

TATIANNA LEMOS JASCOLKA

**Efeitos do Quefir no Perfil Lipídico, Estresse
Oxidativo e Aterosclerose de Camundongos
Deficientes em Apolipoproteína E**

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2010**

TATIANNALAMOS JASCOLKA

Efeitos do Quefir no Perfil Lipídico, Estresse Oxidativo e Aterosclerose de Camundongos Deficientes em Apolipoproteína E

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a Jacqueline I. Alvarez Leite

Co- orientador: Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2010**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS - PPGCA

TATIANNALEMOS JASCOLKA

**“EFEITOS DO QUEFIR NO PERFIL LIPÍDICO, ESTRESSE
OXIDATIVO E ATROSCLEROSE DE CAMUNDONGOS
DEFICIENTES EM APOLIPOPROTEÍNA E”**

APROVADA EM 26 DE MARÇO DE 2010

COMISSÃO EXAMINADORA

Dirce Oliveira
Profa. Dra. DIRCE RIBEIRO DE OLIVEIRA

Evelyn de S. Oliveira Lopes
Profa. Dra. EVELYN DE SOUZA OLIVEIRA LOPES

Jacques Robert Nicoli
Prof. Dr. JACQUES ROBERT NICOLI

Jacqueline Isaura Alvarez Leite
Profa. Dra. JACQUELINE ISAUARA ALVAREZ LEITE
Orientadora

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças para realizar este trabalho.

À professora Jacqueline I. Alvarez Leite, pela excelente orientação, por me proporcionar esse valioso aprendizado e, especialmente, pela sensibilidade em aceitar meus horários “confusos”.

Ao professor Jacques R. Nicoli, pela co-orientação, sempre com boa vontade em me auxiliar.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, pela contribuição em minha formação científica. E aos funcionários, pelo serviço prestado.

À Maria Helena, por cuidar com tanto zelo dos camundongos.

Aos colaboradores deste trabalho:

- Ivana C. Raimundo, pela doação dos grãos de quefir e disponibilidade em sanar minhas dúvidas;

- Lílian G. Teixeira e Edenil C. Aguiar, pela ajuda em todas as fases deste trabalho, apoio nos momentos difíceis e amizade. Vocês foram essenciais nesses dois anos!

- Priscilla Ceci, por toda dedicação ao trabalho, amizade e excelente convivência;

- Raphaella Puccetti, pelas análises de micro e conversas sobre o quefir, sempre com disposição em me ajudar;

- Nathália Beltrão, por sua boa vontade, pela valiosa ajuda nas análises finais do estudo;

- Rafael Matoso, pela ajuda nos momentos críticos finais e por alegrar nosso laboratório.

Às queridas “novatas”, Fabíola, Laila, Solange e Talita, por dividir a ansiedade e expectativas da nova etapa.

Aos amigos do LABiN, uma segunda família, pelo companheirismo, pelos mutirões de sacrifício, pelo auxílio nas análises, pelas conversas, pelos momentos de alegria e diversão.

À Juliana, Analina, Tatiana Ramos, Luciana e Ana Cecília, pelos ensinamentos das técnicas e pela amizade.

Aos outros laboratórios do ICB, fundamentais para concretização do trabalho; agradeço especialmente ao Jamil, Eneida, prof^a Janetti, prof. Cândido, Zélia e Daniel.

À Fátima, por cultivar os grãos de quefir com tanto cuidado.

Aos colegas da Petrobrás, pelo apoio.

A todos os meus amigos, pela torcida.

A minha família (Mamãe, Dri e Philipe), pelo incentivo, paciência e compreensão nos momentos de estresse, cansaço e silêncio.

Ao meu amor André, por participar de cada passo dessa caminhada, pela paciência e auxílio.

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

*Façamos da interrupção um
caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro.”*

Fernando Sabino

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE SIGLAS.....	xii
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
I INTRODUÇÃO	20
1.1 OBJETIVOS	22
1.1.1 Objetivo Geral.....	22
1.1.2 Objetivos Específicos	22
II REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1 O Quefir	25
2.1.1 Grãos de Quefir	26
2.1.2 Estudos com o Quefir	28
2.2 Metabolismo Lipídico	30
2.3 Aterosclerose	33
2.4 Estresse Oxidativo	37
2.4.1 Espécies Reativas de Oxigênio.....	38
2.4.2 Estresse Oxidativo e Aterosclerose.....	40
2.4.3 Sistemas de Defesa Antioxidante.....	42
2.5 Modelos Murinos de Aterosclerose	43
III MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 Preparação do Quefir.....	46
3.2 Contagem Total de Microorganismos no Quefir.....	47
3.2.1 Contagem de Bactérias Ácido Lácticas	47
3.2.2 Contagem de Leveduras	47
3.3 Animais	47
3.4 Delineamento Experimental	48
3.5 Controle Ponderal, Alimentar e Líquido	49
3.6 Amostras de Sangue e Tecidos	49
3.7 Avaliação do Perfil Lipídico e Glicemia	50
3.7.1 Determinação dos Níveis de Colesterol Total	50

3.7.2	Determinação dos Níveis de HDL- colesterol.....	51
3.7.3	Determinação da Fração Aterogênica e do Índice Aterogênico	51
3.7.4	Determinação dos Níveis de Triglicerídeos	51
3.7.5	Determinação dos Lipídeos Totais, Colesterol Total e Triglicerídeos Hepáticos e Cecais	52
3.7.6	Determinação da Glicemia	52
3.8	Avaliação do Estresse Oxidativo.....	53
3.8.1	Avaliação da Peroxidação Lipídica por TBARS.....	53
3.8.2	Dosagem da Concentração de Hidroperóxidos	54
3.8.3	Atividade da Enzima Catalase.....	55
3.8.4	Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD).....	55
3.8.5	Dosagem de Anticorpos Anti-LDL oxidada.....	56
3.9	Avaliação do Desenvolvimento da Aterosclerose	57
3.9.1	Área de Lesão na Aorta Torácica e Abdominal	57
3.9.2	Histologia da Válvula Aórtica	58
3.9.3	Imunohistoquímica para Macrófagos.....	59
3.10	Análises Estatísticas	59
IV	RESULTADOS.....	61
4.1	Contagem Total de BAL e Leveduras no Quefir	62
4.2	Ingestão Dietética e de Líquido.....	62
4.3	Evolução Ponderal	63
4.4	Efeito do Quefir no Metabolismo Lipídico e Glicemia.....	63
4.4.1	Perfil Lipídico Sérico.....	64
4.4.2	Perfil Lipídico Hepático e Cecal.....	64
4.4.3	Glicemia	65
4.5	Efeito do Quefir no Estresse Oxidativo	66
4.5.1	TBARS em Tecido Hepático e Renal	66
4.5.2	Hidroperóxidos em Tecido Hepático e Renal	66
4.5.3	Enzimas Antioxidantes em Tecido Hepático e Renal	67
4.5.4	Anticorpos Anti-LDL oxidada Séricos	69
4.6	Efeito do Quefir no Desenvolvimento da Aterosclerose	69
4.6.1	Área da Lesão Aterosclerótica na Aorta Torácica e Abdominal	69
4.6.2	Área da Lesão Aterosclerótica na Raiz Aórtica	70
4.6.3	Imunohistoquímica para Macrófagos.....	70
V	DISCUSSÃO	72

VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
VII ANEXO.....	92
Anexo A – Dieta LABINA	93
VIII APÊNDICE	94
Apêndice A – Resultados do Experimento com Animais LDLr ^{-/-}	95
A.1 Animais e Grupos.....	95
A.2 Resultados	96
A.2.1 Ingestão Dietética, de Líquido e Evolução ponderal.....	96
A.2.2 Perfil Lipídico Sérico	97
A.2.3 Perfil Lipídico Hepático e Cecal.....	98
A.2.4 Glicemia	99
A.2.5 TBARS em Tecido Hepático e Renal	99
A.2.6 Hidroperóxidos em Tecido Hepático e Renal	100
A.2.7 Área da Lesão Aterosclerótica na Aorta Torácica e Abdominal	100
A.2.8 Área da Lesão Aterosclerótica na Raiz Aórtica	101
A.2.9 Imunohistoquímica para Macrófagos.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Microorganismos predominantes nos grãos de quefir utilizados no estudo.	46
Tabela 2 - Composição centesimal das dieta comercial	49
Tabela 3 - Contagem total de microorganismos (BAL e leveduras) na amostra de quefir utilizada no estudo.....	62
Tabela 4 - Ingestão dietética e de líquido (água ou quefir) diária por animal.	63
Tabela 5 - Perfil lipídico sérico após 4 semanas de camundongos APOE ^{-/-} alimentados com dieta comercial, recebendo quefir ou água.	64
Tabela 6 - Perfil lipídico hepático e cecal de camundongos APOE ^{-/-} alimentados com dieta comercial, recebendo quefir ou água por 4 semanas.	65
Tabela 7 - Ingredientes da dieta ocidental	95
Tabela 8 - Composição centesimal da dieta ocidental	96
Tabela 9 - Ingestão dietética e de líquido (água ou quefir) diária por animal.	96
Tabela 10 - Perfil lipídico sérico, após 6 semanas, de camundongos LDLr ^{-/-} alimentados com dieta ocidental, recebendo quefir ou água.	98
Tabela 11 - Perfil lipídico hepático e cecal de camundongos LDLr ^{-/-} alimentados com dieta ocidental, recebendo quefir ou água por 6 semanas.	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeitos dos probióticos no metabolismo.	26
Figura 2: Microscopia eletrônica de grãos de quefir.. . . .	27
Figura 3: Grãos de Quefir cultivados em leite e água açucarada.	27
Figura 4: Metabolismo de Lipoproteínas.....	33
Figura 5: Eventos iniciais no desenvolvimento da aterosclerose.....	36
Figura 6: Composição celular da placa aterosclerótica.. . . .	37
Figura 7: Ânion superóxido e seus derivados	38
Figura 8: Fisiopatologia do estresse oxidativo e DCVs.....	41
Figura 9: Evolução ponderal de camundongos APOE ^{-/-} alimentados com dieta comercial, recebendo quefir ou água por 4 semanas.	63
Figura 10: Glicemia após 4 semanas de camundongos APOE ^{-/-} alimentados com dieta comercial, recebendo quefir ou água.	65
Figura 11: Peroxidação lipídica avaliada pela dosagem de TBARS em fígado (A) e rim (B) de camundongos APOE ^{-/-} alimentados com dieta comercial, recebendo quefir ou água por 4 semanas.	66
Figura 12: Avaliação do estresse oxidativo pela concentração de Hidroperóxidos em camundongos APOE ^{-/-} alimentados com dieta comercial, recebendo quefir ou água por 4 semanas.	67
Figura 13: Atividade da enzima antioxidante Superóxido dismutase (SOD) em tecido hepático de camundongos APOE ^{-/-} alimentados com dieta comercial, recebendo quefir ou água por 4 semanas.	68
Figura 14: Atividade da enzima antioxidante Catalase em fígado (A) e rim (B) de camundongos APOE ^{-/-} alimentados com dieta comercial, recebendo quefir ou água por 4 semanas.	68
Figura 15: Imunoglobulinas anti-LDL oxidada no soro de camundongos APOE ^{-/-} alimentados com dieta comercial por 4 semanas.	69
Figura 16: Área de lesão nas aortas torácica e abdominal dos camundongos ApoE ^{-/-} alimentados com dieta comercial, recebendo quefir ou água, após 4 semanas.	69
Figura 17: Área de lesão aterosclerótica na válvula aórtica de camundongos ApoE ^{-/-} alimentados com dieta comercial, recebendo quefir ou água por 4 semanas.	70
Figura 18: Imunohistoquímica para macrófagos na placa aterosclerótica da válvula aórtica em camundongos ApoE ^{-/-} alimentados com dieta comercial, recebendo quefir ou água por 4 semanas.	71
Figura 19: Evolução ponderal de camundongos LDLr ^{-/-} alimentados com dieta ocidental, recebendo quefir ou água por 6 semanas.	97
Figura 20: Glicemia após 6 semanas de camundongos LDLr ^{-/-} alimentados com dieta ocidental, recebendo quefir ou água.	99
Figura 21: Dosagem de TBARS em camundongos LDLr ^{-/-} alimentados com dieta ocidental, recebendo quefir ou água por 6 semanas.	99
Figura 22: Avaliação do estresse oxidativo pela concentração de Hidroperóxidos em camundongos LDLr ^{-/-} alimentados com dieta ocidental, recebendo quefir ou água por 6 semanas.	100

Figura 23: Área de lesão nas aortas torácica e abdominal dos camundongos LDLr ^{-/-} alimentados com dieta ocidental, recebendo quefir ou água, após 6 semanas.	100
Figura 24: Área de lesão aterosclerótica na válvula aórtica de camundongos LDLr ^{-/-} alimentados com dieta ocidental, recebendo quefir ou água por 6 semanas.	101
Figura 25: Área de macrófagos na placa aterosclerótica da válvula aórtica (imunohistoquímica) em camundongos LDLr ^{-/-} alimentados com dieta ocidental, recebendo quefir ou água por 6 semanas.	101

LISTA DE SIGLAS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μm^2	Micrômetro ao quadrado
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
$\mu\text{mol/g}$	Micromol por grama
$\mu\text{mol/L}$	Micromol por litro
μM	Micro molar
$^{\circ}\text{C}$	Grau centígrado
$\Delta\text{E}/\text{min}/\text{mg}$	Varição de energia por minuto por miligrama de proteína
ABCA-1	Cassete de transporte -1 ligado a adenosina trifosfato - A
ABCG-1	Cassete de transporte -1 ligado a adenosina trifosfato - G
Abs	Absorbância
Abs/min	Absorbância por minuto
ACAT	Acil- CoA colesterol aciltransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Apo- A1	Apolipoproteína A1
Apo-B	Apolipoproteína B
Apo-C	Apolipoproteína C
Apo-E	Apolipoproteína E
Apo-E ^{-/-}	Deficiente de apolipoproteína E
BAL	Bactérias ácido- lácticas
BHT	Butil hidroxitolueno
BSA	Soro de albumina bovina
CETEA	Comitê de Ética de Experimentação Animal
CETP	Proteína de transferência de éster de colesterol
cm	Centímetro
CMLV	Célula muscular lisa vascular
Co-A	Coenzima A

CO ₂	Dióxido de carbono
Cu ²⁺	Íon cuproso
CuCl ₂	Cloreto de cobre
CuZnSOD	Superóxido dismutase com cobre e zinco como cofatores
CVDs	<i>Cardiovascular diseases</i>
DCVs	Doenças cardiovasculares
DPPH	Capacidade de sequestro de radicais livres
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ecSOD	Superóxido dismutase extra celular
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
Fe ²⁺	Íon ferroso
Fe ³⁺	Íon férrico
FOX	Solução de xilenol orange e sulfato ferroso
g	Gramas
g/L	Gramas por litro
GSH	Glutathiona reduzida
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HE	Hematoxilina- eosina
HMG-CoA	Hidroximetilglutaril- CoA
HOCl	Hiperclorito

HRP	Anticorpo secundário de cabra anti-rato IgG
ICAM- 1	Molécula- 1 de adesão intercelular
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IFN-γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
iNOS	Óxido nítrico sintase indutível
KBr	Brometo de potássio
kcal	Quilocalorias
kcal/g	Quilocalorias por grama
Kg	Quilogramas
Kg/m ²	Quilogramas por metro ao quadrado
LCAT	Lecitina: colesterol aciltransferase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLr ^{-/-}	Deficiente do receptor de lipoproteína de baixa densidade
LDLmm	Lipoproteína de baixa densidade minimamente oxidada
LDLox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LXR	Receptor X do fígado
M	Molar (mol por litro)
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MDA	Malondialdeído
MG	Minas Gerais
mg	Miligrama
mg/dL	Miligrama por decilitro
mg/kg	Miligramas por quilograma de peso

mg/L	Miligramas por litro
mL	Mililitros
mM	Mili molar
mmol/L	Milimol por litro
MMP	Metaloproteinase de matriz
MnSOD	Superóxido dismutase com manganês como cofator
mol/L	Mol por litro
MOMA	Anticorpo primário de rato anti- macrófagos de camundongo
MPO	Mieloperoxidase
MTT	Brometo de dimetiltiazol-difeniltetrazolium
n	Tamanho amostral
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NGS	Soro normal de cabra
NKT	Célula <i>natural killer</i>
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NOx	Oxidases dependentes de NADPH
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OCT	<i>Jung Tissue Freezing Medium</i>
OH ⁻	Radical hidroxila

ONOO ⁻	Peroxinitrito
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPD	ortofenileno-diamino
p	Nível de significância
p/v	Peso por volume
PBS	Salina tamponada com fosfato
PECAM-1	Molécula- 1 de adesão celular plaqueta-endotélio
PLTP	Proteína de transferência fosfolipídica
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
QM	Quilomícron
rpm	Rotações por minuto
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TG	Triglicerídeos
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TPP	Trifenilfosfina
U	Unidade
U.A.	Unidades arbitrárias
UFC	Unidade formadora de colônia
UFC/g	Unidade formadora de colônia por grama
UFC/mL	Unidade formadora de colônia por mililitro
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

U/mg	Unidades por miligrama
UNIFENAS	Universidade José do Rosário Velano
VCAM-1	Molécula- 1 de adesão vascular
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
v/v	Volume por volume
WHO	<i>World Health Organization</i>

RESUMO

A busca por medidas de prevenção e controle para a aterosclerose, bem como para seus fatores de risco, possui grande relevância clínica, pelo fato dessa ser a principal causa das doenças cardiovasculares (DCVs). Com isso, há grande interesse em se identificar compostos naturais que atuem como agentes protetores. Nesse contexto, o quefir, uma bebida fermentada pela ação dos grãos de quefir (mistura de bactérias e leveduras agrupadas em uma matriz polissacarídea), foi o objeto deste estudo, por possuir alegações populares de vários benefícios à saúde, algumas já relatadas na literatura. O presente estudo investigou os efeitos do quefir aquoso (em solução de açúcar mascavo), uma forma popularmente consumida, no desenvolvimento da aterosclerose e em seus fatores de risco (metabolismo lipídico e estresse oxidativo). Para isso, a bebida preparada de forma caseira foi administrada a camundongos APOE^{-/-} alimentados com dieta comercial, por 4 semanas. Os animais foram divididos em grupo Controle e grupo Quefir, que recebeu o quefir (fermentado de 50g de grãos de quefir/ 1L de solução de açúcar mascavo) em substituição à água. A ingestão do quefir foi capaz de aumentar os níveis séricos de HDL, acarretando na redução do índice aterogênico. Além disso, o quefir promoveu redução dos triglicerídeos séricos e houve uma tendência a aumento desses no fígado. A peroxidação lipídica e a atividade da enzima catalase no fígado apresentaram-se reduzidas no grupo Quefir. Em contrapartida, o quefir não interferiu na concentração sérica de anticorpos anti-LDL oxidada dos ApoE^{-/-}, medida indireta da oxidação de LDL. No desenvolvimento da placa aterosclerótica, as áreas de lesão na válvula aórtica e na aorta abdominal e torácica foram semelhantes entre os grupos. As lesões apresentaram grande acúmulo de macrófagos, mostrado por imunohistoquímica, mas também semelhantes em porcentagem de área entre os grupos. Assim, os resultados apresentados nos levam a concluir que, embora alguns fatores de risco para a aterosclerose apresentaram melhora com a ingestão de quefir por 4 semanas, este efeito não foi de intensidade suficiente para alterar o curso da doença na raiz da válvula ou na aorta especificamente.

