequi.

Os valores são apresentados como Média \pm Erro padrão (n=12).

6.4.3- Determinação de anticorpos anti-LDL oxidada

A presença de anticorpo anti LDL oxidada representa uma medida indireta da oxidação de LDL, uma vez que a concentração de seus anticorpos específicos aumenta com o aumento da concentração de LDL oxidada no soro. Neste estudo, foi observado que o soro dos animais alimentados com óleo de

pequi apresentaram concentração de anticorpos anti-LDL oxidada menor em comparação aos animais do grupo controle (Figura 14), sugerindo efeito sobre a oxidação de LDL na corrente sanguínea.

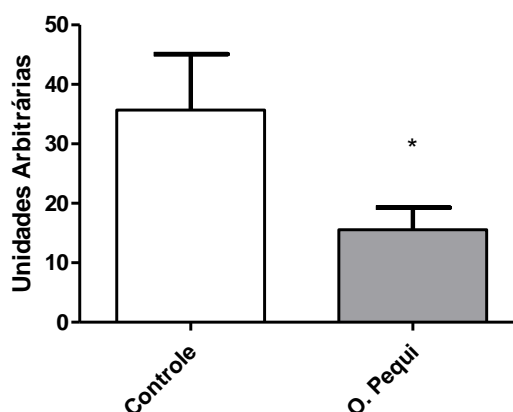


Figura 14- Imunoglobulinas anti-LDL oxidada no soro de camundongos LDLr-/- após seis semanas sob dieta controle (óleo de soja) ou enriquecida com óleo de pequi. Os valores são apresentados como Média ± Erro padrão (n=12). *p<0,05.

6.4.4- Verificação da produção de espécies reativas de oxigênio por macrófagos peritoneais

Os dados obtidos até agora sugerem que o óleo de pequi reduziu o estresse oxidativo, incluindo a oxidação de LDL por uma ação antioxidante de alguns de seus componentes. Porém, as alterações intracelulares que podem decorrer da ingestão crônica de pequi ainda não foram estudadas. Assim, nosso próximo passo foi verificar se macrófagos seriam também afetados pelos efeitos do óleo de pequi. Nossos resultados com macrófagos peritoneais residentes não estimulados têm níveis basais de espécies reativas de oxigênio (ROS) semelhantes em ambos os grupos. Porém, após estímulo com zymosan, nota-se que o grupo ingerindo pequi apresenta menor liberação de ROS por macrófagos não ativados previamente (Figura 15), inferindo efeito modulador da dieta experimental.

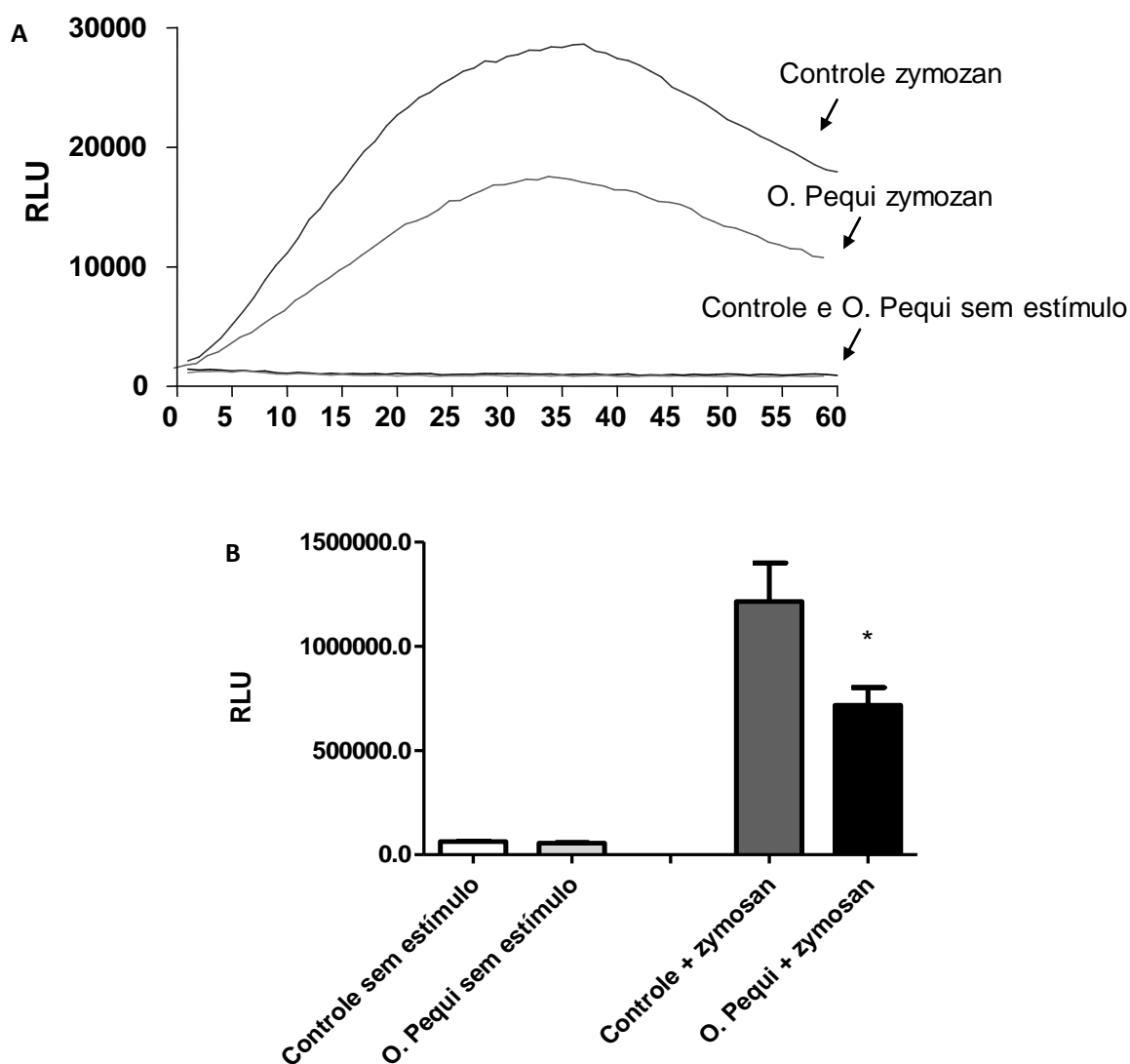


Figura 15- Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por macrófagos peritoneais residentes retirados de camundongos LDLr^{-/-} após duas semanas sob dieta controle (óleo de soja) ou enriquecida com óleo de pequi.

(A) Produção de ROS por uma hora em intervalos de 60 segundos, durante 1 hora. (B) Área sob a curva da produção de ROS dos grupos controle e experimental sem estímulo (nível basal) ou estimulados com zymosan para produção de ROS. RLU: unidade relativa de luz. Os valores da área sob a curva são apresentados como Média \pm Erro padrão (controle n=4; experimental n=5). *p<0,05, para grupo óleo de pequi + zymosan versus controle + zymosan (teste t de Student).

Em resumo, nossos resultados mostram que o óleo de pequi aumenta a colesterolemia o que leva a uma maior placa aterosclerótica na raiz da aorta, aumentando o risco de infarto. Entretanto, quando analisamos lesões mais tardias, como na aorta torácica, nota-se um efeito benéfico, com menor área desta artéria acometida por lesões ateroscleróticas. Dos efeitos analisados, observa-se que o óleo de pequi possui atividade antioxidante direta no fígado e também na liberação de espécies reativas de oxigênio por macrófagos. Adicionalmente, sugere redução nos processos oxidativos da LDL no soro, devido à menor concentração de autoanticorpos anti-LDL oxidada.

7- Discussão

O *Caryocar brasiliense*, conhecido como pequi, é um fruto bastante importante para a população do segundo maior bioma brasileiro, o Cerrado. Neste estudo foi examinado o potencial efeito da suplementação da dieta com óleo de pequi, comparado ao óleo de soja, no metabolismo lipídico, desenvolvimento da aterosclerose e estresse oxidativo em camundongos deficientes no receptor de LDL submetidos à dieta aterogênica.

O óleo de pequi possui composição heterogênea em ácidos graxos insaturados e saturados, sendo estes, em uma quantidade bastante expressiva, cerca de 37% (LIMA et al., 2007), podendo apresentar implicações importantes no metabolismo lipídico e na aterosclerose. Além disso, o elevado potencial antioxidante, devido à sua composição rica em substâncias antioxidantes como carotenóides, principalmente, poderia exercer efeito sobre o estresse oxidativo.

Os grupos não diferiram na quantidade de dieta ingerida demonstrando que a suplementação com óleo de pequi não acarretou em diferença na aceitação da dieta, o que implicou em uma ingestão calórica semelhante. O desenvolvimento ponderal também não apresentou diferença entre os grupos, assim como o ganho de peso final, ratificando uma ingestão calórica similar.

O metabolismo lipídico dos animais foi avaliado ao término do experimento pela determinação do perfil lipídico no sangue, fígado e conteúdo cecal. Este é fundamental para analisar a absorção e excreção lipídica e o fígado constitui o principal órgão envolvido no metabolismo de lipoproteínas, somando-se, assim, importantes alvos para uma compreensão mais ampla e de uma maneira sistêmica do metabolismo em questão.

O óleo de pequi possui elevado percentual de ácido graxo oléico. Este ácido graxo monoinsaturado possui conhecido efeito hipocolesterolêmico, atuando como redutor das lipoproteínas de baixa densidade. No entanto, o pequi também é constituído por cerca de 35% de ácido palmítico o qual está associado à dislipidemias. A dieta enriquecida com colesterol promoveu um quadro hipercolesterolêmico em ambos os grupos, conforme característica do

modelo murino utilizado, sob dieta aterogênica. A ingestão de dieta contendo óleo de pequi foi capaz de elevar ainda mais o perfil lipídico sérico aumentando os níveis do colesterol total, da fração aterogênica e índice aterogênico. Os triglicerídeos também foram elevados pelo óleo de pequi em comparação à dieta controle. As concentrações plasmáticas de HDL colesterol, no entanto, foram similares entre os grupos. Esses dados demonstraram que o óleo de pequi conferiu acentuada dislipidemia nos animais do grupo experimental.

O óleo de soja é constituído por cerca de 15% de ácidos graxos saturados (OLIVEROS et al., 2003) enquanto o óleo de pequi possui uma quantidade bastante superior, como já anteriormente descrito, sendo o ácido palmítico o principal (LIMA et al., 2007). Isso o torna uma fonte de lipídeos saturados maior em comparação ao óleo de soja. Tem sido bastante evidente que a ingestão de dieta rica em gordura saturada, principalmente rica em ácido palmítico, exerce potente efeito na elevação dos triglicerídeos, do colesterol total e, particularmente, do LDL colesterol. (GRUNDY e DENKE, 1990; TRAUTWEIN et al., 1997; DINIZ et al., 2004) corroborando, assim, os achados neste trabalho. Além disso, o ácido graxo linoléico (18:2 ω -6), predominante no óleo de soja possui função hipocolesterolêmica em contraste aos ácidos graxos saturados (OLIVEROS et al., 2003). Portanto, embora o óleo de pequi possua mais de 50% de sua composição em ácido graxo oléico, o efeito do ácido palmítico sobrepujou a ação hipocolesterolêmica desse ácido graxo monoinsaturado, exacerbando a dislipidemia nos animais. Esses dados diferem do nosso estudo anterior que apresentou aumento na fração HDL-c (AGUILAR, 2006). No entanto, nesse primeiro trabalho os animais foram alimentados com polpa de pequi que é bastante rica em fibras. O consumo de fibras, por sua vez, é associado à melhoria no perfil lipídico com a redução do colesterol total, LDL e triglicerídeos e aumento de HDL (FIETZ e SALGADO, 1999; SILVA et al., 2003a). Adicionalmente, o efeito observado no estudo anterior ocorreu em camundongos selvagens enquanto no presente trabalho foi utilizado um modelo de aterosclerose modificado geneticamente, sendo deficiente no receptor de LDL. É conhecido que camundongos selvagens possuem resistência em desenvolver dislipidemia, principalmente por transportarem o

colesterol sérico, em sua maioria, em lipoproteínas de alta densidade (BRESLOW, 1996, HOFKER et al., 1998; NEUZIL et al., 1998; FAZIO e LINTON, 2001), justificando, então, a diferença entre esses estudos.