Palavras-chave: Quefir; aterosclerose; perfil lipídico; estresse oxidativo.

ABSTRACT

EFFECT OF KEFIR ON LIPID PROFILE, OXIDATIVE STRESS AND ATHEROSCLEROSIS IN APOLIPOPROTEIN E KNOCKOUT MICE

The search for prevention and control for atherosclerosis, as well as its risk factors, has great clinical relevance, because this is the main cause of cardiovascular diseases (CVDs). Thus, there is a strong effort to identify natural compounds that act as protective agents. In this context, kefir, a fermented drink generated by the action of kefir grains (a mixture of bacteria and yeasts grouped in a polysaccharide matrix), was the object of study, since popular consumption claims several health benefits, some already reported in the literature. The present study investigated the effects of aqueous kefir (solution of brown sugar), a form commonly consumed, in the development of atherosclerosis and its risk factors (lipid metabolism and oxidative stress). For this, kefir was administered to ApoE^{-/-} mice, fed by a commercial diet, for 4 weeks. The animals were divided into Control group and Kefir group, which received kefir (50g kefir grains / 1L brown sugar's solution) to replace the water. Ingestion of kefir was able to increase serum levels of HDL, resulting in lower atherogenic index. In addition, kefir promoted reduction of serum triglycerides and increasing those in the liver. Lipid peroxidation and catalase activity in the liver was decreased in the Kefir group. In contrast, the kefir did not affect the serum concentration of anti-oxidized LDL in ApoE^{-/-}, indirect measurement of LDL oxidation. The areas of atherosclerotic lesions in the aortic valve and thoracic and abdominal aorta were similar between groups. The lesions showed a large accumulation of macrophages, shown by immunohistochemistry, but also with a similar percentage area between the groups. Thus, the results lead us to conclude that although some risk factors for atherosclerosis improved with the ingestion of kefir for 4 weeks, this effect was not strong enough to alter the disease's course at the root of the aortic valve or at the aortic specifically.

Keywords: Kefir; atherosclerosis; lipid profile; oxidative stress.

I INTRODUÇÃO

A aterosclerose é uma doença vascular inflamatória crônica e multifatorial que acomete as médias e grandes artérias. Tem sido intensamente estudada por ser a principal causa das doenças cardiovasculares (DCVs), e, conseqüentemente, de morbidade e mortalidade nos países ocidentais (LOSCALZO, 2005; RADER & DAUGHERTY, 2008). As doenças cardiovasculares constituem um grupo de doenças do coração e vasos sanguíneos que incluem hipertensão, doença coronariana, doença cerebrovascular, doença vascular periférica, doença reumática do coração, insuficiência cardíaca, doenças congênitas do coração e cardiomiopatias. Dados da Organização Mundial de Saúde mostram que, em 2005, 30% dos óbitos em todo mundo foram decorrentes de DCVs, sendo que 80% desses óbitos ocorreram em países em desenvolvimento (WHO, 2008).

O curso da aterosclerose envolve a formação de lesões nas artérias que são caracterizadas por inflamação, acúmulo de lipídeos, células mortas e fibrose (HANSSON & LIBBY, 2006). Assim, essa patologia é induzida por distúrbios do metabolismo lipídico, do sistema imunológico e coagulação sanguínea, tendo como principais fatores de risco a hipercolesterolemia, hipertensão arterial, diabetes, história familiar, idade, tabagismo, sedentarismo e obesidade (ALVAREZ-LEITE et al., 2003; SCOTT, 2004).

A busca por medidas de prevenção e controle da aterosclerose é crescente, tanto pelo uso de drogas quanto por mudanças ambientais, incluindo as dietéticas. Nesse contexto, alimentos que possam atenuar a dislipidemia, reduzir o estresse oxidativo, assim como retardar o desenvolvimento da placa aterosclerótica, são de grande interesse.

O quefir (*kefir*), conhecido há milhares de anos, é uma bebida fermentada pelos grãos de quefir, que constituem uma mistura complexa de bactérias e leveduras encapsuladas em uma matriz polissacarídea. Essa bebida é levemente gasosa, ácida e alcoólica (FARNWORTH, 2005; LOPITZ-OTSOA et al., 2006; SARKAR, 2007). Segundo GARROTE (1997), o quefir originou-se nas montanhas Caucásicas da Ásia, Tibet e Mongólia e se tornou popular em vários países da Europa. Atualmente, é consumido em todo mundo e pode ser preparado, de forma caseira, a partir da cultura fresca. Historicamente, os grãos de quefir eram um presente de *Allah* ao povo caucasiano, transmitidos de geração para geração como uma riqueza de família (LOPITZ-OTSOA et al., 2006).

Nos grãos de quefir podem estar presentes várias espécies de bactérias (gêneros *Lactobacillus*, *Lactococci*, *Leuconostocs* e *Acetobacter*), e leveduras (gêneros

Kluyveromyces, Candida, Torula, Saccharomyces) (ÖTLES & CADINGI, 2003), que coexistem numa associação simbiótica (LOPITZ-OTSOA et al., 2006).

O quefir preparado pela fermentação dos grãos de quefir em solução aquosa de açúcar mascavo é uma forma bastante consumida pela população brasileira, mas suas propriedades funcionais ainda são pouco relatadas na literatura. A maioria dos estudos utiliza o quefir tradicional, fermentado em leite (FARNWORTH, 2005; LOPITZ-OTSOA et al., 2006; SARKAR, 2007).

De um modo geral, há estudos mostrando os efeitos do quefir na regulação do trato gastrointestinal, na intolerância à lactose, na proteção ao câncer, nas atividades: antimicrobiana, antioxidante, imunomodulatória, antiinflamatória, cicatrizante, hipocolesterolêmica, entre outras (FARNWORTH, 2005; LOPITZ-OTSOA et al., 2006; SARKAR, 2007). Contudo, estudos que reportaram o efeito hipocolesterolêmico do quefir ainda não são conclusivos (TAMAI et al., 1996; St-ONGE et al., 2002; LIU et al., 2006).

Não há trabalhos específicos na literatura sobre o papel do quefir na aterosclerose, em que a hipercolesterolemia e o estresse oxidativo são importantes fatores de risco. Dessa forma, o presente estudo se propôs a investigar os efeitos do quefir aquoso (em solução de açúcar mascavo) na aterogênese.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos do quefir (em solução de açúcar mascavo) no metabolismo lipídico, estresse oxidativo e desenvolvimento da aterosclerose em camundongos ApoE^{-/-}.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Realizar contagem total de bactérias ácido- lácticas (BAL) e leveduras no quefir preparado para o estudo;
- Avaliar a ingestão do quefir e de dieta, bem como a evolução ponderal, dos camundongos ApoE^{-/-};

- Avaliar o efeito do quefir no perfil lipídico sérico (colesterol total, HDL, fração aterogênica e triglicerídeos) dos ApoE^{-/-};
- Verificar se a glicemia dos animais foi influenciada pelo consumo do quefir;
- Avaliar o efeito do quefir no perfil lipídico hepático e cecal;
- Avaliar o efeito da administração do quefir no estresse oxidativo, pela peroxidação lipídica (fígado e rim), atividade de enzimas antioxidantes e oxidação de LDL no soro;
- Avaliar o efeito da ingestão do quefir sobre a formação e composição de placas ateroscleróticas, pela análise morfométrica da lesão na válvula aórtica e nas aortas abdominal e torácica;
- Caracterizar a placa aterosclerótica na válvula aórtica quanto ao infiltrado de macrófagos.

II REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Quefir

Quefir (ou *kefir*) é uma bebida fermentada pela ação de bactérias e leveduras que estão associadas simbioticamente nos chamados grãos de quefir (FARNWORTH, 2005; LOPITZ-OTSOA et al., 2006; SARKAR, 2007). A bebida parece ter origem nas montanhas Caucasianas da Ásia e traz promessas de vários benefícios para a saúde. A palavra “kefir” é originária do eslavo *keif*, que significa “bem-estar” ou “bem-viver” (ÖTLES & CADINGI, 2003; LOPITZ-OTSOA et al., 2006; SARKAR, 2007).

O quefir é produzido tradicionalmente a partir do leite (FARNWORTH, 2005; LOPITZ-OTSOA et al., 2006), mas também pode ser fermentado em água açucarada, suco de frutas (SALOFF-COSTE, 1986; SCHNEEDORF & ANFITEATRO, 2004) ou leite de soja (LIU et al., 2006). O quefir em água açucarada tem sido amplamente consumido pela população, no entanto, as propriedades funcionais do produto fermentado no meio aquoso ainda são pouco relatadas na literatura (MOREIRA et al., 2008). Nesse caso, utiliza-se principalmente o açúcar mascavo, mel ou rapadura como o nutriente para o cultivo dos grãos de quefir na água. A bebida fermentada aquosa é conhecida popularmente por “quefir aquoso”, “tibico” ou “tibi”.

No Brasil, o quefir é consumido como um produto da cultura popular, embora a literatura já contemple efeitos probióticos relacionados à sua utilização (SCHNEEDORF & ANFITEATRO, 2004). Não existe no mercado brasileiro esse produto industrializado, e, atualmente, sua produção é caseira, sendo que os grãos de quefir são doados por seus usuários, pois se multiplicam rapidamente à medida que são cultivados. A bebida pronta para consumo contém: ácidos láctico, fórmico, succínico e propiônico; CO₂; etanol; diferentes aldeídos; e traços de álcool isoamílico e acetona (GUZEL-SEYDIM et al., 2000). As concentrações de vitaminas B₁, B₁₂, K e ácido fólico, bem como de cálcio e aminoácidos também são elevadas durante a fermentação do quefir (ÖTLES & CADINGI, 2003). Esses compostos formados durante a fermentação conferem ao quefir o sabor levemente ácido, gasoso e alcoólico (FARNWORTH, 2005; LOPITZ-OTSOA et al., 2006).

Na literatura, o quefir é considerado um probiótico natural (FARNWORTH, 2005; LOPITZ-OTSOA et al., 2006; SARKAR, 2007). Probióticos são definidos como microorganismos vivos que, quando consumidos em quantidade adequada, conferem benefícios à saúde do indivíduo, complementares à nutrição básica (FAO/WHO, 2002). De acordo com FARNWORTH (2005), os efeitos benéficos dos probióticos podem ser provenientes de três mecanismos distintos (Figura 1): efeito direto dos microrganismos;

efeitos indiretos dos metabólitos produzidos durante a fermentação desses microrganismos (incluindo antibióticos e bactericidas); ou por meio dos produtos gerados na quebra da matriz alimentar, tais como peptídeos. As três vias influenciam no aumento da população microbiana intestinal, bem como no metabolismo e sistema imunológico do indivíduo.

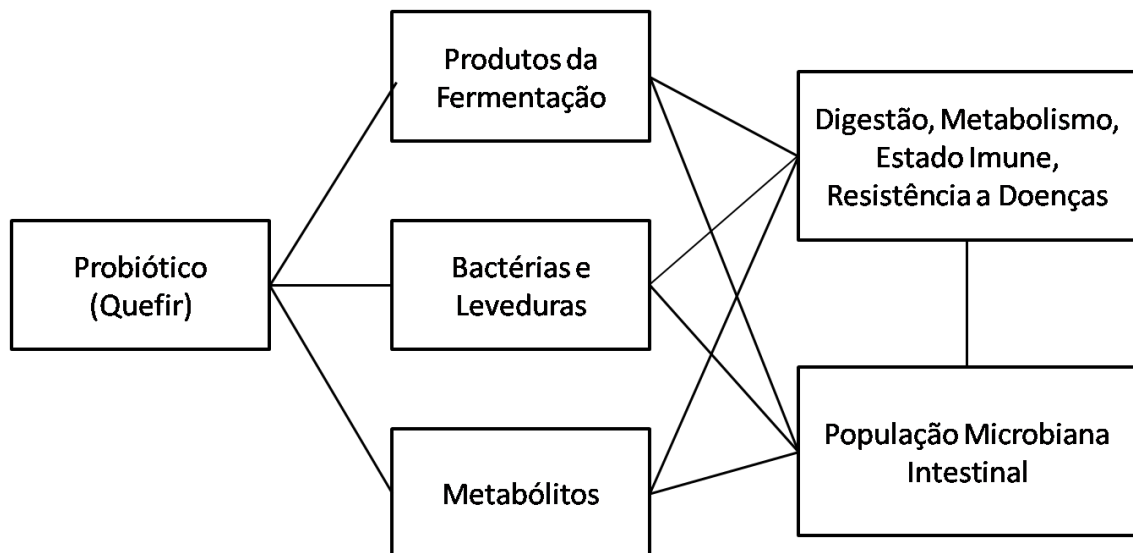


Figura 1: Efeitos dos probióticos no metabolismo. Adaptado de FARNWORTH, 2005.

2.1.1 Grãos de Quefir

Microscopicamente, os grãos de quefir são um conjunto complexo de várias cepas de bactérias e leveduras, encapsuladas por uma trama de polissacarídeos insolúveis que são secretados por algumas cepas. No caso da cultura láctea, o polissacarídeo predominante é denominado quefirano (*kefirano*). A Figura 2 apresenta uma microscopia eletrônica de varredura de grãos de quefir, mostrando na parte interna dos grãos, os *Lactobacillus* (longos e curvos), leveduras e material fibrilar; e na superfície externa, *Lactobacillus* curtos e leveduras (ZHOU et al., 2009).

Macroscopicamente, esses grãos são irregulares, de consistência gelatinosa e sua coloração é dependente do substrato utilizado para cultivo (SCHNEEDORF & ANFITEATRO, 2004; FARNWORTH, 2005). Os grãos são amarelo claro e opacos quando cultivados em leite; pardos e vítreos, se cultivados em açúcar mascavo; ou purpúreos, se cultivados em suco de uva (GUZEL-SEYDIM et al., 2000). A Figura 3 ilustra grãos de quefir cultivados em água açucarada e em leite.

A microflora dominante encontrada em grãos de quefir apresenta bactérias dos gêneros *Lactobacillus* sp, *Lactococcus* sp, *Leuconostocs* sp, *Acetobacter* sp,

Streptococcus sp, e leveduras dos gêneros *Kluyveromyces* sp, *Candida* sp, *Torula* sp, *Saccharomyces* sp (ÂNGULO et al., 1993; SCHNEEDORF & ANFITEATRO, 2004). A composição da população microbiana pode variar muito entre diferentes grãos de quefir, dependendo de sua origem e meio de cultivo.

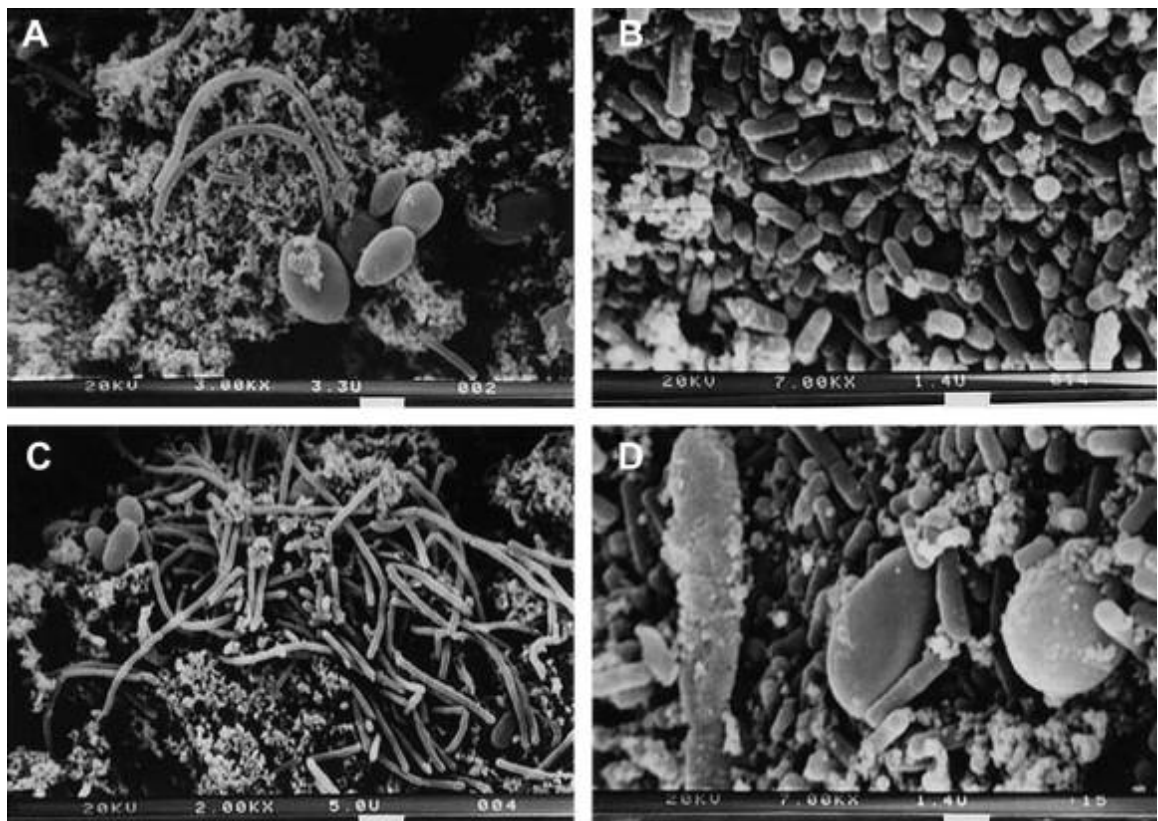


Figura 2: Microscopia eletrônica de grãos de quefir. ZHOU et al., 2009.
(A, C) Superfície interna do grão de quefir. (B, D) Superfície externa do grão de quefir.

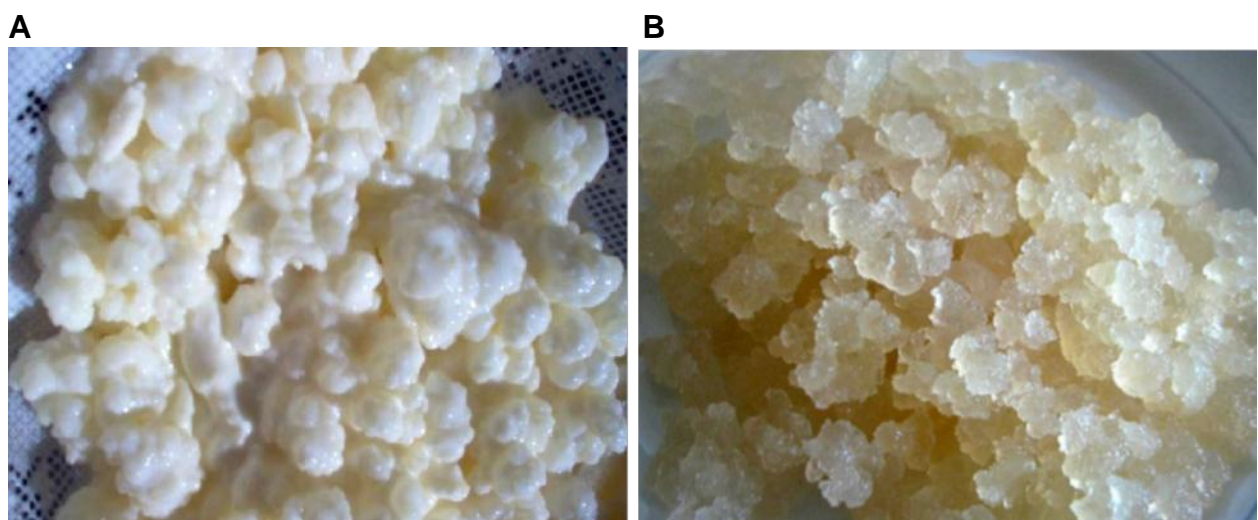


Figura 3: Grãos de Quefir cultivados em leite (A) e água açucarada (B). www.kefir.com.br

2.1.2 Estudos com o Quefir

Nas últimas décadas, diversos estudos têm investigado as propriedades funcionais do quefir e seus grãos, e atualmente de metabólitos produzidos durante sua fermentação. A grande maioria dos estudos utiliza o quefir fermentado em leite (quefir-leite), sendo a pesquisa do quefir aquoso (em solução de açúcar mascavo) bem recente.

Na literatura, há trabalhos reportando efeitos benéficos do quefir-leite: na atividade antitumoral (HOSONO et al., 1990, KUBO et al., 1992, LIU et al., 2002); como antialérgico (LEE et al., 2007); na melhora da digestão e tolerância à lactose (HERTZLER & CLANCY, 2003); na inibição de microorganismos patogênicos pela secreção de ácidos orgânicos secretados pelas bactérias ácido-láticas presentes nos grãos de quefir (GARROTE et al., 2000).

O efeito hipocolesterolêmico do quefir também vem sendo estudado, e a maioria dos trabalhos aponta para resultados positivos. TAMAI et al. (1996) investigaram os efeitos de um quefir-leite produzido por 10 tipos de bactérias ácido-láticas e *Saccaromyces cerevisiae* na concentração sérica e hepática de lipídeos em ratos alimentados com uma dieta rica em colesterol. O colesterol total e os níveis de fosfolipídeos séricos reduziram significativamente nos ratos suplementados com o leite fermentado.

Entretanto, no estudo de St-ONGE et al. (2002) com humanos, o quefir (leite) não afetou as concentrações de colesterol total, LDL, HDL e triglicerídeos (TG) no sangue dos indivíduos após 4 semanas de tratamento.

LIU et al. (2006) investigaram o efeito hipocolesterolêmico do quefir fermentado em leite e em leite de soja em hamsters. Os hamsters receberam dieta livre de colesterol ou rica em colesterol acrescidas de 10% de leite desnatado, quefir-leite, leite de soja ou quefir-leite de soja por 8 semanas (8 grupos). Houve melhora significativa do perfil lipídico dos animais com a diminuição do colesterol total sérico e hepático, dos triglicerídeos séricos e aumento da excreção de esteróis neutros e sais biliares, principalmente no grupo quefir-leite de soja.

Alguns autores já relataram ações do quefir no sistema imune (THOREUX & SCHMUCKER, 2001, UMEDA et al., 2005, VINDEROLA et al., 2005 e VINDEROLA et al., 2006; LEE et al., 2007). Por exemplo, VINDEROLA et al. (2005) verificaram os efeitos do quefir comercial e do quefir pasteurizado, em diferentes concentrações, na capacidade imunomodulatória da mucosa intestinal em camundongos. Ambos foram

capazes de modular o sistema imune da mucosa dependendo da dose administrada. O quefir comercial foi administrado 10 vezes mais diluído que o pasteurizado, contudo induziu uma resposta imunomodulatória de igual magnitude, indicando a importância da viabilidade celular. Assim, os resultados sugeriram que uma resposta Th1 foi controlada por citocinas e uma resposta Th2 induzida pela ingestão do quefir comercial, enquanto o quefir pasteurizado induziu ambas as respostas, Th1 e Th2.

O potencial antioxidante do quefir já foi investigado por alguns autores em estudos *in vitro* e *in vivo*. NAGIRA et al. (1999) demonstraram num estudo *in vitro*, que utilizou células de melanoma humano submetidas à irradiação ultra- violeta (UV) e incubadas com quefir (leite), ação desse na proteção aos danos oxidativos causados pelas ERO ao DNA, a proteínas e lipídeos.

GÜVEN et al. (2003a) realizaram um estudo em camundongos albinos *swiss* alimentados com dieta rica em colesterol suplementados com quefir- leite (30 mL/Kg), e observaram redução dos níveis de MDA no plasma dos animais, indicando menor peroxidação lipídica. A atividade das enzimas antioxidantes glutathiona reduzida (GSH), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e catalase, medidas nas hemácias, não foi modificada pela ingestão de quefir. GÜVEN et al. (2003b) também testaram o potencial antioxidante da suplementação com quefir (30mL/Kg) na peroxidação lipídica hepática e renal em camundongos, por meio da produção não enzimática de radicais livres (induzida por tetracloreto de carbono), bem como compararam essa ação com a vitamina E. Os grupos quefir e vitamina E apresentaram níveis de MDA no fígado e rim reduzidos, sendo que o poder antioxidante do quefir foi superior ao da vitamina E. Em relação às enzimas antioxidantes avaliadas, a ingestão de quefir promoveu aumento da atividade de GSH, GSH-Px, Glutathiona- S- transferase e não modificou a catalase.

No trabalho de CENEZIS et al. (2008), realizado em camundongos *swiss* com criptas aberrantes colônicas (induzidas por azoximetano), o quefir- leite (diluído 50% em água, dado *ad libidum*) preveniu a peroxidação lipídica no fígado e cólon dos animais.

Estudos com o quefir aquoso, em solução de açúcar mascavo, mostraram o efeito antiinflamatório e cicatrizante da solução em uso tópico, como no estudo de RODRIGUES et al. (2005), em que a atividade cicatrizante e antimicrobiana do quefir foram testadas utilizando-se um gel de quefir 70% em ratos albinos com ferida dorsal infectada com *Staphylococcus aureus* e a cicatrização foi melhor nesses animais em relação ao grupo controle, tratado com 5mg/Kg de neomicina-clostebol. MOREIRA et al. (2008) também observaram efeitos cicatrizante e antiinflamatório da fração de

carboidrato extraída de quefir aquoso (em solução de açúcar mascavo) em edema da pata de ratos.

2.2 Metabolismo Lipídico

Os lipídeos definem um conjunto de substâncias químicas que, ao contrário das outras classes de compostos orgânicos, não são caracterizadas por algum grupo funcional comum, e sim pela sua alta solubilidade em solventes orgânicos e insolubilidade em água. Os lipídeos mais importantes, do ponto de vista fisiológico e clínico, são os ácidos graxos, os triglicerídeos, os fosfolipídeos e o colesterol. Os ácidos graxos podem ser saturados, mono ou poliinsaturados, sendo os últimos precursores de biomoléculas importantes como as prostaglandinas e com inúmeras funções sobre contratilidade do músculo liso e modulação de recepção de sinal hormonal. Os triglicerídeos (TG) são a forma de armazenamento energético mais importante no organismo, enquanto os fosfolipídeos formam a bicamada lipídica, estrutura básica das membranas celulares; e o colesterol é precursor dos hormônios esteroides, dos ácidos biliares e da vitamina D, além de ter importantes funções nas membranas celulares, influenciando a sua fluidez e o estado de ativação de enzimas (CHAMPE et al, 2007).

Devido à natureza hidrofóbica dos lipídeos, seu mecanismo de transporte e distribuição no plasma não seria possível sem alguma forma de adaptação hidrofílica. Assim, as lipoproteínas são responsáveis pelo transporte de lipídeos no sangue, especialmente colesterol e TG, cujo metabolismo está intimamente relacionado com a iniciação e progressão da aterosclerose (FRANSSEN et al., 2008; RADER & DAUGHERTY, 2008). São constituídas por um núcleo de lipídeos (TG, colesterol esterificado e vitaminas lipossolúveis) e uma camada externa de fosfolipídeos e proteínas (ALVAREZ-LEITE et al., 2003). De acordo com sua origem, composição, densidade e tamanho, as lipoproteínas podem ser classificadas em: quilomícrons (QM), lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL) (RADER & WILSON, 1995). As lipoproteínas mais abundantes no plasma são as LDLs e HDLs (RADER & DAUGHERTY, 2008). A Figura 4 ilustra o metabolismo de lipoproteínas: inicialmente, a gordura dietética é absorvida pelo intestino delgado, e associada às apolipoproteínas Apo-B, E, A1 e C, formam os QM (lipoproteínas grandes, ricas em TG), que serão transportados para os tecidos

periféricos através da corrente sanguínea. Nos tecidos muscular e adiposo, a enzima lipase lipoprotéica cliva os QM, e os ácidos graxos liberados atravessam a membrana desses tecidos. A hidrólise dos triglicerídeos pela lipase lipoprotéica depende da presença do seu ativador/co-proteína (Apo-CII) na superfície do QM. Os QM remanescentes (TG e éster de colesterol) são removidos da circulação pelo fígado (RADER & DAUGHERTY, 2008).

O fígado empacota os lipídeos e os secreta diretamente na corrente sanguínea na forma de VLDL, cuja principal apoproteína é a Apo-B100; a VLDL sofre lipólise pela lipase lipoprotéica para formar as LDLs (RADER & DAUGHERTY, 2008). Os remanescentes de VLDL são chamados de IDL, que contêm quantidades semelhantes de colesterol e TG, e as principais apolipoproteínas presentes são Apo-B100 e Apo-E. Cerca de 50% das partículas de IDL são removidas da circulação pelo fígado. Os 50% restantes são convertidos em LDL pela lipase lipoprotéica ou transformados em LDL no plasma após a perda de Apo-E, dentre outras modificações (ALVAREZ-LEITE et al., 2003).

A LDL é a principal condutora de colesterol na circulação humana. Transporta ésteres de colesterol e vitamina E para os tecidos periféricos, cujas membranas apresentam os receptores de LDL (LDLr) que reconhecem a ApoB-100. Além disso, uma quantidade significativa de LDL do plasma é eventualmente removida da circulação pelo fígado, também por interação ApoB-100/ LDLr. Assim, a única molécula de Apo-B100 contida na LDL é reconhecida, pelos LDLr, tanto no fígado quanto nos tecidos extra-hepáticos (ALVAREZ-LEITE, 1995). A entrada de LDL na célula é seguida por um ataque lisossomal, com conseqüente hidrólise da ApoB-100 e do colesterol esterificado. O aumento da concentração intracelular de colesterol livre apresenta os seguintes efeitos regulatórios: 1) inibição da enzima hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) redutase, impedindo a síntese de colesterol; 2) inibição da síntese de receptores de LDL; 3) estímulo da enzima acil-CoA colesterol aciltransferase (ACAT) para esterificação do colesterol citoplasmático (ALVAREZ-LEITE et al. , 2003).

Em contrapartida, as HDLs são geradas pelo intestino e fígado através da secreção de Apo-A1 livre de lipídeos, que então recruta colesterol desses órgãos por meio do transportador ABCA1 (*ATP binding cassette transporter A1*), formando as HDLs nascentes. Este mecanismo protege as Apo-A1 de serem rapidamente degradadas nos rins. Nos tecidos periféricos, as HDLs nascentes promovem o efluxo de colesterol dos tecidos, inclusive de macrófagos, mediado por ações da ABCA-1. As HDLs maduras também promovem este efluxo, mas por ações do ABCG1 (*ATP binding*

cassette transporter G1). O colesterol livre (não esterificado) em contato com HDLs nascentes é esterificado a éster de colesterol pela ação da enzima lecitina: colesterol acil transferase (LCAT), formando as HDLs maduras (aumento da partícula). O colesterol nas HDLs retorna ao fígado diretamente, através da expressão do receptor *scavenger* tipo B, classe I (SR-BI), e, indiretamente, por transferência para as lipoproteínas que contém apo-B (LDLs e VLDLs) por ação da proteína de transferência de éster de colesterol (CETP). O conteúdo lipídico das HDLs é alterado pelas enzimas lipase hepática e lipase endotelial, bem como pelas CETPs e proteína de transferência fosfolipídica (PLTP), o que afeta o catabolismo da HDL. Nos macrófagos, o receptor nuclear LXR regula positivamente a produção de ambos transportadores ABCA1 e ABCG1 (RADER & DAUGHERTY, 2008).

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

A dislipidemia, caracterizada por níveis elevados de LDL e/ou reduzidos de HDL circulantes, é um pré-requisito absoluto para a iniciação da lesão aterosclerótica e progressão da doença. (BINDER et al., 2002; ALVAREZ-LEITE et al., 2003).

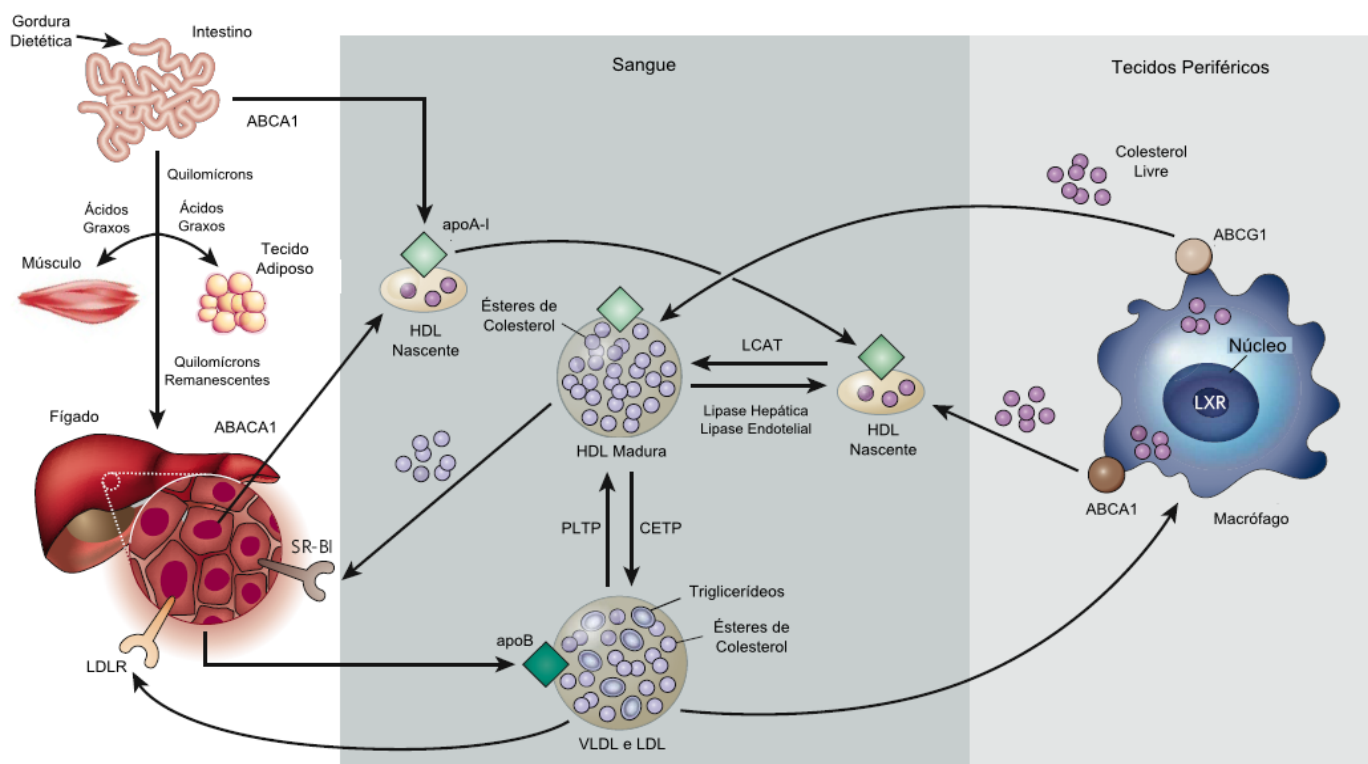


Figura 4: Metabolismo de Lipoproteínas. RADER & DAUGHERTY, 2008.

VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; IDL: lipoproteína de densidade intermediária; LDL: lipoproteína de baixa densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade; LCAT: lecitina: colesterol aciltransferase; CETP: proteína de transferência de éster de colesterol; PLTP: proteína de transferência fosfolipídica; ABCA-1: *ATP binding cassette transporter A1*; ABCG1: *ATP binding cassette transporter G1*.