A concentração de lipídeos totais e de colesterol no fígado foi aumentada pela ingestão de óleo de pequi, embora os dados do ceco indiquem que a excreção de colesterol tenha sido aumentada com tal dieta. A ingestão de saturados está associada a maior acúmulo de lipídeos no fígado. Os ácidos graxos saturados favorecem o aumento da síntese de VLDL, para seguinte secreção na corrente sanguínea, acarretando, assim, maiores níveis de colesterol e triglicerídeos no fígado, até que sejam secretados. Portanto, isso sugere que o aumento dos lipídeos hepáticos neste estudo pode estar relacionado a maior concentração de ácido graxo palmítico no óleo de pequi em relação ao óleo de soja. Em adição, a produção das quilomicras não é afetada pelo acúmulo de colesterol no fígado, o que permite que grandes quantidades de colesterol se acumulem no fígado, quando a dieta é rica em gorduras. A proposição da síntese elevada de VLDL no fígado devido à ingestão de lipídeos saturados corrobora com os maiores níveis de triglicerídeos, como também da fração aterogênica, encontrados no soro dos animais que ingeriram óleo de pequi (MUCCSKEY et al., 2004; CARMIEL-HAGGAI et al., 2005). Nossos resultados estão de acordo com os de Trautwein et al. (1997) cuja ingestão de dieta rica em ácido palmítico aumentou os lipídeos hepáticos. Essa maior concentração hepática de lipídeos também está em conformidade com a esteatose hepática microvesicular ocorrida em camundongos suíços alimentados com polpa de pequi por seis semanas, em nosso prévio estudo (AGUILAR, 2006).

Níveis elevados de glicose também constituem fator de risco para aterosclerose, estando envolvidos, inclusive, com a oxidação das LDLs (MARITIM et al., 2003). Foi observado que os níveis glicêmicos não foram modificados pela ingestão de óleo de pequi. Esse resultado corrobora os encontrados anteriormente em nosso estudo, no qual não houve diferença na glicemia dos animais que ingeriram polpa de pequi em comparação ao controle (AGUILAR, 2006).

Nossos resultados, então, indicam que o óleo de pequi eleva os lipídeos sanguíneos, que constituem fatores de risco para a aterosclerose, como também altera o perfil lipídico hepático.

Nosso próximo passo foi verificar se essas mudanças no perfil lipídico afetariam o desenvolvimento da aterosclerose. O aumento das lesões ateroscleróticas no sinus aórtico observado no grupo experimental pode ser justificado pela dislipidemia ocasionada devido à ingestão do óleo de pequi. Níveis elevados de LDL na corrente sanguínea constituem um dos principais fatores desencadeantes da aterosclerose, pois ocasionam sua infiltração e retenção na matriz subendotelial. A oxidação das LDL aprisionadas na camada íntima é, então, responsável pelos subseqüentes eventos envolvidos no desenvolvimento da placa aterosclerótica (LUSIS, 2000; SCOTT, 2004). Além de atuar na elevação das concentrações plasmáticas de LDL, é bem definido que a ingestão de ácidos graxos saturados, principalmente o palmítico, também determina acentuada progressão da aterosclerose (GERMAN E DILLARD, 2004; ARBONÉS-MAINAR, 2007), corroborando os resultados deste estudo. O consumo de monoinsaturados e poli-insaturados, no entanto, possui evidente efeito anti-aterogênico por retardar o desenvolvimento da aterosclerose ao reduzir níveis de LDL-c e aumentar os de HDL-c. Além de atuar na redução do colesterol, os ácidos graxos monoinsaturados possuem efeito protetor na oxidação da LDL e função endotelial, podendo modular a aterogênese por meio da redução na expressão de moléculas de adesão endotelial que estão envolvidas no recrutamento de monócitos na camada íntima arterial (CARLUCCIO et al., 1999; PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2002). Assim, o menor desenvolvimento da aterosclerose no grupo alimentado com óleo de soja é justificado pelos efeitos dos monoinsaturados e poli-insaturados constituintes desse óleo.

A presença de colágeno na placa aterosclerótica na válvula aórtica é fundamental para sua estabilidade e, portanto, para evitar o rompimento com conseqüente formação de trombos (DAVIES et al., 1993; LEE e LIBBY, 1997; SCOTT, 2004). Embora o grupo experimental tenha apresentado maior área de lesão na válvula aórtica, a quantidade de colágeno não diferiu entre os grupos.

Esse resultado demonstra que a estabilidade da placa não foi modificada pela ingestão de pequi.

Surpreendentemente, a resposta ao desenvolvimento da aterosclerose à dieta mostrou-se diferente na aorta em relação ao sinus aórtico, uma vez que os animais que consumiram óleo de pequi tiveram menor percentual de área de lesão na aorta. Um fato importante a se destacar é que a formação da aterosclerose tem início na raiz da aorta e se desenvolve ao longo da aorta ascendente, torácica e abdominal. Além da diferença na iniciação da lesão, a taxa na progressão varia entre os diferentes sítios, ocorrendo, portanto, mais tardiamente na aorta (VANDERLAAN et al., 2003). Esse fato sugere que o óleo de pequi exerceu efeito benéfico em lesões em fase mais inicial de desenvolvimento, pois as lesões na aorta ocorrem num período mais tardio estando, portanto, em fase mais inicial em comparação ao sinus aórtico. Assim, no período correspondente a seis semanas utilizado neste estudo, as lesões na aorta ainda estavam em estágio susceptível ao efeito protetor do óleo de pequi. Quanto à válvula aórtica, no entanto, esse período já corresponde a um estágio mais avançado no qual a dislipidemia pronunciada nos animais possa ter sobrepujado o efeito protetor do óleo de pequi. Diferenças sítio-específicas no desenvolvimento da aterosclerose também já foram descritas por outros autores (VANDERLAAN et al., 2003). No estudo desenvolvido por Reardon et al. (2006), a dieta contendo óleo de girassol reduziu as lesões na raiz da aorta porém não alterou o desenvolvimento das lesões na aorta em camundongos LDLr-/- com deficiência imune (RAG-/-). Efeitos opostos entre os sítios propensos à aterosclerose também foram descrito por Acín et al. (2005), nos quais dieta contendo azeite de oliva quando enriquecida com colesterol aumentou a aterosclerose na válvula aórtica porém retardou o desenvolvimento das lesões na aorta mesmo com elevação do colesterol sérico, sendo esse resultado atribuído a efeitos antioxidantes. Resposta sítio-específica por efeito de uma importante molécula de adesão responsiva a variações oxidativas, PECAM-1, foi descrita por Goel et al. (2008), influenciando o início e progressão das lesões na aorta tanto positiva quanto negativamente de acordo com o sítio da artéria.

Implicações do estresse oxidativo no desenvolvimento da aterosclerose são bastante evidentes, tais como o aumento da oxidação de LDL e disfunção endotelial, dentre outros (HEISTAD, 2006; MALLIKA, 2007). Buscamos, portanto, avaliar possíveis efeitos do óleo de pequi no estresse oxidativo que pudesse relaciona-se a redução da aterosclerose da aorta.

A peroxidação lipídica medida no fígado pela técnica de TBARS demonstrou um efeito benéfico da ingestão de óleo de pequi, pois se apresentou reduzida no grupo experimental. Diversos estudos têm demonstrado ação antioxidante de extratos do pequi, em experimentos realizados *in vitro* (PAULA-JUNIOR, 2006; KHOURI et al., 2007; ROESLER et al., 2007; ROESLER et al., 2008). Um recente estudo *in vivo* também evidenciou essa atuação em decorrência da ingestão do óleo da polpa de pequi (MIRANDA-VILELA et al., 2009a). No entanto, investigamos se o efeito redutor da peroxidação lipídica teria ocorrido devido a modificações na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase, uma vez que sua ação previne o estresse oxidativo. Estas enzimas compõem parte do sistema antioxidante do organismo atuando como importantes reguladores das espécies reativas de oxigênio, sendo a SOD conversora de radicais superóxido (O_2^-) em H_2O_2 e O_2 , e a catalase responsável pela oxidação do peróxido de hidrogênio (AFONSO et al., 2007; POWERS e JACKSON, 2008). A dosagem da atividade dessas enzimas no tecido hepático dos animais não apresentou diferença entre os grupos. Esse resultado demonstra que a ação antioxidante do óleo de pequi pode estar sendo capaz de reduzir a peroxidação lipídica por efeito próprio em decorrência das substâncias antioxidantes presentes.

A oxidação de lipoproteínas e conseqüente formação de LDL oxidada desempenha um importante papel na aterogênese e pode ser aumentada pelo estresse oxidativo. A oxidação de LDL leva à formação de epítomos, como resultado da decomposição oxidativa dos ácidos graxos, levando à produção de anticorpos anti-LDL oxidada (TUOMINEN et al., 2006). A detecção sérica de anticorpos anti-LDL oxidada mostrou-se menor no soro dos animais do grupo experimental. Esse resultado demonstra o efeito do óleo de pequi sobre processos oxidativos das LDL presentes na corrente sanguínea.

Os efeitos antioxidantes descritos acima falam a favor de antioxidantes presentes na composição do óleo de pequi que poderiam exercer papel direto, impedindo ou neutralizando os agentes pro-oxidantes presentes nos sítios estudados. Porém, a principal fonte de liberação de radicais livres para oxidação de LDL não está no plasma, mas sim nos macrófagos ativados no subendotélio. Estas células são capazes de liberar radicais livres para tornar as LDL minimamente oxidadas, oriundas do plasma, em LDL fracamente oxidadas. Este processo leva ao reconhecimento mais eficaz das LDL oxidadas pelos receptores *scavenger* de macrófagos, aumentando então a formação de células espumosas, a unidade básica da aterosclerose. Para avaliar o potencial de liberação de radicais livres, em experimento *ex vivo* medimos a produção de espécies reativas de oxigênio por macrófagos peritoneais residentes (sem ativação previa) de animais do grupo controle ou alimentados com óleo de pequi, após serem estimulados com zymosan. Foi encontrada uma produção de ROS significativamente reduzida pela dieta experimental. Esse resultado pode estar associado ao elevado conteúdo de carotenóides do óleo pequi, uma vez que esses compostos têm demonstrado efeito inibitório sobre o “burst” respiratório em macrófagos com conseqüente diminuição de danos oxidativos (WOLFSON et al., 1988; BENDICH, 1989). Walrand et al. (2005) também demonstraram potencial papel dos carotenóides na modificação do “burst” respiratório em neutrófilos, sendo que a depleção em carotenóides aumentou a produção de ROS e a repleção foi capaz de reduzir a produção exacerbada de ROS restabelecendo os níveis basais. Esse efeito tem sido atribuído a ação eliminadora de radicais livres conferida aos carotenóides e que pode ser dependente do “pool” celular destes compostos. Assim, a maior ingestão de carotenóides pelo consumo de óleo de pequi, pode ter resultado em maiores concentrações celulares destes componentes nos macrófagos e, conseqüentemente, modulado a liberação de ROS. Apesar do potencial antioxidante dos carotenóides, a atividade de enzimas antioxidantes é um fator importante na eliminação de espécies reativas de oxigênio. Dixon et al. (1994) avaliaram o efeito da depleção e repleção de carotenóides sobre a atividade de SOD. A depleção ocasionou redução dessa atividade e a repleção acarretou em reconstituição da atividade de SOD para níveis basais. Já a suplementação

com carotenóides não implica necessariamente em aumento da atividade de SOD como demonstrado por Girodon et al. (1997). Esses estudos indicam que a carência em carotenóides pode implicar em deficiência na atividade da superóxido dismutase, contudo a suplementação não parece intensificar a atividade dessa enzima, sugerindo apenas mantê-la em níveis adequados. Em conformidade com essas observações, no presente estudo não foram encontradas alterações na atividade das enzimas antioxidantes SOD e catalase, no fígado, em decorrência da ingestão de óleo de pequi. Portanto, isso sugere que as propriedades antioxidantes dos carotenóides possam estar modulando diretamente a via bioquímica da liberação de ROS nos macrófagos (WALRAND et al., 2005). Em adição, o uso de outros compostos antioxidantes, também tem demonstrado reduzir a produção de ROS por macrófagos (MORENO, 2003), o que reforça a modulação na liberação desses radicais livres por macrófagos por efeito de componentes que apresentem propriedades antioxidantes.

Nossos resultados relacionados ao estresse oxidativo permitem mais uma vez atestar a capacidade antioxidante do óleo de pequi como já tem sido demonstrado por outros autores (PAULA-JUNIOR, 2006; KHOURI et al., 2007; MIRANDA-VILELA et al., 2009a) e mostrar que este efeito expande-se também para o meio intracelular.

O efeito do óleo de pequi sobre a aterogênese na aorta neste experimento pode, então, estar relacionado ao menor estresse oxidativo promovido por sua ingestão. Como anteriormente descrito, as lesões na aorta aparecem mais tardiamente e, portanto, apresentam-se mais iniciais, sugerindo efeito protetor em decorrência da ação anti-oxidante do pequi em estágios mais precoces da aterogênese, tendo em vista que o estresse oxidativo é uma condição importante para o desenvolvimento dessa patologia (MALLIKA, 2007; PARTHASARATHY et al., 2008; KATO et al., 2009). Vale ressaltar, aqui, a menor ativação de macrófagos pelo pequi que pode ser associada à menor lesão na aorta, já que o mesmo é um importante componente para o aumento da oxidação das LDL no subendotélio e a progressão da placa, devido à produção de ROS. Em contraste, o início mais precoce da aterosclerose na

válvula, embora possa ter sido afetado pela redução do estresse oxidativo nos momentos iniciais, no decorrer do experimento esse efeito pode ter sido superado pelo aumento crescente da colesterolemia conseqüente ao óleo de pequi que foram dobradas ao final do experimento. Isto se deve ao aumento crescente de LDL (mesmo não oxidada) que migra para a camada íntima dos vasos, efeito diretamente proporcional ao aumento na concentração de lipoproteínas aterogênicas no sangue, independentemente do seu estado oxidativo. Vale ressaltar que nossos resultados estão em conformidade com o estudo de Acín et al. (2005), no qual o efeito antioxidante do azeite de oliva mostrou-se protetor em retardar a progressão da aterosclerose na aorta, mesmo com maior aterogênese no sinus aórtico.