2.3 Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica, caracterizada pelo acúmulo de lipídeos, células (macrófagos, células T, B, musculares lisas e dendríticas) e elementos fibrosos na parede das médias e grandes artérias (LIBBY, 2002; LUSIS, 2005; HANSSON & LIBBY, 2006; GALKINA & LEY, 2009). Regiões de ramificações e de forte curvatura das artérias, onde há aumento da força de cisalhamento (*shear stress*) e da turbulência do fluxo, são as áreas mais propensas à formação da aterosclerose (HANSSON & LIBBY, 2006).

O dano vascular causado na aterosclerose pode resultar da interação de várias forças. Entre elas, incluem-se anormalidades metabólicas e nutricionais, tais como hiperlipidemias, forças mecânicas associadas com a hipertensão arterial, toxinas exógenas (como aquelas encontradas no tabaco), proteínas anormalmente glicadas

associadas com o *diabetes mellitus*, lipídeos ou proteínas modificadas oxidativamente e, possivelmente, infecções virais (ALVAREZ-LEITE et al., 2003).

O primeiro passo no desenvolvimento da aterosclerose é a retenção de LDLs na parede arterial. Este processo inicia-se quando há níveis elevados dessa lipoproteína na corrente sanguínea (hipercolesterolemia), o que facilita sua migração por diapedese através das células endoteliais e sua retenção na parede do vaso parece envolver interações entre a apo-B, que faz parte da sua constituição, e os proteoglicanos que estão presentes na camada íntima das artérias. Uma vez retida no espaço subendotelial, a LDL poderá sofrer oxidação por espécies reativas de oxigênio, produzidas por células endoteliais, macrófagos residentes e células musculares lisas, modificando sua estrutura (STEFFENS & MACH, 2004), formando a LDL oxidada (LDLox).

Com isso, as LDLs oxidadas ativam a síntese de moléculas quimiotáticas para monócitos (MCP1) e a expressão de moléculas de adesão celular como P-Selectina, E-selectina, PECAM, VCAM-1 e ICAM-1. Assim, monócitos são recrutados para a lesão, aderem-se firmemente às demais moléculas de adesão do endotélio e migram para a camada íntima do vaso (CASÓS et al., 2008). Esses monócitos diferenciam-se, então, em macrófagos, que fagocitam as LDLs oxidadas por ligação aos receptores *scavengers* CD36 e SR-A, culminando na formação de células espumosas (*foam cells*), devido ao acúmulo de lipídeos nessas células. Isso ocorre porque esses receptores não sofrem regulação negativa, ou seja, sua expressão não é dependente do conteúdo intracelular de colesterol (MANNING-TOBIN et al., 2009). A ativação do macrófago também promove a liberação de citocinas, quimiocinas, proteases e radicais de oxigênio, que piora o quadro de inflamação e dano ao tecido, contribuindo para o desenvolvimento da lesão. O resultado desse processo é a origem da estria gordurosa, primeira lesão da aterosclerose (Figura 5).

O acúmulo de lipídeos na camada íntima da artéria ocorre durante o primeiro estágio de formação da placa. Estrias gordurosas são prevalentes em indivíduos jovens, nunca causam sintomas e podem progredir para uma lesão aterosclerótica madura ou desaparecer com o tempo (HANSSON & LIBBY, 2006; RADER & DAUGHERTY, 2008).

Na evolução da placa aterosclerótica ocorre a transição da estria gordurosa para a lesão intermediária, fibrogordurosa. Esta fase da lesão é influenciada por interações entre monócitos/macrófagos e células T, que resultam em características de estado inflamatório crônico. Também ocorre a migração de células musculares lisas da

camada média da parede arterial para a íntima arterial. Essas 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 (HANSSON e LIBBY, 2006; MALLIKA et al., 2007; RADER & DAUGHERTY, 2008).

As placas ateroscleróticas maduras ou fibrosas apresentam uma estrutura mais complexa. No centro da placa, estão presentes células espumosas, lipídeos extracelulares e células necróticas, envolvidos por uma capa de células musculares lisas e fibras de colágeno. Outros tipos celulares que formam a placa são células dendríticas, mastócitos, poucas células B, e provavelmente células *natural killer* (NK). Na interface da capa e do centro da placa, apresentam-se macrófagos e células T em abundância (HANSSON & LIBBY, 2006) (Figura 6). Calcificações são encontradas próximas ao centro necrótico. A capa fibrosa pode variar de espessura sendo mais delgada nas regiões laterais e margens da lesão. A formação de lesões avançadas é usualmente associada a uma contínua diminuição na espessura da camada média da artéria, resultante da migração de células musculares lisas para a camada íntima durante a progressão da doença (MALLIKA et al., 2007; RADER & DAUGHERTY, 2008).

Embora lesões avançadas possam proporcionar sintomas de isquemia (fluxo sanguíneo insuficiente para órgãos e tecidos) como resultado de estreitamento progressivo do lúmen do vaso, o mais grave evento clínico que pode ocorrer é a ruptura da placa. Esta ruptura expõe material pró-trombótico na corrente sanguínea, formando um trombo no lúmen. Se o trombo for suficientemente grande, causa oclusão trombótica da artéria, o que leva à síndrome coronária aguda ou ao infarto do miocárdio (HANSSON & LIBBY, 2006; RADER & DAUGHERTY, 2008).

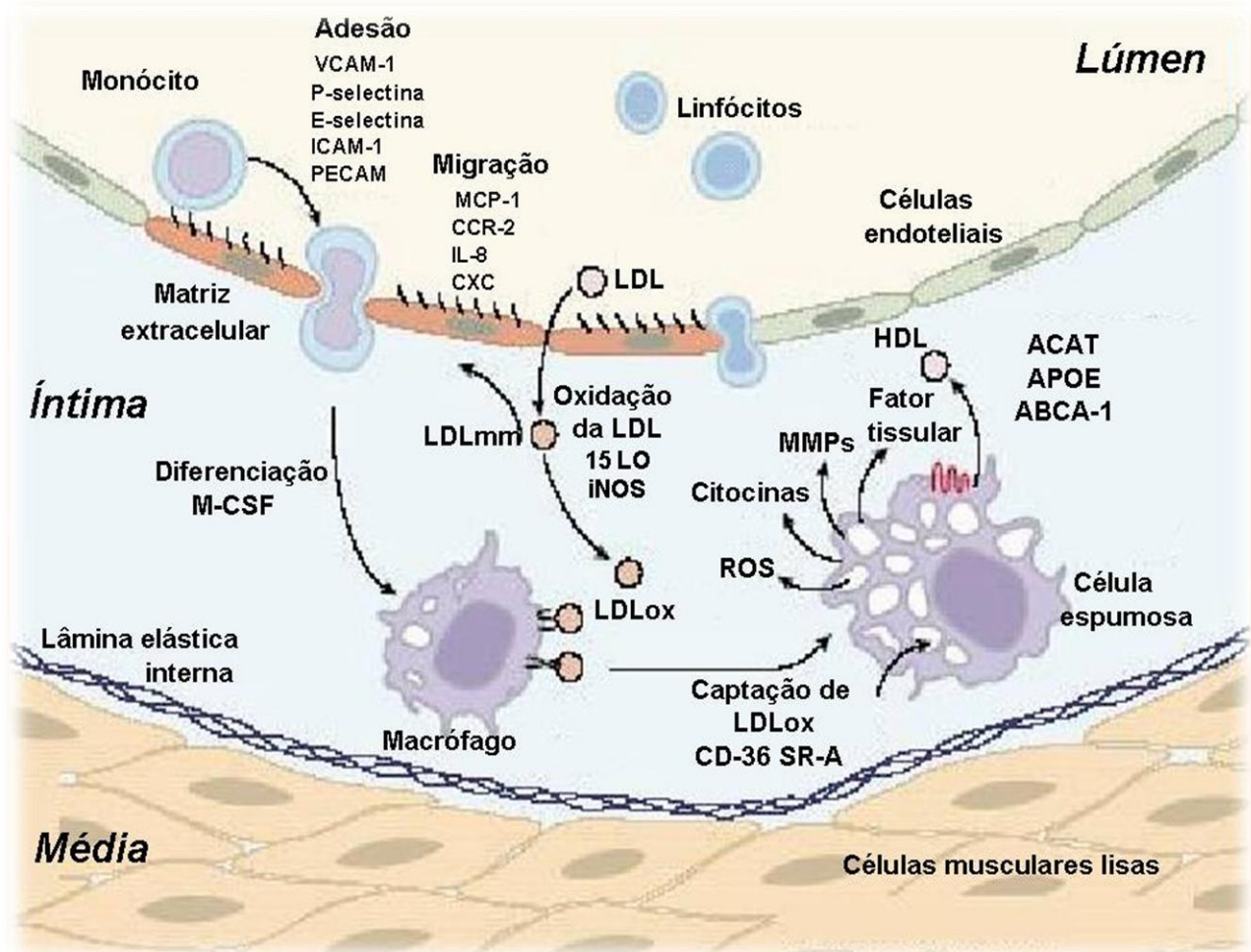


Figura 5: Eventos iniciais no desenvolvimento da aterosclerose. SCOTT, 2004.

A LDL é submetida a modificações oxidativas no espaço subendotelial, progredindo de LDL minimamente oxidada (LDLmm) para extensivamente oxidada (LDLox). Monócitos aderem às células endoteliais que foram induzidas a expressarem moléculas de adesão por LDLmm e citocinas inflamatórias. Monócitos aderidos migram para o espaço subendotelial e se diferenciam em macrófagos. As LDLox são capturadas por macrófagos via receptores *scavengers* e o colesterol contido nelas é esterificado e estocado em gotas lipídicas (células espumosas), podendo ser convertido em formas mais solúveis, ou exportado para HDL extracelular via transportadores de colesterol, tais como ABCA-1.

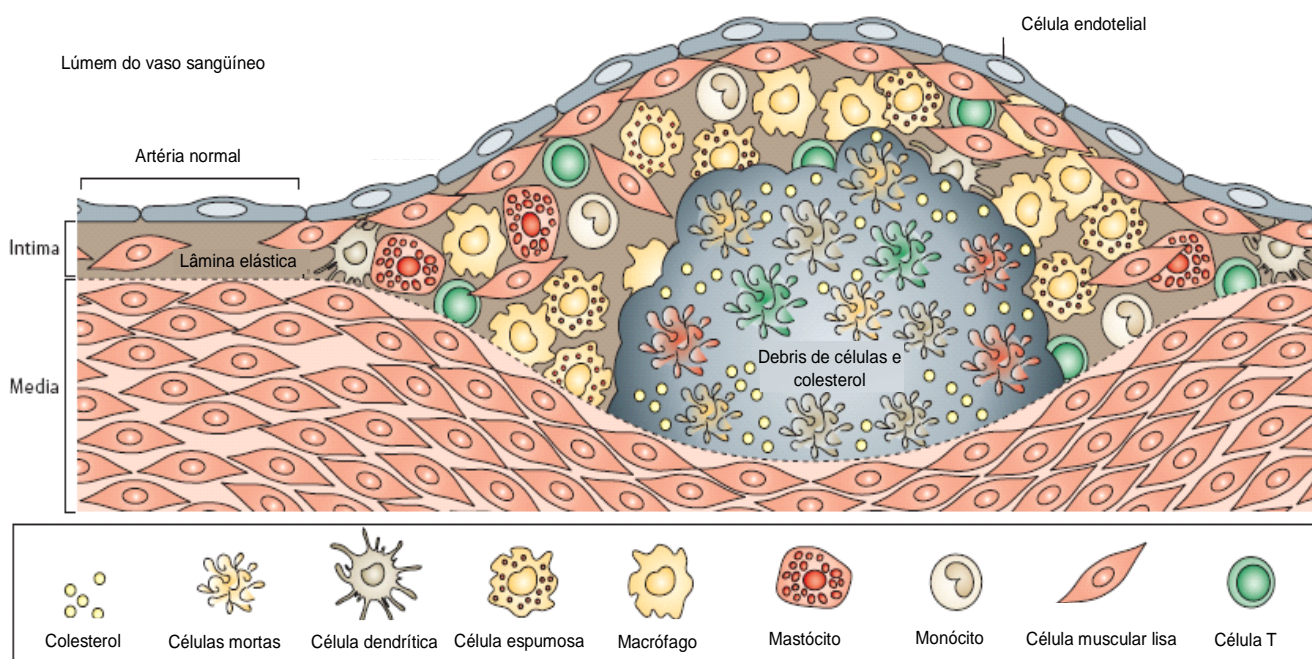


Figura 6: Composição celular da placa aterosclerótica. HANSSON e LIBBY, 2006.

2.4 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo está associado a processos fisiológicos, como o envelhecimento, e doenças crônicas, tais como aterosclerose, diabetes e câncer. Pode ser definido como resultado do desequilíbrio entre a produção de espécies oxidantes e a defesa do sistema antioxidante do organismo (GOETZ & LUCH, 2008; STEPHENS et al., 2009).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) exercem um papel importante no estresse oxidativo. As ERO, que podem ser radicais livres ou não (como os peróxidos), são espécies de oxigênio que estão em um estado mais reativo que o oxigênio molecular, ou seja, o oxigênio pode ser reduzido em diferentes graus. Dentre as espécies radicais mais importantes no contexto biológico estão 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).

Um grave desequilíbrio redox pode resultar na morte celular, após oxidação generalizada de macromoléculas (lipídeos, proteínas), embora modificações oxidativas sutis pareçam desempenhar papel na modulação de vias de sinalização, também causando efeitos adversos (STEPHENS et al., 2009).

Para minimizar os danos causados pela ação das ERO e, conseqüentemente, pelo estresse oxidativo, um sistema antioxidante bem organizado trabalha de forma coordenada. O termo antioxidante é amplamente definido como qualquer substância que retarda ou evita a oxidação de um substrato. Quando este é suficiente em balancear o ataque das ERO, o organismo reduz o estresse oxidativo (MONAGHAN et al, 2009; POWERS & JACKSON, 2008).

2.4.1 Espécies Reativas de Oxigênio

O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) constitui a ERO primária, pois é formado em sistemas biológicos pela primeira redução do oxigênio molecular, numa reação catalisada pela enzima NADPH oxidase (GENESTRA, 2007). Essa reação ocorre geralmente nas membranas mitocondriais. É formado principalmente como um intermediário nas reações bioquímicas. Uma vez gerado, o $O_2^{\cdot-}$ pode agir com um radical livre fraco, como elétron redutor ou elétron oxidante. Possui uma longa meia-vida que permite sua difusão para o interior da célula e, conseqüentemente, o aumento do número dos seus potenciais alvos (Figura 7). Como uma espécie redox ativa, o superóxido pode reduzir alguns materiais biológicos, como o citocromo c, e oxidar outros, como o ascorbato (GOETZ & LUCH, 2008; POWERS & JACKSON, 2008).

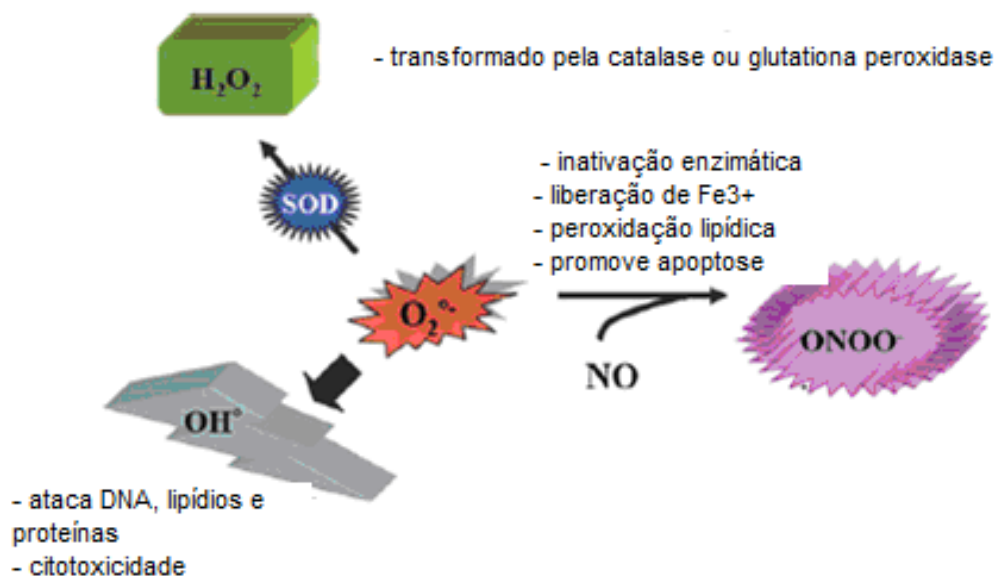


Figura 7: Ânion superóxido e seus derivados (adaptado de AFONSO et al, 2007).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um composto reativo que pode facilmente gerar radicais livres como o radical hidroxil (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 & LUCH, 2008; POWERS & JACKSON, 2008). Por sua vez, os radicais hidroxil (OH^\cdot) são altamente reativos com forte poder oxidante e resultam da transferência de elétrons entre peróxido de hidrogênio e metais de transição. São as ERO mais prejudiciais, visto que interagem com biomoléculas imediatamente após sua geração. Pressupõe-se que o radical OH^\cdot contribua para vários processos fisiopatológicos, como envelhecimento, câncer, diabetes, síndrome de isquemia e reperfusão (GOETZ & LUCH, 2008; POWERS & 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 pelas membranas. É produzido durante a contração esquelética muscular no exercício (POWERS & JACKSON, 2008).

O óxido nítrico (NO) é sintetizado a partir da arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), a qual ocorre em três tipos principais: NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) e NOS indutível (iNOS). Em condições fisiológicas, o NO é um potente vasodilatador. Em situações de desequilíbrio do seu metabolismo, o NO (agente redutor fraco) reage com o oxigênio ou com o superóxido, produzindo peroxinitrito. Este último e o NO são classificados como espécies reativas ao nitrogênio (GOETZ & LUCH, 2008; POWERS & JACKSON, 2008). Assim, NO pode ter efeitos benéficos, mas quando produzido em grandes quantidades pela iNOS é pró-inflamatório na aterosclerose, contribuindo para o desenvolvimento da lesão (ZHANG et al., 2001).

O peroxinitrito (ONOO^\cdot) ou sua forma protonada (ONOOH) é formado a partir da reação do superóxido com o NO. É um forte oxidante e pode levar ao esgotamento de grupos tiol, causando danos ao DNA e nitração de proteínas (GOETZ & LUCH, 2008; POWERS & JACKSON, 2008).