Apesar do efeito protetor dos antioxidantes na redução do estresse oxidativo, o seu papel como ateroprotetores são ainda controversos em estudos *in vivo* (SIEKMEIER et al., 2007) estando, portanto, em conformidade com a condição ocorrida neste experimento, pois o óleo de pequi mostrou-se protetor nas lesões iniciais, mas não reduziu a progressão da aterosclerose no sinus aórtico.

Anticorpos anti-LDL oxidada tem sido associados com o desenvolvimento da aterosclerose, porém não indicam necessariamente a gravidade da doença e indicam indiretamente apenas o estado oxidativo das LDL circulantes. Alguns estudos mostram que as concentrações de anticorpos anti-LDL oxidada não refletem ou não são alterados com a extensão das lesões (KATO et al., 2008; SMOOK et al., 2008), corroborando, assim, o fato de que embora os níveis de anticorpos anti-LDL oxidada estejam menores nos animais que consumiram óleo de pequi, isso não se refletiu no desenvolvimento da aterosclerose na raiz da aorta. Ademais, como dito acima, a migração de LDL para o subendotélio pode ocorrer independentemente de sua previa oxidação (LUSIS, 2000), podendo sofrer modificações oxidativas após sua entrada.

8- Conclusão

Este trabalho é pioneiro no estudo do efeito da ingestão de dieta suplementada com óleo de pequi no desenvolvimento da aterosclerose. Os resultados permitem concluir que o óleo de pequi foi capaz de promover pronunciada dislipidemia nos animais deficientes no receptor de LDL submetidos à dieta aterogênica. Uma redução no estresse oxidativo também foi observada em alguns parâmetros. No entanto, houve aumento da aterosclerose na válvula aórtica, que pode ser justificada pela hipercolesterolemia. A redução das lesões ateroscleróticas na aorta sugere efeito protetor da ação antioxidante do óleo de pequi apenas em lesões iniciais.

Mais estudos, portanto, são necessários para caracterização dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento da aterosclerose por efeito da ingestão do óleo de pequi. Vale ressaltar também, que a ingestão de óleo de pequi não é indicada para pessoas que apresentem risco para infarto ou aterosclerose.

9- Referências bibliográficas

ACÍN S, NAVARRO MA, CARNICER R, ARBONES-MAINAR JM, GUZMAN MA, ARNAL C, BELTRAN G, UCEDA M, MAEDA N, OSADA J. Dietary cholesterol suppresses the ability of olive oil to delay the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. **Atherosclerosis**, v. 182, p. 17-28, 2005.

AFONSO, V.; CHAMPY, R.; MITRIVIC, D.; COLLIN, P.; LOMRI, A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. **Joint Bone Spine**, v. 74, p.324-329, 2007.

ÁGUILA, M.B.; LOUREIRO, C.C.; PINHEIRO, A.R.; MANDARIM LACERDA, C.A. Lipid metabolism in rats fed diets containing different types of lipids. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 78, n. 1, p. 32-38, 2002.

AGUILAR, E.C. **Glicemia, colesterolemia, ganho ponderal e avaliação hepática em camundongos submetidos ao consumo de polpa e amêndoa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)**. 2006. 48p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Estadual de Montes Claros – UNIMONTES, MG.

ALLAIN, C.C.; POON, L.S.; CHAN, C.S.; RICHMOND, W.; FU, P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clin. Chem.**, v.20, p. 470-475, 1974.

ALMEIDA, S.P. de; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, p. 106-112, 1998.

ALVAREZ-LEITE, J. Lipoproteínas e transporte de lipídios no organismo. In: VIEIRA, E.C.; ALVAREZ-LEITE, J.I.; GOMEZ, M.V.; FIGUEIREDO, E.A. **Química Fisiológica**, Rio de Janeiro: Atheneu, 1995. p.17-31.

ARBONÉS-MAINAR, J.M.; NAVARRO, M. A.; CARNICER, R.; GUILLÉN, N.; SURRA, J.C.; ACIN, S.; GUZMÁN, M.A.; SARRÍA, A.J.; ARNAL, C.;

AGUILERA, M.; JIMÉNEZ, A.; BELTRÁN, G.; UCEDA, M.; OSADA, J. Accelerated atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice fed Western diets containing palm oil compared with extra virgin olive oils: A role for small, dense high-density lipoproteins. **Atherosclerosis**, v. 194, p. 372-382, 2007.

BENDICH, A. Carotenoids and the immune response. **J. Nutr.**, v. 119, p. 112–115, 1989.

BINDER, C.J.; CHANG, M.K.; SHAW, P.X.; MILLER, Y.I.; HARTVIGSEN, K.; DEWAN, A.; WITZTUM, J. Innate and acquired immunity in atherogenesis. **Nature Med.**, v. 8, n. 11, p. 1218-1226, 2002.

BINKOSKI, A.E.; KRIS-ETHERTON, P.M.; WILSON, T.A.; MOUNTAIN, M.L. Balance of unsaturated fatty acids is important to a cholesterol-lowering diet: comparison of mild-oleic sunflower oil and olive oil on cardiovascular disease risk factors. **J. Am. Diet. Assoc.**, v. 105, p. 1080-1086, 2005.

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

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Meth. Enzy.**, v. 52, p. 302-10, 1978.

BUONOCORE, G., GROENENDAAL, F. Anti-oxidant strategies. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**. v. 12 p. 287-95, 2007.

CARLUCCIO, M.A.; MASSARO, M.; BONFRATE, C.; SICULELLA, L.; MAFFIA, M.; NICOLARDI, G.; DISTANTE, A.; STORELLI, C.; CATERINA, R. Oleic acid inhibits endothelial activation: a direct vascular anti-atherogenic mechanism of a nutritional component in the Mediterranean diet. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 19, p. 220–228, 1999.

CARMIEL-HAGGAI, M.; CEDERBAUM, A.I.; NIETO, N. A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. **FASEB J.**, v. 19, p. 136-138, 2005.

CASÓS, K.; SÁIZ, M.P.; RUIZ-SANZ, J.I.; MITJAVILA, M.T. Atherosclerosis prevention by a fish oil-rich diet in apoE^{-/-} mice is associated with a reduction of endothelial adhesion molecules. **Atherosclerosis**. v. 201, p. 306-317, 2008.

CETEC. Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais: Estudo das oleaginosas de Minas Gerais. **Boletim nº 1**. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, Secretaria de Estado de Ciências e Tecnologia, p. 154-246, 1983.

CHAMPE, P. C., HARVEY, R. A., FERRIER, D. R. Lipid metabolism. In: **Biochemistry**, 4^a. edição, 2007.

CHUNG, B.H.; SEGREST, J.P.; RAY, M.J.; BRUNZELL, J.D.; HOKANSON, J.E.; KRAUSS, R.M.; BEAUDRIE, K.; CONE, J.T. Single vertical spin density gradient ultracentrifugation. **Methods Enzymol**, v. 128, p. 181-209, 1986.

CLARKE, R.; ARMITAGE, J. Antioxidant Vitamins and Risk of Cardiovascular Disease. **Cardiov. Drug. Ther.**, v. 16, p. 411-415, 2002.

DAVIES, M.J.; RICHARDSON, P.D.; WOOLF, N.; KATZ, D.R.; MANN, J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. **Br. Heart J.**, v.69, p. 377-381, 1993.

DI MASCIO, P.; MURPHY, M.E.; SIES, H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. **Am. J. Clin. Nutr.**, p. 53, p. 194-200, 1991.

DIETERICH, S.; BIELIGK, U.; BEULICH, K.; HASENFUSS, G.; PRESTLE, J. Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart: Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. **Circulation**, v. 101, p. 33-39, 2000.

DINIZ, Y.S.A.; CICOOGNA, A.C.; PADOVANI, C.R.; SANTANA, L.S.; FAINE, L.A.; NOVELLI, L.B. Diets Rich in Saturated and Polyunsaturated Fatty Acids: Metabolic Shifting and Cardiac Health. **Basic Nutrit. Investig.**, v. 20, p. 230-234, 2004.

DIXON, Z.R.; BURRI, B.J.; CLIFFORD, A.; FRANKEL, E.N.; SCHNEEMAN, B.O.; PARKS, E.; KEIM, N.L.; BARBIERI, T.; WU, M.M.; FONG, A.K. Effects of a carotene-deficient diet on measures of oxidative susceptibility and superoxide dismutase activity in adult women. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 17, p. 537-544, 1994.

FAZIO, S.; BABAEV, V.R.; MURRAY, A.B.; HASTY, A.H.; CARTER, K.J.; GLEAVES, L.A.; ATKINSON, J.B.; LINTON, M.F. Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v.94, n.9, Apr 29, p.4647-52. 1997.

FAZIO, S.; LINTON, M.F. Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis. **Front. Biosci.**, v. 6, p. 515-525, 2001.

FIETZ, V.R.; SALGADO, J.M. Efeito da pectina e da celulose nos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos em ratos hiperlipidêmicos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 19, n. 3, p. 318-321, 1999.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.**, v. 226, p. 497-509, 1957.

FRANSSEN, R.; MONAJEMI, H.S; TROES, E.S.G.; KASTELEIN, J.J.P. Obesity and Dyslipidemia. **Endocrinol. Metab. Clin. N. AM.**, v. 37, p. 623–633, 2008.

GENESTRA, M. Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. **Cell. Signall.**, v. 19 p. 1807-19, 2007.

GERMAN, J.B; DILLARD, C.J. Saturated fats: what dietary intake? **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 80, p. 550-559, 2004.

GILLISSEN, A.; BARTLING, A.; SCHOEN, S.; SCHULTZE-WERNINGHAUS, G. antioxidant function of ambroxol in mononuclear and polymorphonuclear cells *in vitro*. **Lung**, v. 175, p. 235-242, 1997.

GIRODON, F.; BLACHE, D.; MONGET, AL.; LOMBART, M.; BRUNET-LECOMPTE, P.; ARNAUD, J.; RICHARD, M-J.; GALAN, P. Effect of two year supplementation with low doses of antioxidant vitamins and/or minerals in elderly subjects on levels of nutrients and antioxidant defense parameters. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 16, p. 357–365, 1997.

GOETZ, M. E., LUCH, A. Reactive species: A cell damaging rout assisting to chemical carcinogens. **Canc. Lett.**, v. 266 p. 73–83, 2008.

GOEL, R.; SCHRANK, B.R.; ARORA, S.; BOYLAN, B.; FLEMING, B.; MIURA, H.; NEWMAN, P.J.; MOLTHEN, R.C.; NEWMAN, D.K. Site-Specific Effects of PECAM-1 on Atherosclerosis in LDL Receptor–Deficient Mice. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 28, p. 1996-2002, 2008.

GUO, J.; JOU, W.; GAVRILOVA, O.; HALL, K.D. Persistent diet-induced obesity in male C57BL/6 mice resulting from temporary obesigenic diets. **Pols One**, v.4, p. e5370, 2009.

GRUNDY, S.M.; DENKE, M.A. Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. **J. Lipid Res.**, v. 31, p. 1149-1172, 1990.

HANDRO, W.; BARRADAS, M.M. Sobre os Óleos do Fruto e da Semente do Pequi – *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae). In: **III Simpósio sobre o cerrado**. M.G. Ferri (ed.). p. 110-113, 1971.

HANSSON, G.K.; LIBBY, P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, p. 508-519, 2006.

HEISTAD, D.D. Oxidative stress and vascular disease. **Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 26, p. 689-695, 2006.

HOFKER, M.H.; VAN-VLIJMEN, B.J.; HAVEKES, L.M. Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia an atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 137, n. 1, p. 1-11, 1998.

ISHIBASHI, S.; BROWN, M.S.; GOLSTEIN, J.L.; GERARD, R.D.; HAMMER, R.E.; HERZ, J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversel by adenovirus-mediated gene delivery. **J. Clin. Invest.**, v. 92, p. 883-893, 1993.

ISHIBASHI, S.; GOLSTEIN, J.L.; BROWN, M.S.; HERZ, J.; BURNS, D.K. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. **J. Clin. Invest.**, v. 93, p. 1885-1893, 1994.

JAWIEN, J.; NASTALEK, P.; KORBUT, R. Mouse models of experimental atherosclerosis. **J. Physiol. Pharmac.**, v. 55, n. 3, p. 503-517, 2004.

KATO, R.; MORI, C.; KITAZATO, K.; OBAMA, T.; MORI, M.; TAKAHASHI, K.; AIUCHI, T.; TAKANO, T.; ITABE, H. Transient increase in plasma oxidized LDL during the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. **Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 29, p. 35-39, 2009.