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

2.4.2 Estresse Oxidativo e Aterosclerose

Todos os componentes celulares são susceptíveis à ação das ERO (lipídeos, proteínas, DNA), porém a membrana celular é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações em sua estrutura e permeabilidade. A oxidação dos lipídeos insaturados da membrana celular pode modular diversas vias de sinalização. Com isso, o estresse oxidativo pode levar a vários eventos celulares, tais como inativação de óxido nítrico (NO), modificações oxidativas de DNA e proteínas, oxidação lipídica, aumento da proliferação e apoptose de células vasculares, e aumento da expressão e ativação de genes redox-sensíveis, como o receptor para LDLox, moléculas de adesão, fatores quimiotáticos, citocinas pró-inflamatórias, metaloproteinases de matriz (Figura 8). Vários fatores de risco cardiovascular estão associados com o estresse oxidativo e desregulação da expressão e atividade de enzimas oxidantes e antioxidantes, incluindo hipertensão, hipercolesterolemia, diabetes mellitus e fumo (WASSMANN et al., 2004; STEPHENS et al., 2009).

Assim, a produção exacerbada de ERO está intimamente relacionada com a aterosclerose por induzir uma ativação crônica do endotélio vascular e componentes do sistema imune. As ERO do endotélio vascular são provenientes de enzimas como NADPH oxidase, MPO, xantina oxidase, lipoxigenases, NO sintases. Além disso, uma disfunção da cadeia respiratória mitocondrial pode ter grandes efeitos na produção de ERO (GALKINA & LEY, 2009). Em humanos, a expressão elevada de subunidades protéicas de NADPH oxidase está associada a aumento da produção de íons superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e da severidade da aterosclerose (SORESCU et al., 2002). Camundongos com deficiência genética de apo-E e NADPH oxidase apresentaram menor desenvolvimento de aterosclerose que os animais somente ApoE^{-/-} (BARRY-LANE et al., 2001). As plaquetas também produzem ERO, e a produção de superóxido induzida por NADPH resulta em maior disponibilidade de ADP livre e amplificação do recrutamento de plaquetas (FREEDMAN, 2008).

Outra consequência do estresse oxidativo aumentado é a oxidação das LDL, evento crucial para o desenvolvimento da aterosclerose, como já citado anteriormente (HEISTAD, 2006; KATO et al., 2009).

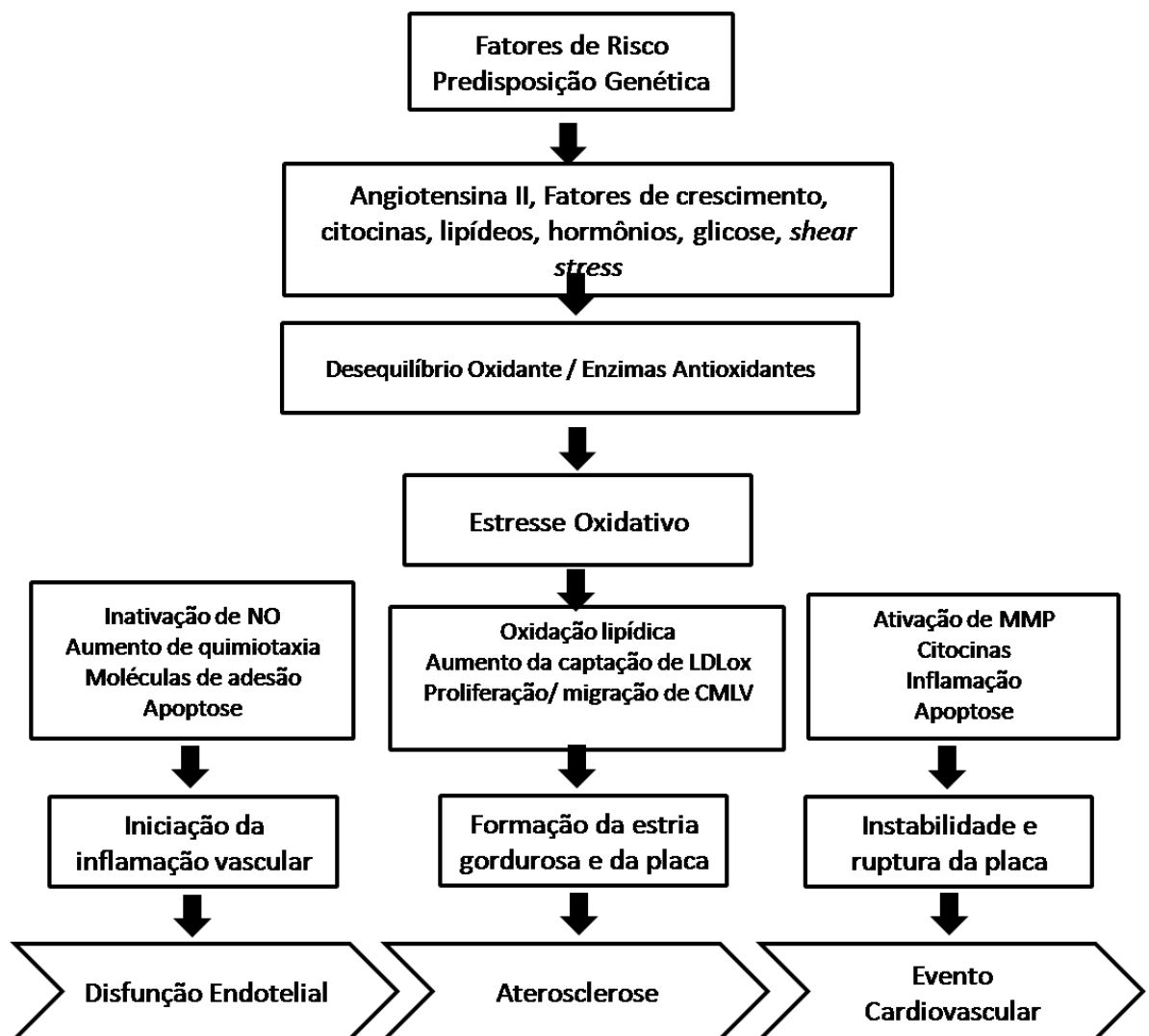


Figura 8: Fisiopatologia do estresse oxidativo e DCVs. WASSMANN et al., 2004.

Fatores de risco que predispõem a aterogênese estão associados com o estresse oxidativo. Vários agonistas e condições patológicas levam à desregulação da expressão e função de enzimas oxidantes e antioxidantes, resultando em aumentos de radicais livres no sistema vascular. O estresse oxidativo promove eventos celulares patológicos, que estão envolvidos no desenvolvimento e progressão da aterosclerose em todos os estágios da doença. LDLox indica LDL oxidada; MMP, metaloproteinase de matriz; CMLV, células musculares lisas vasculares.

2.4.3 Sistemas de Defesa Antioxidante

O sistema antioxidante do organismo é composto por antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, que atuam como uma unidade complexa na regulação das ERO (POWERS & JACKSON, 2008). O sistema enzimático inclui diversas enzimas, tais como superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathiona peroxidase (GSH-Px).

A enzima superóxido dismutase (SOD) constitui a primeira linha de defesa contra os radicais superóxido ($O_2^{\cdot -}$), transformando-os em H_2O_2 e oxigênio (reação de dismutação). Existem três isoformas dessa enzima nos mamíferos, 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 & JACKSON, 2008).

A catalase é uma enzima antioxidante intracelular (heme proteína) localizada principalmente em peroxissomas celulares, e, em menor extensão, no citosol, que catalisa a reação de decomposição do peróxido de hidrogênio, formando água e oxigênio molecular ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$). Ao remover peróxidos de hidrogênio, a catalase age indiretamente contra os radicais superóxido, que são convertidos em peróxido de hidrogênio pela SOD. A enzima também possui atividade de peroxidase e reage com peróxidos orgânicos e doadores de hidrogênio, formando água e álcoois orgânicos. A catalase é muito eficaz em alto nível de estresse oxidativo, protegendo as células do H_2O_2 produzido em seu interior. A enzima torna-se especialmente importante no caso de quantidade limitada de glutathiona ou atividade reduzida da GPx e desempenha um papel significativo no desenvolvimento de tolerância ao estresse oxidativo na resposta adaptativa das células (WASSMANN et al., 2004; POWERS & JACKSON, 2008; STEPHENS et al., 2009).

A glutathiona peroxidase (GPx) catalisa a redução de peróxidos de hidrogênio ou hidroperóxidos orgânicos para água e álcool, na mitocôndria. A redução do H_2O_2 , ocorre pela conversão da glutathiona reduzida (GSH) a glutathiona oxidada (GSSH), que é catalisada pela GPx (POWERS & JACKSON, 2008; TRACHOOTHAM et al., 2008).

Além dessas enzimas, há diversos antioxidantes não enzimáticos nas células, como a glutathiona, ácido úrico, bilirrubina, vitaminas C e E (POWERS & JACKSON, 2008), como também compostos exógenos, como flavonóides e carotenóides (STEPHENS et al., 2009).

2.5 Modelos Murinos de Aterosclerose

Camundongos selvagens são altamente resistentes ao desenvolvimento de aterosclerose (BRESLOW, 1996; JAWIEN et al., 2004, CASÓS et al., 2008), principalmente por transportarem maior parte do colesterol sanguíneo em HDL (mais de 85%) e possuírem baixos níveis de colesterol em VLDL e LDL, caracterizando um perfil lipídico significativamente diferente do perfil humano, em que as LDL são as principais carreadoras de colesterol sanguíneo (65-85%) (BRESLOW, 1996, HOFKER et al., 1998; NEUZIL et al., 1998; FAZIO & LINTON, 2001). Apesar das diferenças, camundongos e humanos possuem, com poucas exceções, o mesmo conjunto de genes que controlam o metabolismo de lipoproteínas (HOFKER et al., 1998).

Duas linhagens de camundongos modificados geneticamente são particularmente utilizadas para o estudo da aterosclerose, os deficientes em apo- E (ApoE^{-/-}) e os deficientes no receptor de LDL (LDLr^{-/-}), pela deleção dos respectivos genes (*knockout*), que leva ao desenvolvimento de placas ateroscleróticas nesses animais (MEIR & LEITERSDORF, 2004; HANSSON & LIBBY, 2006). Essas lesões já foram extensivamente caracterizadas e apresentam semelhanças com as encontradas em humanos (PALINSK et al., 1994).

O camundongo deficiente do receptor de LDL (LDLr^{-/-}) possui elevadas concentrações plasmáticas das lipoproteínas aterogênicas LDL e IDL, uma vez que o *clearance* de LDL, IDL e VLDL está reduzido nesse animal (BRESLOW, 1996). O perfil lipídico do plasma desses camundongos é similar ao de humanos com hiperlipidemia, mais 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 & LINTON, 2001; HANSSON & LIBBY, 2006). Esta condição, provavelmente, está relacionada ao fato de que, diferentemente dos humanos, os camundongos sintetizam duas isoformas 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 quilomícrons e serem rapidamente retiradas da circulação. Portanto, uma dieta comercial ou normolipídica para esse modelo murino não é capaz de elevar os níveis séricos de colesterol a concentrações encontradas na hipercolesterolemia familiar homozigótica. As demais

partículas de VLDL que apresentam apo B-100 (característica comum em humanos e camundongos) formam remanescentes de IDL, também contendo a apo B-100, que são retiradas do plasma pelos receptores de LDL que reconhecem essa apoproteína. Vale ressaltar que, em humanos, as apo B-48 são secretadas apenas no intestino compondo os QM (ISHIBASHI et al., 1994).

Camundongos deficientes em apo-E (ApoE^{-/-}) apresentam níveis elevados de colesterol devido à ausência do *clearance* das lipoproteínas remanescentes. Logo, o acúmulo de remanescentes de QM e de VLDL no plasma constitui o estímulo aterogênico nestes animais (ZHANG et al., 1992; BRESLOW, 1996). Estes animais apresentam lesões similares às observadas durante a formação da aterosclerose humana, tornando-se um modelo importante para o estudo dos vários fatores que controlam ou influenciam o desenvolvimento da placa aterosclerótica. (MEIR e LEITERSDORF, 2004). As lesões são exacerbadas pelo consumo de dietas aterogênicas, ricas em gorduras e colesterol (BRESLOW, 1996; HANSSON & LIBBY, 2006).

III MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparação do Quefir

Para o preparo do quefir, foram utilizados grãos de quefir gentilmente doados pela Universidade José do Rosário Velano (UNIFENAS-MG). A composição microbiológica desses grãos foi previamente determinada, e as espécies predominantes de bactérias e leveduras (acima de 10^5 UFC/mL) encontradas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Microorganismos predominantes nos grãos de quefir utilizados no estudo.

Bactérias	Leveduras
<i>Lactobacillus satsunensis</i>	<i>Zygosaccharomyces fermentati</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
<i>Lactobacillus nagelei</i>	

Resultados obtidos na pesquisa de RAIMUNDO, 2009 (Dados não publicados).

O quefir utilizado nos experimentos foi obtido pela fermentação dos grãos de quefir em água com açúcar mascavo, conforme é consumido popularmente no Brasil.

Os grãos de quefir foram adicionados a uma solução de água filtrada com 30g de açúcar mascavo, na concentração de 50g/L (50g de grãos de quefir/ 1L de solução de açúcar mascavo) em um recipiente de vidro limpo, de acordo com MOREIRA et al.(2008). A mistura ficou em repouso por 24 horas à temperatura ambiente para fermentação dos grãos. O recipiente foi tampado, mas não hermeticamente, devido à produção de gases. Após a fermentação, os grãos foram cuidadosamente coados, lavados e transferidos para outro recipiente. Somente utensílios não- metálicos foram utilizados no preparo do quefir (SCHNEEDORF & ANFITEATRO, 2004).

O líquido fermentado foi administrado *ad libitum* aos camundongos do grupo Quefir e os grãos foram reaproveitados para nova fermentação. Os animais consumiam o mesmo quefir por 48 horas, quando uma nova bebida era oferecida. O pH do quefir foi medido a cada fermentação em pH-metro, sendo que a média \pm desvio padrão de pH foi $4,17 \pm 0,6$, durante todo o estudo. O grupo Controle recebeu água filtrada (*ad libitum*) no mesmo pH do quefir, corrigido com solução de HCl 0,01mol/L.

3.2 Contagem Total de Microorganismos no Quefir

O quefir preparado artesanalmente para o presente estudo (seção 3.1) foi submetido à análise microbiológica para contagem total de bactérias ácido- lácticas (BAL) e leveduras. Para isso, foram utilizadas amostras do fermentado aquoso após 24 horas de fermentação pelos grãos de quefir. Para produção das amostras, foi utilizado um *pool* dos grãos de quefir cultivados em diferentes momentos durante o estudo.

3.2.1 Contagem de Bactérias Ácido Lácticas

A contagem de BAL foi realizada pelo método de plaqueamento em superfície a partir de diluições decimais seriadas. Na superfície de cada placa contendo Agar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Acumedia, Michigan, EUA) acrescido de cicloheximida (Sigma, St. Louis, EUA) na concentração de 100 mg/L foi inoculado 0,1 mL das diluições decimais (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}). As placas foram incubadas em condições de anaerobiose por 72 horas, em temperatura ambiente.

3.2.2 Contagem de Leveduras

A contagem de leveduras foi realizada pelo método de plaqueamento em superfície a partir de diluições decimais seriadas. Na superfície de cada placa contendo 15 a 20 mL do meio ágar extrato de malte-extrato de levedura (YM, Difco, Detroit, EUA) suplementado com cloranfenicol (INLAB) na concentração de 200mg/L foi inoculado 0,1 mL das diluições decimais (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}). As placas foram incubadas em aerobiose por 72-96 horas em temperatura ambiente.

3.3 Animais

No presente estudo foram utilizados camundongos deficientes do gene da apo-E (ApoE^{-/-}) obtidos no Biotério Ênio Cardillo Vieira da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram mantidos nesse mesmo local, em gaiolas coletivas (capacidade máxima para 6 animais), todos com livre acesso à dieta e água (ou líquido experimental), em ambiente com ciclos de luminosidade de 12 horas (7:00 às 19:00h) e temperatura controlada (20 a 24°C).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFMG (CETEA/UFMG), protocolo nº 224/2008.

3.4 Delineamento Experimental

Em experimentos iniciais (Apêndice I), realizados com animais LDLr^{-/-} alimentados com dieta aterogênica, recebendo o quefir ou água por 6 semanas, com os mesmos objetivos do presente estudo, verificou-se que os animais atingiram níveis elevados de colesterol sanguíneo e frações e o quefir não mostrou nenhum efeito no metabolismo lipídico, estresse oxidativo ou desenvolvimento da placa aterosclerótica. Considerando que os tratamentos alimentares são mais benéficos em hiperlipidemias leves a moderadas, resolveu-se testar as propriedades terapêuticas do quefir em níveis intermediários de colesterol total sérico. Assim, foram utilizados camundongos também susceptíveis à aterosclerose por modificação genética (ApoE^{-/-}), porém alimentados com uma dieta normolipídica por menor período experimental. Esses animais, quando recebendo dieta comercial (isenta de colesterol) apresentam níveis intermediários de colesterolemia, o que poderia deixar mais evidente os possíveis efeitos benéficos do quefir.

Para isso, vinte e três camundongos ApoE^{-/-} fêmeas, de 9 a 11 semanas de idade, homogêneas quanto ao peso e colesterol total sérico foram divididas em dois grupos: grupo “Controle” (n=11), que recebeu água filtrada pura no mesmo pH do quefir; e grupo “Quefir” (n=12), que recebeu o quefir (50g/L) em substituição à água. O experimento teve a duração de 4 semanas e ambos os grupos foram alimentados com dieta comercial para roedores Labina®, cujos ingredientes (fornecidos pelo fabricante) estão no Anexo I. A Tabela 2 apresenta a composição centesimal de macronutrientes e densidade calórica da dieta comercial.

Tabela 2 - Composição centesimal das dieta comercial

Macronutriente	Dieta Comercial ^a
Carboidrato	50,3%
Proteína	41,9%
Lipídeo	7,8%
Densidade calórica	2,18 kcal/g

^a Composição fornecida pelo fabricante da ração comercial Labina®

3.5 Controle Ponderal, Alimentar e Líquido

Os animais tiveram a ingestão alimentar e peso corporal aferidos semanalmente, utilizando-se balança semi-analítica.