KHOURI, J.; RESCK, I.S.; POÇAS-FONSECA, M.; SOUSA, T.M.M.; PEREIRA, L.O.; OLIVEIRA, A.B.B.; GRISOLIA, C.K. Anticlastogenic potencial and antioxidant effects of an aqueous extract of pulp from the pequi tree (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 2, p. 442-449, 2007.

KRAUSE, M. **Alimentos, Nutrição e dietoterapia**. 10 ed. São Paulo: Roca, 2003.1157p.

LEE, T.S.; YEN, H.C.; PAN, C.C.; CHAU, L.Y. The Role of Interleukin 12 in the Development of Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 19. p. 734-742, 1999.

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

LIMA, A.; SILVA, A.M.O.; TRINDADE, R.A.; TORRES, R.P.; MANCINE-FILHO, J. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). **Rev. Bras. Frutic.** v. 29, n. 3, p. 695-698, 2007.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LU, S.C. Regulation of glutathione synthesis. **Mol. Aspect. Med.**, v. 30, p. 42-59, 2009.

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

MAGALHÃES, H.G.; MONTEIRO NETO, H.; LAGROTA, M.H.; WIGG, M.D.; GUIMARÃES, L.A. de S.; LOJA, M.A. de S.O.; ARAÚJO, R.R. de. Estudo estrutural do pequizeiro *Caryocar brasiliense* Camb. Caryocaraceae, sob o

aspecto farmacológico e botânico. **Rev. Bras. de Farmác.**, v. 69, p. 31-41, 1988.

MALLIKA, V.; GOSWAMI, B. RAJAPPA, M. Atherosclerosis pathophysiology and the role of novel risk factors: a clinicobiochemical perspective. **Angiology**, v. 58, n. 5, p. 513-522, 2007.

MANNING-TOBIN, J.J.; MOORE, K.J.; SEIMON, T.A.; BELL, S.A.; SHARUK, ALVAREZ-LEITE, J.I.; WINTHER, M.P.J. de; TABAS, I. FREEMAN, M.W. Loss of SR-A and CD 36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 29, p. 19-26, 2009.

MARITIM, A.C.; SANDERS, R.A.; WATKINS, J.B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. **J. Bioch. and Molec. Toxicol.**, v. 17, p. 24-38, 2003.

MCCUSKEY, R.; ITO, Y.; ROBERTSON, G.R.; MCCUSKEY, M.K.; PERRY, M.; FARRELL, G.C. Hepatic microvascular dysfunction during evolution of dietary steatohepatitis in mice. **HEPATOLOGY**, v. 40, p. 386-393, 2004.

MEIR, K.S.; LEITERSDORF, E. Atherosclerosis in the apoprotein E-deficient mouse: a decade of progress. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 24, p. 1-9, 2004.

MIRANDA-VILELA A.L.; AKIMOTO, A.K.; ALVES P.C.Z.; PEREIRA, L.C.S.; GONÇALVES, C.A.; KLAUTAU-GUIMARÃES, M.N.; GRISOLIA, C.K. Dietary carotenoid-rich pequi oil reduces plasma lipid peroxidation and DNA damage in runners and evidence for an association with MnSOD genetic variant -Val9Ala. **Genet. Mol. Res.**, v. 8, p. 1481-1495, 2009.

MIRANDA-VILELA, A.L.; PEREIRA, L.C.S. ; GONÇALVES, C.A.; GRISOLIA, C.K. Pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp oil reduces exercise-induced

inflammatory markers and blood pressure of male and female runners. **Nutr. Res.**, v. 29, p. 850-858, 2009.

MITCHINSON, M.J.; BALL, R.Y. Macrophages and atherogenesis. **Lancet**, v. 2, p. 146-148, 1987.

MONAGHAN, P.; METCALFE, N.B.; TORRES, R. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. **Ecol. Lett.**, v. 12, p. 75-92, 2009.

MORAIS, C.S.N.; BARCELOS, M.F.P.; SOUSA, R.V.; LIMA, H.M.; LIMA, A.L. Efeitos das fontes e níveis de lipídios nas dietas de ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) sobre frações lipídicas do sangue. **Ciênc. Agrotec.**, v. 27, n. 5, p. 1082-1088, 2003.

MORENO, J.J. Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW 264.7. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 35, p. 1073-1081, 2003.

NELSON, D.P.; KIESOW, L.A. Enthalphy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solution in the UV). **Anal. Bioch.**, v. 49, p. 474-478, 1972.

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

OHASHI, R.; MU, H.; YAO, Q.; CHEN, C. Cellular and Molecular Mechanisms of Atherosclerosis with Mouse Models. **Trends of Cardiov. Med.**, v.14, n.5, p.187-190, 2004.

OLIVEROS, L.B.; VIDELA, A.M.; RAMIREZ, D.C.; GIMENEZ, M.S. Dietary fat saturation produces lipid modifications in peritoneal macrophages of mouse. **J. Nutr. Bioch.**, v. 14, p. 370-377, 2003.

OTTAVIANO, F.G.; HANDY, D.E.; LOSCALZO, J. Redox regulation in the extracellular environment. **Circ. J.**, v. 72, p. 1-16, 2008.

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

PARTHASARATHY, S.; LITVINOV, D.; SELVARAJAN, K.; GERELNABI, M. Lipid peroxidation and decomposition: Conflicting roles in plaque vulnerability and stability. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1781, p. 221–231, 2008.

PALINSKI, W.; O.R.D, V.; PLUMP, A.S.; BRESLOW, J.L.; STEINBREG, D.; WITZUM, J.L. Apo E-deficient mice are model of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. **Atherosclerosis and Trombosis**, v. 14, p. 605-616, 1994.

PAULA-JUNIOR, W.; ROCHA, F.H.; DONATTI, L.; FADEL-PICHETH, C.M.T.; WEFFORT-SANTOS, A.M. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leaves hydroethanolic extract. **Braz. J. Farmacogn.**, v. 16, p. 625-630, 2006.

PÉREZ-JIMÉNEZ, F.; LÓPEZ-MIRANDA, J.; MATA, P. Protective effect of dietary monounsaturated fat on atherosclerosis: beyond cholesterol. **Atherosclerosis**, v.163, p.385-398, 2002.

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. **Infect Immun.**, v. 72, p. 3571-3576, 2004.

POWERS, S. K., JACKSON, M. J. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. **Physiol. Rev.**, v. 88, p. 1243–1276, 2008.

PUIGGRÓS, C.; CHACÓN, P.; ARMDANS, L.I.; CLAPÉS, J.; PLANAS, M. Effect of oleic-rich and Omega-3-rich diets on serum lipid pattern and oxidation in mildly hypercholesterolemic patients. **Clin. Nutr.**, v. 21, p. 79-87, 2002.