Para quantificação da ingestão alimentar, a dieta ofertada foi pesada e, no final de cada semana, foi quantificado o restante de dieta, dado pela soma da sobra (que fica na grade da gaiola) e o resto no fundo da gaiola (obtido por peneiração da maravalha). Dessa forma, a diferença entre dieta ofertada e o restante não consumido forneceu o consumo semanal de dieta. Assim, o consumo alimentar semanal por animal pôde ser obtido pela divisão do consumo semanal da gaiola pelo número de animais presentes nela.

O controle de líquido ingerido foi realizado a cada 48 horas, sendo que a quantificação foi obtida pela diferença entre o peso do bebedouro com o líquido (água ou quefir) inicial e o peso do mesmo com o restante do líquido após dois dias.

3.6 Amostras de Sangue e Tecidos

No início do experimento, após jejum de 12 horas, foram coletadas amostras de sangue da cauda dos animais, em microtubos com heparina (anticoagulante), para dosagem do colesterol total, com o objetivo de homogeneizar os grupos controle e experimental.

Ao término das semanas experimentais, os animais, em jejum de 12 horas, foram anestesiados intraperitonealmente com uma solução de Ketamina (70 mg/kg) e

Xilazina (11,5 mg/kg) (preconizado pelo CETEA/ UFMG) e sacrificados por exanguinação do plexo inguinal. Posteriormente, as amostras de sangue (sem anticoagulante) foram centrifugadas em centrífuga de mesa (Fanem Centrimicro 243) a 6.000rpm durante 5 minutos. O soro foi, então, armazenado a -80°C para as análises.

Após o sacrifício dos animais, também foram coletados fígado, rins, ceco, coração e aorta. Primeiramente, esses órgãos foram perfundidos com solução salina tamponada com fosfato (PBS), e, em seguida, foram armazenados a -80°C. O conteúdo cecal foi retirado, seco em estufa a 60°C e, posteriormente, armazenado a -80°C. As amostras utilizadas para avaliação do estresse oxidativo (seção 3.8) foram borrifadas com nitrogênio gasoso e envoltas em papel alumínio antes do congelamento.

3.7 Avaliação do Perfil Lipídico e Glicemia

3.7.1 Determinação dos Níveis de Colesterol Total

Os níveis de colesterol total foram determinados por método enzimático (colesterol oxidase) colorimétrico (ALLAIN et al., 1974), utilizando-se kit comercial (Labtest, Brasil). O método consiste na hidrólise de ésteres de colesterol pela colesterol esterase, produzindo ácidos graxos e colesterol livre. Este último, em presença da colesterol oxidase e de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio, que, pela ação da peroxidase em presença de fenol e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo-avermelhado (antipirilquinonimina), que apresenta absorção máxima de 500nm. A intensidade da cor formada é diretamente proporcional à concentração de colesterol na amostra.

Dessa forma, o ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços (FAZIO et al, 1997), e 5µL das amostras de soro ou plasma foram diluídas em água deionizada (1:200), a fim de que as leituras de absorbância fossem adequadas à variação linear do teste. Em seguida, 100µL do reagente de cor (kit Labtest) foram adicionados a 100µL do soro diluído. Após um período de incubação de 15 minutos a 37°C, a absorbância foi lida a 492nm em um leitor de microplaca (Modelar Devices, modelo Spectra Max Plus). As dosagens foram realizadas em duplicata.

Uma curva padrão foi construída, sendo o resultado obtido pela equação da reta, e multiplicado pelo fator de diluição.

3.7.2 Determinação dos Níveis de HDL- colesterol

Os níveis de HDL no soro foram determinados utilizando-se o 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 4 minutos), o colesterol ligado às HDL fica no sobrenadante.

Dessa maneira, o sobrenadante foi plaqueado (10µL) em duplicata em uma microplaca de 96 poços (FAZIO et al, 1997); em seguida, foram adicionados 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 substituído 10µL de sobrenadante de HDL por 10µL de padrão. Para o cálculo da concentração de HDL, primeiramente foi determinado o fator de calibração pela seguinte equação:

$$F \text{ (Fator de calibração)} = 40 / \text{média da Absorbância do Padrão}$$
$$\text{HDLc} = \text{Absorbância da amostra} \times F$$

3.7.3 Determinação da Fração Aterogênica e do Índice Aterogênico

O colesterol da fração aterogênica (LDL, VLDL e IDL) foi calculado pela diferença entre o colesterol total e o HDL. O índice aterogênico foi obtido pela razão entre a fração aterogênica e o HDL.

3.7.4 Determinação dos Níveis de Triglicerídeos

Os níveis de triglicerídeos séricos foram determinados por método enzimático colorimétrico (FOSSATI & PRENCIPE, 1982), utilizando-se kit comercial (Doles, Brasil). O método consiste na hidrólise dos triglicerídeos do soro pela enzima lipase lipoprotéica, produzindo glicerol livre, que é fosforilado pela enzima glicerol quinase, cujo produto sofre a ação da glicerol-P-oxidase, 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 (FAZIO et al, 1997). A diluição utilizada foi de 5µL de soro em 245µL de água deionizada

(1:100), e 100µl de reagente de cor foram adicionados aos 100µl de soro diluído. Após um período de incubação de 15 minutos a 37°C, a leitura foi realizada em 492nm. O cálculo foi semelhante ao de colesterol total.

3.7.5 Determinação dos Lipídeos Totais, Colesterol Total e Triglicerídeos Hepáticos e Cecais

Os lipídeos totais hepáticos e do conteúdo cecal foram extraídos com o uso de solventes orgânicos de acordo com o método de FOLCH et al. (1957). Resumidamente, o seguinte procedimento foi realizado: 100mg de tecido hepático foram homogeneizados, em tubo de vidro, com 1900µL de solução clorofórmio: metanol (2:1). Foram adicionados 400µL de metanol, jato forte, e os tubos centrifugados a 3000rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo previamente pesado, onde se adicionou 800µL de clorofórmio e 640µL de NaCl 0,73%, jato forte. Após homogeneização lenta, os homogenatos foram centrifugados durante 5 minutos, a 3000rpm. A fase superior foi desprezada e a parede do tubo foi lavada 3 vezes com 600µL solução de Folch (3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água destilada e 2% de NaCl 0,2%) e colocados para secar em estufa, a 60°C. A quantidade de lipídeos extraída foi calculada por diferença de peso entre o tubo após secagem (com lipídeos) e o tubo vazio.

Para obtenção dos lipídeos totais do conteúdo cecal foram utilizados 25mg de conteúdo, aproximadamente, com as quantidades proporcionais de reagentes, e o mesmo procedimento acima.

Os extratos lipídicos foram suspensos novamente em 500µL de isopropanol para a determinação dos níveis de colesterol total e triglicerídeos, prosseguindo-se com os métodos enzimáticos já descritos nos itens 3.7.1 e 3.7.4.

3.7.6 Determinação da Glicemia

A glicemia foi determinada por meio de ensaio enzimático (kit Labtest, Brasil), cujo princípio consiste na oxidação da glicose a ácido glucônico pela ação da enzima glicose oxidase, com liberação de peróxido de hidrogênio. Este, pela ação da peroxidase, em presença de fenol e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo-avermelhado com absorção máxima de 520nm.

O sangue foi coletado utilizando-se o fluoreto como antiglicolítico, sendo 2µL de plasma transferido para uma microplaca de 96 poços (FAZIO et al, 1997), onde foram adicionados 200µL do reagente de cor, em duplicata. Para a leitura do padrão, procedeu-se da mesma forma, 2µL de padrão e 200µL do reagente de cor. Após incubação de 15 minutos a 37° C, a absorbância foi lida a 492nm em leitor de microplaca (Thermo Plate).

Para o cálculo da glicemia em mg/dL foi utilizada a seguinte fórmula (indicada no kit Labtest): Média da absorbância da amostra / média da absorbância do padrão x 100.

3.8 Avaliação do Estresse Oxidativo

3.8.1 Avaliação da Peroxidação Lipídica por TBARS

A geração de radicais livres e a peroxidação lipídica são reações extremamente rápidas, que, geralmente, são mensuradas pelos seus produtos, principalmente as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), entre as quais o malondialdeído (MDA) é o principal. A formação do MDA pela quebra de ácidos graxos poliinsaturados é um índice conveniente para se determinar o grau de peroxidação lipídica (PATOCKOVA et al., 2003).

A mensuração dos metabólitos reativos ao ácido tiobarbitúrico foi realizada em microplacas de 96 poços pelo método descrito por BUEGE e AUST (1978). Os tecidos hepáticos e renais (100mg de tecido acrescido de 1,0mL de PBS) foram triturados com um homogeneizador (Euro Turraz T20b, IKA labortechnik) e mantidos no gelo. O volume de 500µL do homogenato de cada amostra foi colocado em tubos de ensaio, onde foi adicionado 1mL de solução contendo ácido tricloroacético (TCA 15%), ácido tiobarbitúrico (TBA 0,0375%) e HCl 0,25N. As amostras foram mantidas em banho-maria fervente por 15 minutos e então colocadas sob água corrente até esfriarem. Foi adicionado aos tubos 1,5mL de álcool butílico, que foram, então, vigorosamente agitados. Após uma centrifugação a 3000rpm por 10 minutos em centrífuga de mesa (Fanem Excelsa Baby, mod. 205N), o sobrenadante foi recolhido e plaqueado em duplicata; sendo a leitura realizada a 535nm. Uma curva padrão com o MDA foi construída.

O resultado foi normalizado pelo teor de proteínas dos tecidos, mensurado pela técnica de Lowry (1951), utilizando a albumina como padrão. Assim, o resultado final foi expresso em μmol de MDA/g de proteína.

3.8.2 Dosagem da Concentração de Hidroperóxidos

O ensaio da oxidação ferrosa do composto xilenol orange consiste basicamente na oxidação de íons ferrosos (Fe^{2+}) a férricos (Fe^{3+}) sob condições ácidas pelos hidroperóxidos (NOUROOZ-ZADEH et al., 1994; BANERJEE et al., 2002). O indicador xilenol orange liga-se aos íons férricos, produzindo um cromóforo azul-arroxeadado, com coeficiente de extinção de $1,5 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ a 560nm. A concentração de hidroperóxidos pode ser estimada, uma vez que o coeficiente de extinção dos hidroperóxidos é de $4,3 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ a 560nm. Concentrações inferiores a $1 \mu\text{M}$ podem ser detectadas.

Assim, os homogenatos preparados para a técnica de TBARS foram centrifugados a 12000rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi utilizado para análise de hidroperóxidos. A mensuração foi realizada em microplaca de 96 poços (FAZIO et al., 1997). No momento da realização do ensaio, uma parte da solução FOX (mistura da solução 1mM de xilenol orange em H_2SO_4 e da solução 2,5mM do sulfato ferroso amoniacal em H_2SO_4) foi diluída em 9 partes da solução 4,4mM de BHT em metanol (grau-HPLC), obtendo-se o reagente FOX-2.

Para as dosagens foram retirados $20 \mu\text{L}$ do sobrenadante dos homogenatos de tecidos hepáticos e renais (preparados para a análise de TBARS) e foram adicionados $180 \mu\text{L}$ do reagente FOX-2, diretamente na microplaca, em duplicata. Para fazer o branco, foram utilizados $20 \mu\text{L}$ de água deionizada. Em seguida, a microplaca foi mantida em temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, a absorbância foi lida a 560nm em um leitor de microplaca (Modelar Devices, modelo Spectra Max Plus).

Paralelamente, foi realizada a redução dos hidroperóxidos com trifetilfosfina (TEP) (NOUROOZ-ZADEH et al., 1994; BANERJEE et al., 2002). Em $15 \mu\text{L}$ do sobrenadante do homogenato (preparado para a análise de TBARS) foram adicionados $5 \mu\text{L}$ de TEP 10mM em metanol, diretamente na microplaca, em duplicata, e mantida em temperatura ambiente por 30 minutos. Logo após, foram adicionados $180 \mu\text{L}$ do reagente FOX-2 em cada poço. O branco utilizado foi água deionizada ($15 \mu\text{L}$). Em seguida, a microplaca foi mantida em temperatura ambiente por 30 minutos.

Posteriormente, a absorbância foi lida a 560nm em um leitor de microplaca (Modelar Devices, modelo Spectra Max Plus).

A concentração dos hidroperóxidos da amostra foi obtida pelo cálculo seguinte: Quantidade de hidroperóxidos= Absorbância sem TPP – Absorbância com TPP.

O resultado foi expresso em μ molar, normalizado pelo teor de proteínas, determinado pela técnica de LOWRY (1951).

3.8.3 Atividade da Enzima Catalase

A enzima catalase é responsável pela decomposição do H_2O_2 : $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$. Essa reação pode ser observada diretamente pela diminuição da absorbância em 240nm. Assim, a medida da atividade de catalase baseia-se nesse decaimento da absorbância em 240nm, sendo a quantificação feita pela diferença na absorbância por unidade de tempo (AEBI, 1984).

Resumindo, homogenatos com 100mg de tecido hepático e renal foram preparados em tampão fosfato 50mM e centrifugados a 12000rpm por 10 minutos (centrífuga Fanem Excelsa Baby, mod. 205N); em seguida, 25 μ L do sobrenadante diluído (1:25) foram colocados em 1mL de tampão fosfato 50mM, em uma cubeta de quartzo. Foram adicionados 25 μ L de solução de H_2O_2 0,3M e lida a absorbância em 240nm durante 1 minuto em espectrofotômetro (modo cinético). Os cálculos foram feitos pela diferença de leitura no tempo final pelo tempo inicial, multiplicado pelo fator de diluição e dividido pelo volume (mL) da amostra. O resultado foi expresso por concentração de proteína (mg/mL), dosada pelo método de LOWRY (1951).

3.8.4 Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD)

A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do radical superóxido (O_2^-) em H_2O_2 e O_2 . A medida da atividade da SOD é baseada nessa habilidade de consumir o radical O_2^- , diminuindo a razão de autoxidação do pirogalol (1,2,3- trihidroxibenzeno) (adaptado de DIETERICH et al., 2000).

A técnica consistiu em: 100mg de tecido hepático e renal foram homogeneizados com 1mL de tampão fosfato (50mM), centrifugados a 12000rpm por 10 minutos (centrífuga Fanem Excelsa Baby, mod. 205N); em seguida, 30 μ L do sobrenadante foram pipetados diretamente em placa de 96 poços e foram acrescentados: 99 μ L de tampão fosfato, 6 μ L de MTT (brometo de dimetiltiazol-difeniltetrazolium) e 15 μ L de

pirogalol. Para o branco, o pirogalol foi substituído por tampão fosfato e para o padrão, a amostra foi substituída por tampão fosfato. Após 5 minutos de incubação a 37°C, a reação foi interrompida com 150µL de DMSO (dimetil sulfóxido) e a absorbância foi lida em 570nm.

Para o cálculo do resultado foi considerado que uma unidade de SOD é capaz de evitar a autooxidação de 50% de pirogalol do padrão. O resultado foi expresso em unidades de SOD por mg de proteína (dosada de acordo com LOWRY, 1951).

3.8.5 Dosagem de Anticorpos Anti-LDL oxidada

Para determinação de anticorpos anti-LDL oxidada no soro, as seguintes etapas foram realizadas:

a) 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 3000rpm por 10 minutos, em centrífuga de mesa (Fanem Excelsa Baby, modelo 205N). O soro foi separado e nele foram adicionados os conservantes: aprotinina, benzamidina, azida sódica 5% com EDTA 5% e clorafenicol 0,1%, PMSF 0,5mM em DMSO. O soro teve sua densidade elevada para 1,21 com solução de brometo de potássio (KBr). Em seguida, 3mL deste soro foram colocados em tubos de polipropileno, com volume total de 10mL, próprios para ultracentrifuga Sorvall Ultra pro-80/Du Pont, utilizando o rotor 875T. Após o soro, 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 2,5 horas a 50.000rpm/ 4°C, para separação das lipoproteínas. Após a centrifugação, a camada composta pela LDL foi retirada e submetida à diálise em solução de tampão fosfato (PBS), por 24 horas a 4°C, com 3 trocas do tampão durante esse período. Por último, o material foi filtrado e guardado estéril em recipiente protegido de luz e sob atmosfera de nitrogênio a 4°C (CHUNG et al., 1986).

b) Oxidação da LDL

Para a oxidação da LDL foi adicionado CuCl_2 1mM, para concentração final de $5\mu\text{M}$. Após 3,5 horas de oxidação, a 37°C , sob agitação constante, e envolto em papel alumínio, a reação foi finalizada com EDTA 0,5M (proporção de 2 EDTA: 1 CuCl_2).

c) Quantificação dos anticorpos anti - LDL oxidada

Os anticorpos foram dosados por ELISA (LEE et al., 1999), em ensaio realizado resumidamente da seguinte forma: microplacas de poliestireno (Nunc, Maxisorp, Denmark) foram incubadas com $100\mu\text{L}$ por poço de solução do antígeno (LDL oxidada e nativa, com $50\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína) diluído em salina fisiológica, por 24 horas, em temperatura ambiente. Após o período de sensibilização, as placas foram incubadas por uma hora, com $200\mu\text{L}$ de uma solução BSA 1,0% em PBS, por poço, para bloqueio, a 37°C . A solução de bloqueio foi desprezada, as placas foram lavadas 5 vezes com salina fisiológica contendo 0,05% de Tween 20 (SIGMA Chemical Co., St Louis, MO, USA) e incubadas a temperatura ambiente, *overnight*, com $100\mu\text{L}$ por poço do soro diluído 1:10. As placas foram lavadas 5 vezes com salina-Tween 0,05% e incubadas, por 2 horas a 37°C , com $100\mu\text{L}$ de uma solução de IgG peroxidase, na diluição 1:5000. As placas, após serem lavadas 5 vezes com salina-Tween, foram incubadas no escuro, com $100\mu\text{L}$ de uma solução 10mL de tampão citrato (pH=5,0) contendo $40\mu\text{l}$ de H_2O_2 e 10mg de ortofenileno-diamino (OPD) para o desenvolvimento de cor, por reação enzimaticamente catalisada. Após 30 minutos de incubação, a reação foi interrompida pela adição de $30\mu\text{L}$ por poço de H_2SO_4 1:20. A absorbância a 492 nm foi lida em leitor automático (Model 450 microplate Reader, Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Os resultados foram obtidos pela diferença entre LDL oxidada e LDL nativa.

3.9 Avaliação do Desenvolvimento da Aterosclerose

3.9.1 Área de Lesão na Aorta Torácica e Abdominal

A lesão aterosclerótica (deposição lipídica) nas aortas foi analisada após coloração com corante Sudan IV. Para tanto, cada aorta foi cuidadosamente retirada, dissecada e toda a camada adventícia foi retirada, na extensão da válvula aórtica até a

bifurcação ilíaca; em seguida, foi lavada em PBS e armazenada a -80°C , para posterior quantificação da placa.

Para a coloração, as aortas foram abertas longitudinalmente e fixadas em solução de formol-sacarose (4% paraformaldeído, 5% de sacarose, $20\mu\text{mol/L}$ de BHT, e $2\mu\text{mol/l}$ EDTA, pH 7,4) a 4°C , por 12 horas. Depois de fixadas, as aortas foram deixadas em etanol 70% durante 5 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 5 minutos em etanol 80%, afim de que apenas as placas de gordura permanecessem 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 resultado foi expresso em porcentagem da lesão aterosclerótica em relação à área total da aorta, de acordo com o cálculo:

$$\text{Área da lesão aterosclerótica (\%)} = \frac{\text{área da lesão aterosclerótica} \times 100}{\text{área total da aorta}}$$

3.9.2 Histologia da Válvula Aórtica

Os corações foram retirados e cortados na linha mediana, sendo utilizada a parte proximal, onde se localiza a válvula aórtica. Essa foi primeiramente fixada em solução de formol 10% por 5 horas e, em seguida, transferida para uma solução de sacarose a 30% em PBS por 24 horas, para desidratação do tecido. O tecido foi, então, incluído em *Tissue Freezing Medium* ou OCT (Jung Tissue Freezing Medium; Leica Microsystems, Wetzlar - Germany) e cortados em criostato (secções de $10\mu\text{m}$). Os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina, codificados e submetidos à análise morfométrica das lesões. Foram selecionados 10 cortes, amostrando uma extensão média de $250\text{-}300\mu\text{m}$ (PAIGEN et al., 1987), de acordo com as estruturas anatômicas referenciais da válvula aórtica. Os cortes foram fotografados com câmera (modelo PL-A662- MediaCybernetics®) acoplada a microscópio (aumento de 100x) e a medida das áreas de lesão feita com o auxílio do *software* analisador de imagens Image-Pro Plus versão 6.3 (Image-Pro Plus Software, Bethesda Maryland- USA).

O cálculo da lesão média por animal foi feito somando-se todas as medidas dos 10 cortes, representando o valor da área total de lesão.

3.9.3 Imunohistoquímica para Macrófagos

Cortes histológicos (secções de 10µm) da raiz aórtica em OCT (Jung Tissue Freezing Medium; Leica Microsystems, Wetzlar - Germany) foram fixados em acetona gelada por 10 minutos para remoção do OCT. O segundo passo foi a inibição da peroxidase endógena, em que os cortes foram incubados com 0.3% de H₂O₂ em solução de 70% metanol/PBS durante 20 minutos. Após uma lavagem com PBS (pH 7,4) por 2 minutos, os cortes receberam o bloqueio com NGS (soro normal de cabra) diluído 1:50 (2%) em PBS/BSA 1% e foram incubados por 30 minutos em câmara úmida. Em seguida, 40µL do anticorpo primário de rato anti-macrófagos de camundongo MCA519G (MOMA) diluído 1:100 em PBS/BSA 1% foram adicionados aos cortes, exceto no controle negativo, onde foi colocado apenas PBS/BSA 1%. Estes foram incubados por 1 hora, à temperatura ambiente, em câmara úmida. Após 3 lavagens com PBS 1x (3 minutos cada), foram pipetados 40µL do anticorpo secundário de cabra anti- IgG de rato (HRP) (Serotec STAR72) diluído 1:200 em PBS/BSA 1% em todos os cortes, que foram incubados durante 40 minutos na câmara úmida. Os cortes foram novamente lavados 3 vezes com PBS 1x (3 minutos cada) e foi aplicada a solução diluída de diaminobenzidina (Sigma) (40 µL/corte) ao lado do microscópio para checar a coloração do corte, em que os macrófagos são corados de marrom (GIJBELS et al., 1999). As lâminas foram contra coradas com hematoxilina.

Para quantificação da área da placa aterosclerótica ocupada por macrófagos, os cortes foram fotografados com câmera (modelo PL-A662 - MediaCybernetics®) acoplada a microscópio (aumento de 100x) analisadas pelo *software* Image-Pro Plus versão 6.3 (Image-Pro Plus Software, Bethesda Maryland - USA). O resultado expresso como porcentagem da área total da placa.

3.10 Análises Estatísticas

Para verificação da normalidade dos dados, foram utilizados os testes D'agostino and Pearson e Kolmogorov-Smirnov. Para detecção de *outliers* foi realizado o teste de Grubbs (dados paramétricos). A comparação entre os grupos experimentais foi feita pelo teste t de *Student*, para dados paramétricos, e pelo teste Mann Whitney,

no caso de dados não paramétricos. As análises foram feitas no *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego California – USA). Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão ou mediana (mínimo-máximo), sendo considerado um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

IV RESULTADOS

4.1 Contagem Total de BAL e Leveduras no Quefir

A Tabela 3 apresenta os resultados da contagem total microbiológica de BAL e leveduras no quefir preparado para o estudo, 24 horas após a fermentação da solução açucarada pelos grãos de quefir.

Tabela 3 – Contagem total de microorganismos (BAL e leveduras) na amostra de quefir utilizada no estudo.

Microorganismos	Contagem ^a (UFC/mL)
BAL	$4,3 \times 10^8$
LEVEDURAS	$6,6 \times 10^5$

^a 24h após fermentação da solução nutriente pelos grãos de quefir.

4.2 Ingestão Dietética e de Líquido

O consumo médio de dieta e líquido por animal, ao longo das 4 semanas experimentais, estão apresentados na Tabela 4. A ingestão da dieta comercial pelos ApoE^{-/-} foi similar nos dois grupos em todas as semanas experimentais. O quefir, portanto, não interferiu no consumo alimentar dos camundongos.

Em relação à aceitabilidade do líquido experimental, o quefir dado em substituição à água (controle) foi bem tolerado pelos animais, visto que também não houve diferença significativa no consumo de líquido entre os grupos (Tabela 4).

Tabela 4 - Ingestão dietética e de líquido (água ou quefir) diária por animal.

Ingestão diária/ animal	Controle (água)	Quefir
Dieta (g)	2,97 ± 0,10	2,89 ± 0,14
Líquido (mL)	3,41 ± 0,14	3,46 ± 0,29

Dados apresentados como média ± erro padrão.

4.3 Evolução Ponderal

De acordo com a aferição semanal do peso dos animais ApoE^{-/-}, verificou-se que o crescimento de ambos os grupos foi semelhante ao longo das semanas experimentais (Figura 9). Portanto, a ingestão do quefir não influenciou no ganho de peso dos camundongos ao longo do período experimental.

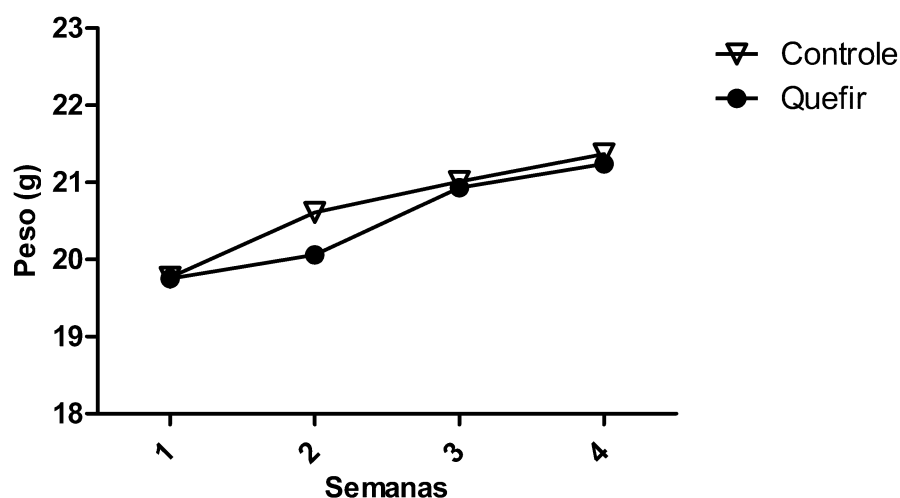


Figura 9: Evolução ponderal de camundongos APOE^{-/-} alimentados com dieta comercial, recebendo quefir ou água por 4 semanas. Controle: n=11 e Quefir: n=12. Resultados estão expressos em média do peso em gramas; teste t de Student, p>0,05.

4.4 Efeito do Quefir no Metabolismo Lipídico e Glicemia

A investigação do metabolismo lipídico é essencial no estudo da aterosclerose, visto que a dislipidemia constitui fator desencadeante da doença e importante em seu desenvolvimento. Além disso, a hiperglicemia também é um fator de risco para a aterosclerose.

4.4.1 Perfil Lipídico Sérico

Em relação ao perfil lipídico dos camundongos ApoE^{-/-}, não foi observada diferença estatística entre a colesterolemia inicial (Controle= 375,8mg/dL ± 16,9; Quefir= 358,9mg/dL ± 14,6) e final (Controle= 358,7mg/dL ± 16,1; Quefir= 341,1mg/dL ± 13,2) dos animais (p>0,05). A dieta comercial oferecida não contribuiu para aumento dos níveis colesterolêmicos.

Os parâmetros lipídicos deste experimento, após as 4 semanas, estão apresentados na Tabela 5. A concentração de colesterol total sérico e a fração aterogênica foram semelhantes entre os grupos. No entanto, a ingestão do quefir nesse período foi capaz de elevar significativamente os níveis de HDL, acarretando na redução do índice aterogênico, que representa uma melhora no risco de desenvolvimento da aterosclerose.

Além disso, houve redução significativa dos níveis de triglicerídeos séricos do grupo Quefir em relação ao Controle.

Tabela 5: Perfil lipídico sérico após 4 semanas de camundongos APOE^{-/-} alimentados com dieta comercial, recebendo quefir ou água.

Parâmetro	Controle	Quefir	p
Colesterol total (mg/dL) ^a	358,7 ± 16,1	341,1 ± 13,2	0,40
HDL (mg/dL) ^b	11,2 (5,7 - 47,6)	21,3 (10,2 - 62,9)*	0,04
Fração aterogênica (mg/dL) ^a	339,1 ± 19,8	308,8 ± 14,4	0,22
Índice aterogênico ^a	31,9 ± 6,3	16,1 ± 3,3*	0,02
Triglicerídeos (mg/dL) ^{a,c}	113,3 ± 9,1	85,7 ± 9,7*	0,05

^aResultados expressos como média ± erro padrão, teste t de *Student*.

^bResultado expresso como mediana (mínimo – máximo), teste Mann Whitney, *p≤0,05.

^cn=11 por grupo, demais parâmetros- Controle: n=11 e Quefir: n=12.

4.4.2 Perfil Lipídico Hepático e Cecal

A ingestão do quefir por 4 semanas não modificou a quantidade de lipídeos totais, colesterol e triglicerídeos no fígado e no conteúdo cecal dos camundongos APOE^{-/-} comparado ao grupo Controle (Tabela 6).

Tabela 6 - Perfil lipídico hepático e cecal de camundongos APOE^{-/-} alimentados com dieta comercial, recebendo quefir ou água por 4 semanas.

Parâmetro (mg/g)	Controle	Quefir	p
Lipídeos totais hepáticos ^a	114,0 ± 7,7	126,3 ± 11,9	0,40
Colesterol total hepático ^b	3,09 ± 0,26	2,99 ± 0,34	0,71
Triglicerídeos hepáticos ^c	12,54 ± 0,31	13,61 ± 0,47	0,07
Lipídeos totais cecais ^d	94,10 ± 5,12	78,54 ± 11,88	0,27
Colesterol total cecal ^d	3,88 ± 0,87	4,71 ± 0,66	0,45
Triglicerídeos cecais ^e	4,65 ± 0,87	3,76 ± 0,60	0,42

Dados apresentados como média ± erro padrão, teste t de *Student*, p>0,05.

^aControle: n=11 e Quefir: n=12; ^bControle: n=10 e Quefir: n=9; ^cControle e Quefir: n=10;

^dControle: n=9 e Quefir: n=12.; ^eControle e Quefir: n=5.

4.4.3 Glicemia

A dosagem da glicemia ao final do período experimental não evidenciou diferença significativa entre os grupos, conforme mostrado na Figura 10.

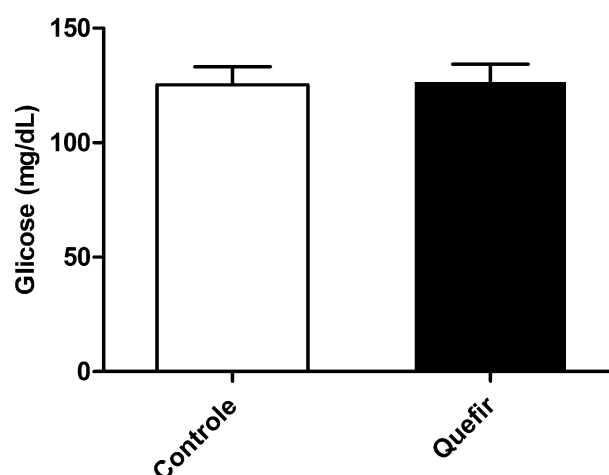


Figura 10: Glicemia após 4 semanas de camundongos APOE^{-/-} alimentados com dieta comercial, recebendo quefir ou água; grupo Controle: n=11 e Quefir: n=12, p=0,91. Resultados expressos em média ± erro padrão, teste t de *Student*.

4.5 Efeito do Quefir no Estresse Oxidativo

4.5.1 TBARS em Tecido Hepático e Renal

O quefir não alterou a peroxidação lipídica (avaliada pela técnica de TBARS) em relação ao grupo Controle, no fígado e rim dos animais APOE^{-/-} (Figura 11).

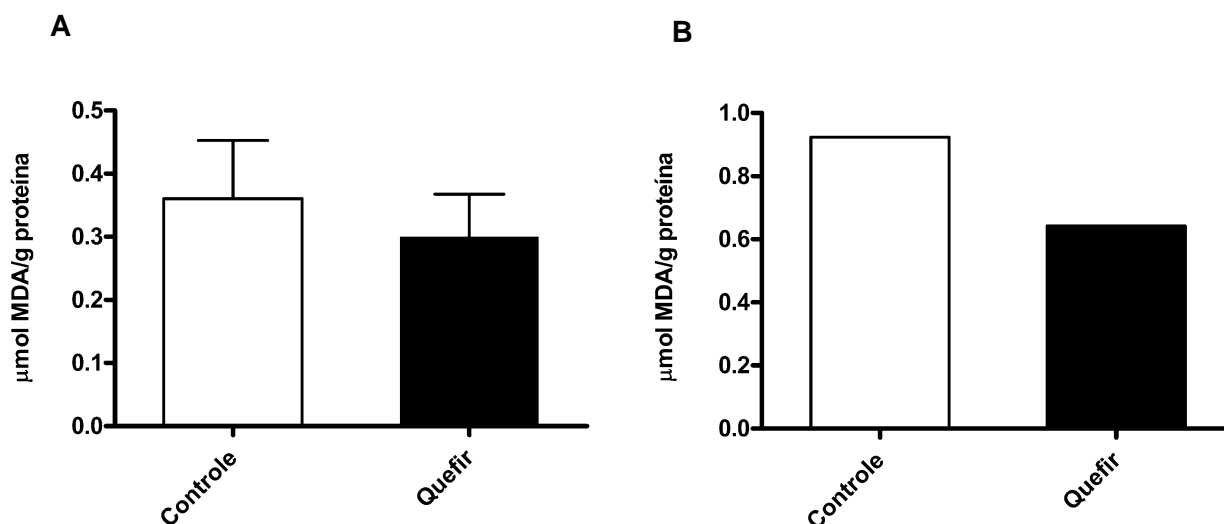


Figura 11: Peroxidação lipídica avaliada pela dosagem de TBARS em fígado (A) e rim (B) de camundongos APOE^{-/-} alimentados com dieta comercial, recebendo quefir ou água por 4 semanas, Controle: n=11 e Quefir: n=12. (A) Resultados expressos em média \pm erro padrão; teste t de *Student*, $p=0,60$. (B) Resultados expressos em mediana, teste Mann Whitney, $p=0,41$.

5.2 Hidroperóxidos em Tecido Hepático e Renal

Os animais APOE^{-/-} alimentados com dieta comercial, que receberam o quefir por 4 semanas, apresentaram uma menor concentração de hidroperóxidos no fígado ($p=0,02$) comparada ao grupo Controle (Figura 12A), indicando uma menor peroxidação lipídica nesse órgão. No rim, esse parâmetro não diferiu entre os grupos (Figura 12B).

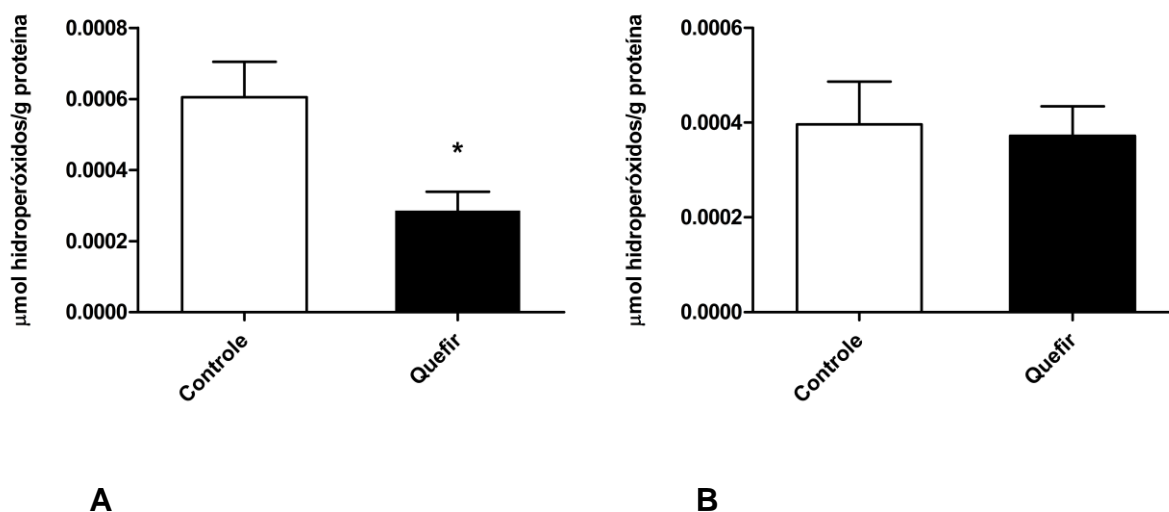


Figura 12: Avaliação do estresse oxidativo pela concentração de Hidropéroxidos em camundongos APOE^{-/-} alimentados com dieta comercial, recebendo quefir ou água por 4 semanas. (A) Tecido hepático, Controle: n=11 e Quefir: n=9. Resultados expressos em média \pm erro padrão; teste t de *Student*, *p=0,02. (B) Tecido renal, Controle: n=11 e Quefir: n=12. Resultados expressos em média \pm erro padrão; teste t de *Student*, p=0,83.