REARDON, C.A.; BLACHOWICZ, L.; GUPTA, G.; LUKENS, J.; NISSENBAUM, M.; GETZ, G.S. Site-specific influence of polyunsaturated fatty acids on atherosclerosis in immune incompetent LDL receptor deficient mice. **Atherosclerosis**, v. 187, p. 325-331, 2006.

RIEGEL, R.E. Metabolismo dos lipídios. In:_____. **Bioquímica**. 3 ed. Unisinos: São Leopoldo, 2001. cap. 7.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; BARATA, R.H.; SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G. Atividade antioxidante de Frutas do Cerrado. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, v. 27, p. 53–60, 2007.

ROESLER, R.; CATHARINO, R.R.; MALTA, L.G.; EBERLIN, M.N; PASTORE, G. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chem.**, n. 110, p. 711-717, 2008.

ROSENSON, R.S. Statins in atherosclerosis: lipid-lowering agents with antioxidant capabilities. **Atherosclerosis**, v. 173, p. 1-12, 2004.

ROSS, R. Cell biology of atherosclerosis. **Annu. Rev. Physiol.**, v.57, p.791-804, 1995.

SABARENSE, C.M. **Avaliação do efeito dos ácidos graxos trans sobre o perfil dos lipídios teciduais de ratos que consumiram diferentes teores de ácidos graxos essenciais.** 2003. 136p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, SP.

SCOTT, J. Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v.14, p. 271-279, 2004.

SHAEFER, E.J.; AUDELIN, M.C.; MCNAMARA, J.R.; SHAH, P.K.; TAYLER, T.; DALY, J.A.; AUGUSTIN, J.L.; SEMAN, L.J.; RUBENSTEIN, J.J. Comparison of Fasting and Postprandial Plasma Lipoproteins in Subjects With and Without Coronary Heart Disease. **Am. J. Cardiol.**, v. 88, p.1129–1133, 2001.

SIEKMEIER, R.; STEFFEN, C.; MÄRZ, W. Role of oxidants and antioxidants in atherosclerosis: results of in vitro and in vivo investigations. **J. Card. Pharm. Ther.**, v. 12, p. 265-282, 2007.

SILVA, M.A.M.; BARCELOS, M.F.P.; SOUSA, R.V.; LIMA, H.M.; FALCO, I.R.; LIMA, A.L.; PEREIRA, M.C.A. Efeito das fibras dos farelos de trigo e aveia sobre o perfil lipídico no sangue de ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar. **Ciênc. Agrotec.**, v. 27, n. 6, p. 1321-1329, 2003.

SILVA, L.D.; NASCIMENTO, V.; SANTOS, S.C.; MORAIS, J.O.R.; SOBÓIA MORAIS, S.M.T. Análise morfológica das células de cloro de *Poecilia vivípara* expostas a frações de folhas e da casca do caule de *Caryocar brasiliense*. **Acta. Scienc.**, v. 25, n. 1, p. 195-201, 2003.

SMOOK, M.L.F.; LEEUWEN, M.V.; HEERINGA, P.; DAMOISEAUX, J.G.M.C.; THEUNISSEN, R.; DAEMEN, M.J.A.P.; LUTGENS, E.; TERVAERT, J.W.C. Anti-oxLDL antibody isotypes levels, as potential markers for progressive atherosclerosis in APOE^{-/-} and APOE^{-/-}CD40L^{-/-} mice. **Clin. Exper. Immunol.**, v. 154, p. 264-269, 2008.

STEFFENS, S.; MACH, F. Inflammation and atherosclerosis. **Herz**, v. 29, p. 741-748, 2004.

TRACHOOTHAM, D.; LU, W.; OGASAWARA, M.A.; VALLE, N.R.D.; HUANG, P. Redox Regulation of Cell Survival. **Antioxid. Redox. Signal.**, v. 10, n. 8, p. 1343-1374, 2008.

TRAUTWEIN, E.A.; KUNATH-RAU, A.; DIETRICH, J.; DRUSCH, S.; ERBERSDOBLER, H.F. Effect of dietary fat rich in lauric, myristic, palmitic, oleic or linoleic acid on plasma, hepatic and biliary lipids in cholesterol-fed hamster. **Brit. J. Nutr.**, v. 77, p. 605-620, 1997.

TUOMINEN, A.; MILLER, Y.I.; HANSEN, L.F.; KESÄNIEMI, Y.A.; WITZTUM, J.L.; HÖRKKÖ, S. A natural antibody to oxidized cardiolipin binds to oxidized low-density lipoprotein, apoptotic cell, and atherosclerotic lesion. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 26, p. 2096-2102, 2006.


VANDERLAAN, P.A.; REARDON, C.A.; GETZ, G.S. Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 24, p. 12-22, 2003.

WALLIN, B.; ROSENGREN, B.; SHERTZER, H.G.; CAMEJO, G. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. **Anal. Biochem.**, v. 208, p. 10-5, 1993.

WALRAND, S.; FARGES, M.C.; DEHAESE, O.; CARDINAULT, N.; MINET-QUINARD, R.; GROLIER, P.; DEMANGE, C.B.; RIBALTA, J.; ROOB, B.M.W.; ROCK, E.; VASSON, M.P. In vivo and in vitro evidences that carotenoids could modulate the neutrophil respiratory burst during dietary manipulation. **Eur. J. Nutr.**, v. 44, p. 114-120, 2005.

WOLFSON, M.; SHINWELL, E.S.; ZVILLICH, M.; RAGER-ZISMAN, B. Inhibitory effect of retinoic acid on the respiratory burst of adult and cordon blood neutrophils and macrophages: potential implication to bronchopulmonary dysplasia. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 72, p. 505–509, 1988.

Anexo A- Parecer do Comitê de Ética em experimentação animal



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- CETEA -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 225/2008**, relativo ao projeto intitulado "**Efeito do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense Camb.*) no metabolismo lipídico e aterosclerose em camundongos rLDL-/-**", que tem como responsável(is) **Jacqueline Isaura Alvarez Leite**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **26/ 11/2008**.

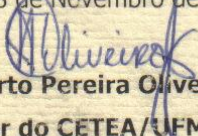
Este certificado expira-se em **26/ 11/ 2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 225/2008**, related to the project entitled "**Effect of pequi (*Caryocar brasiliense Camb.*) oil in lipid metabolism and atherosclerosis in mice rLDL-/-**", under the supervisors of **Jacqueline Isaura Alvarez Leite**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **November 26, 2008**.

This certificate expires in **November 26, 2013**.

Belo Horizonte, 28 de Novembro de 2008.


Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)