4.5.3 Enzimas Antioxidantes em Tecido Hepático e Renal

Como visto na seção anterior, o quefir mostrou-se eficaz em reduzir o estresse oxidativo no fígado dos animais APOE^{-/-}. Assim, a etapa seguinte consistiu na avaliação da atividade das enzimas antioxidantes SOD e catalase no mesmo órgão, sendo que a última também foi avaliada no rim.

A atividade da SOD no fígado não foi alterada pela ingestão de quefir por 4 semanas (Figura 13).

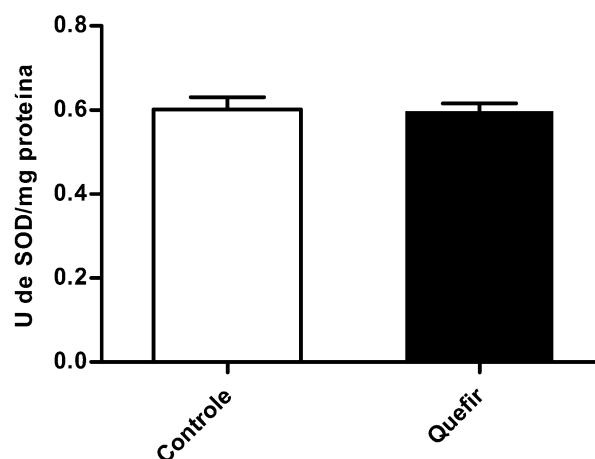


Figura 13: Atividade da enzima antioxidante Superóxido dismutase (SOD) em tecido hepático de camundongos APOE^{-/-} alimentados com dieta comercial, recebendo quefir ou água por 4 semanas. Controle: n=6 e Quefir: n=7. Resultados expressos em média \pm erro padrão, teste t de Student, p= 0,89.

Em contrapartida, o quefir foi capaz de reduzir a atividade da catalase no fígado com forte tendência à significância estatística (p=0,056), como pode ser observado na Figura 14. No rim, não foi observada diferença estatística entre os grupos.

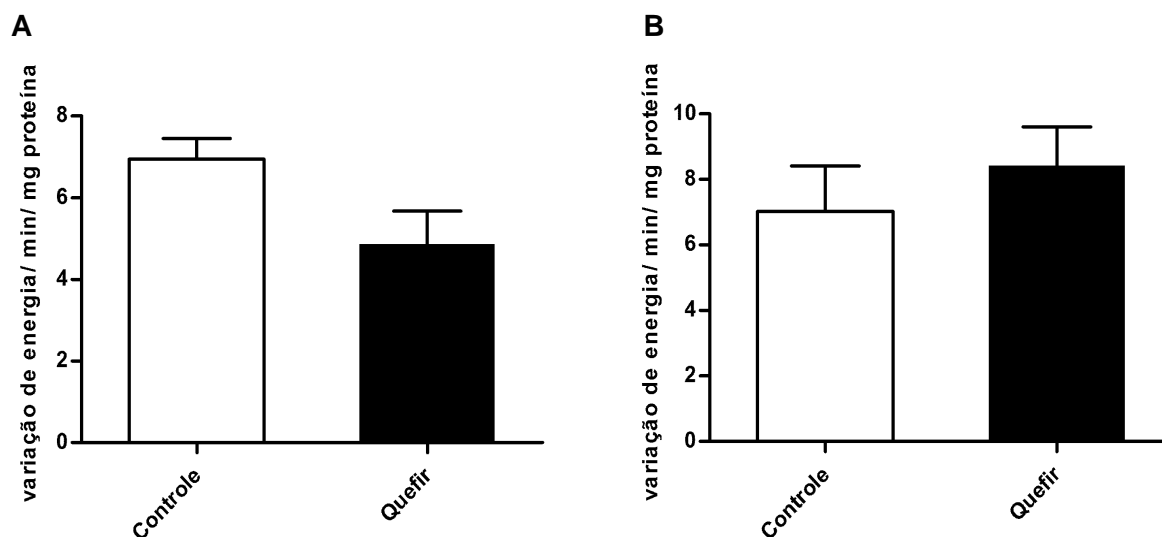


Figura 14: Atividade da enzima antioxidante Catalase em fígado (A) e rim (B) de camundongos APOE^{-/-} alimentados com dieta comercial, recebendo quefir ou água por 4 semanas. Resultados expressos em média \pm erro padrão. (A) n=10, teste t de Student, p= 0,06. (B) n=6, teste t de Student, p= 0,46.

4.5.4. Anticorpos Anti-LDL oxidada Séricos

A quantidade de imunoglobulinas anti-LDL oxidada não diferiu entre os grupos, como pode ser observado na Figura 15. Logo, o quefir não exerceu efeito sobre a oxidação das LDL.

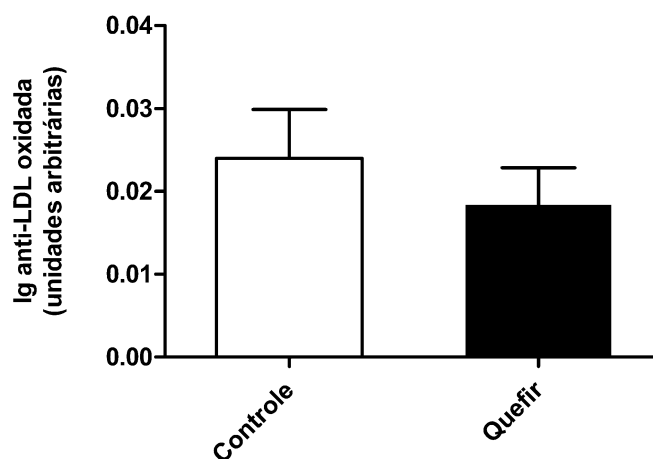


Figura 15: Imunoglobulinas anti-LDL oxidada no soro de camundongos APOE^{-/-} alimentados com dieta comercial recebendo água ou quefir por 4 semanas, n=10. Resultados expressos em média \pm erro padrão, teste t de *Student*, p= 0,46.

4.6 Efeito do Quefir no Desenvolvimento da Aterosclerose

4.6.1 Área da Lesão Aterosclerótica na Aorta Torácica e Abdominal

A área de lesão aterosclerótica na aorta torácica e abdominal dos camundongos APOE^{-/-}, após as 4 semanas experimentais, foi similar entre os grupos (Figura 16).

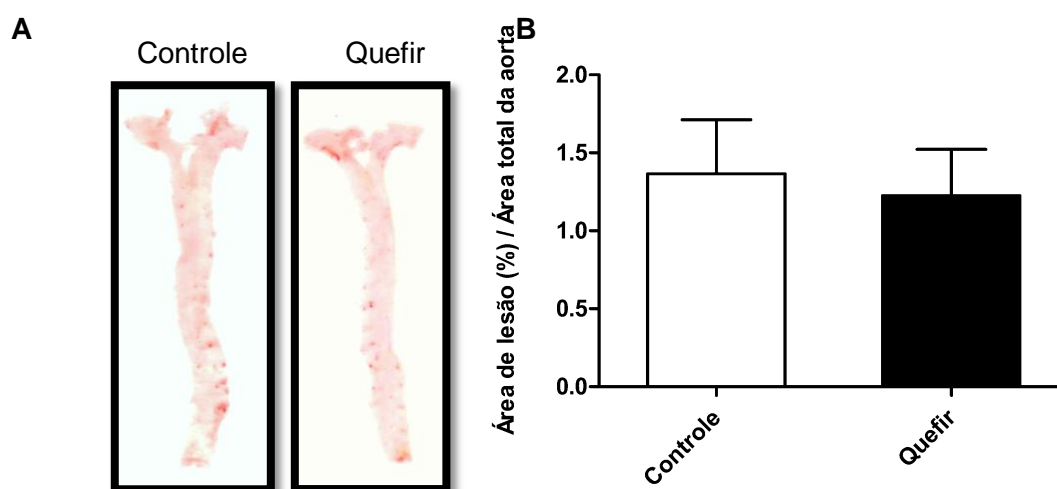


Figura 16: Área de lesão nas aortas torácica e abdominal dos camundongos ApoE^{-/-} alimentados com dieta comercial, recebendo água ou quefir, após 4 semanas. (A) Foto das aortas coradas com Sudan IV. (B) Porcentagem da área de lesão. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão (n=10), teste t de *Student*. p= 0,76.

4.6.2 Área da Lesão Aterosclerótica na Raiz Aórtica

Na raiz aórtica, especificamente na válvula aórtica, a área de lesão aterosclerótica mensurada nos animais ApoE^{-/-} não diferiu significativamente entre os grupos, sugerindo que o consumo do quefir por 4 semanas não exerceu efeito sobre a placa (Figura 17).

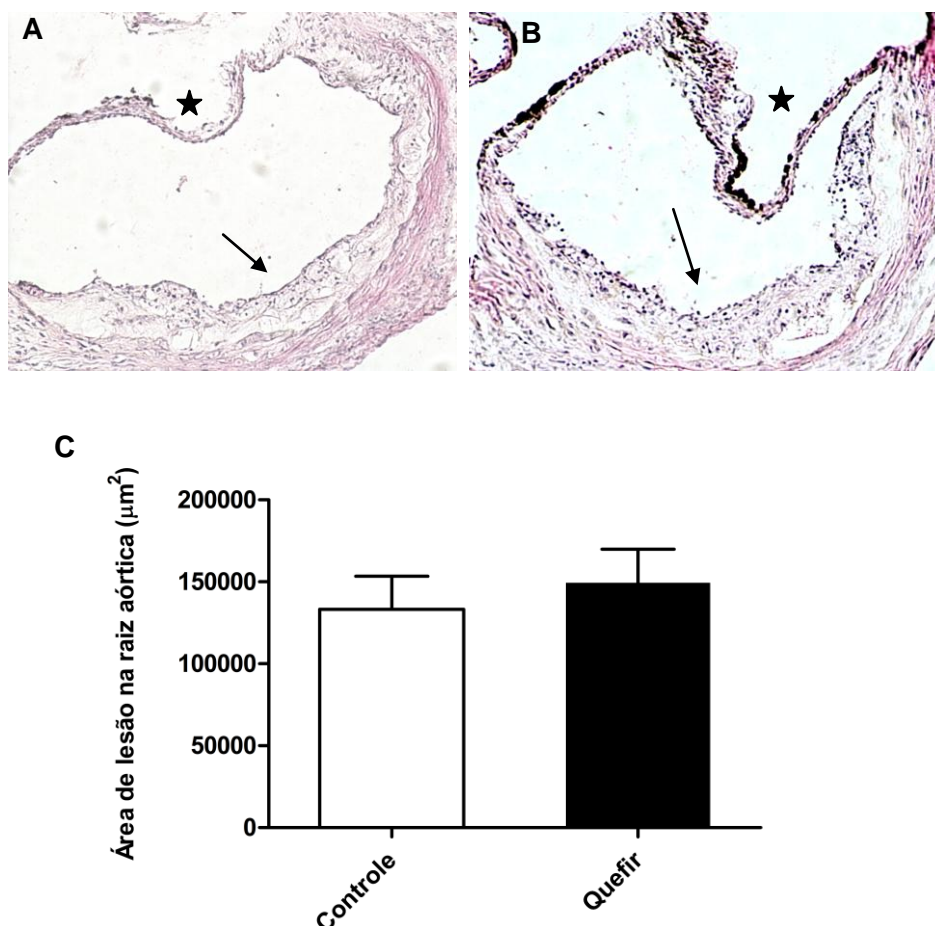


Figura 17: Área de lesão aterosclerótica na válvula aórtica de camundongos ApoE^{-/-} alimentados com dieta comercial, recebendo quefir ou água por 4 semanas, n=6. (A) e (B) Histologia das válvulas aórticas mostrando características das lesões dos grupos Controle e Quefir, respectivamente. Cortes histológicos corados em Hematoxilina-Eosina, aumento de 100x. A seta indica a lesão, a estrela indica a referência anatômica. (C) Representação gráfica da área de lesão. Resultados expressos em média ± erro padrão, teste t de *Student*, p= 0,59.

4.6.3 Imunohistoquímica para Macrófagos

Pela imunohistoquímica realizada na válvula aórtica, não se observou diferença significativa na porcentagem de macrófagos da área total da placa aterosclerótica entre o grupo que recebeu o quefir e o grupo Controle (Figura 18).

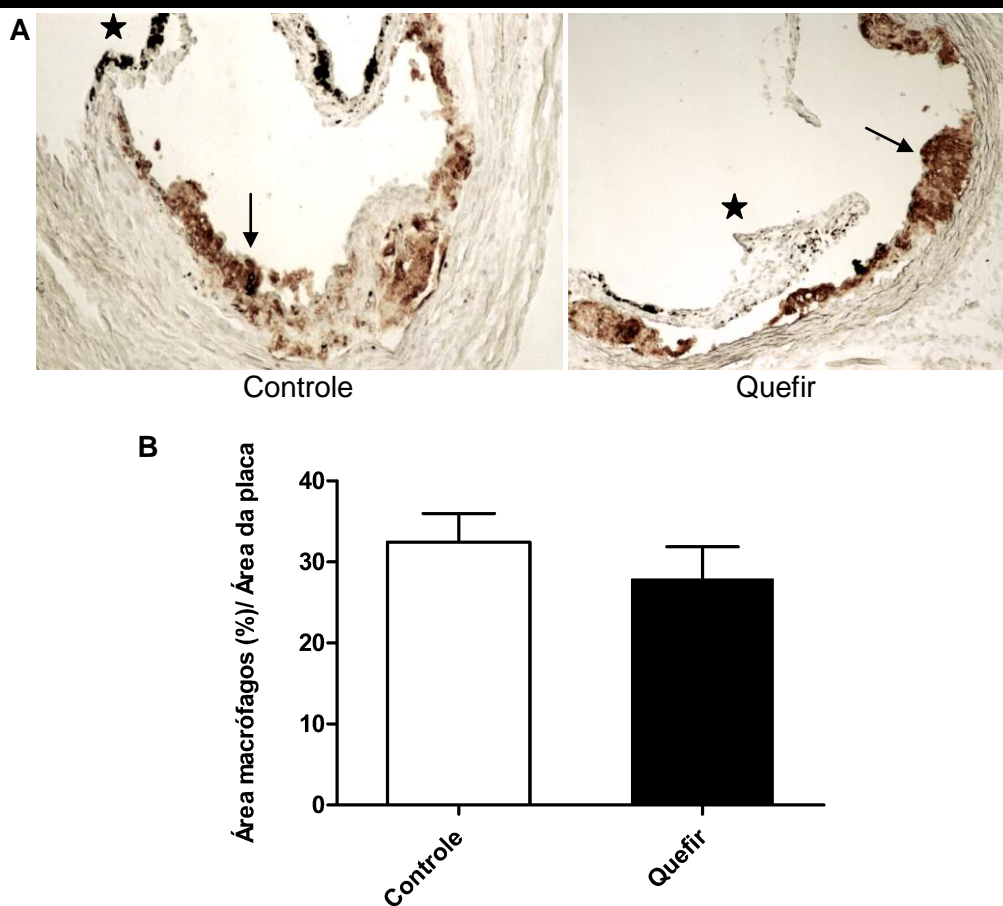


Figura 18: Imunohistoquímica para macrófagos na placa aterosclerótica da válvula aórtica em camundongos ApoE^{-/-} alimentados com dieta comercial, recebendo quefir ou água por 4 semanas. n=5 por grupo. (A) Macrófagos corados em marrom na placa, aumento de 100x. Contra- coloração com hematoxilina. Seta aponta região de macrófagos na lesão. Referência anatômica indicada pela estrela (B) Representação gráfica da área ocupada por macrófagos na lesão. Resultados expressos em média ± erro padrão, teste t de Student, p=0,42.

V DISCUSSÃO

Conhecido há milhares de anos, o quefir é uma bebida fermentada constituída de bactérias e leveduras simbiotes, metabólitos produzidos durante a fermentação, além de polissacarídeos, lipídeos, proteínas e restos celulares (SCHNEEDORF & ANFITEATRO, 2004). No Brasil, o consumo do quefir é baseado em alegações populares de uma bebida milagrosa que traz saúde e longevidade. De fato, várias propriedades probióticas do quefir já foram relatadas na literatura e há trabalhos que avaliaram seus efeitos como agente hipocolesterolêmico, antioxidante ou antiinflamatório, contudo os resultados ainda não são conclusivos. Diante da possibilidade desse alimento apresentar as propriedades terapêuticas citadas, despertou-se o interesse em pesquisar se sua ingestão exerceria algum efeito na aterosclerose, uma doença inflamatória, que tem a hipercolesterolemia, assim como inflamação e o estresse oxidativo como importantes fatores de risco.

A bebida preparada pela fermentação dos grãos de quefir em solução aquosa de açúcar mascavo é uma forma bastante consumida pela população brasileira. A produção é caseira, e o tempo de fermentação dos grãos em solução é de 24 horas à temperatura ambiente. O quefir deve ser consumido até 48 horas após a retirada dos grãos, segundo receitas populares. No presente trabalho, esse procedimento foi utilizado para preparação do quefir, que foi oferecido aos camundongos por 48 horas, e, então, era substituído por um quefir novo. Pesquisas sobre as propriedades funcionais do quefir aquoso são bem recentes e ainda escassas na literatura. Assim, o intuito do presente estudo foi verificar se o quefir aquoso ingerido por camundongos ApoE^{-/-} (que desenvolvem aterosclerose espontaneamente) durante 4 semanas, exerceria efeito no metabolismo lipídico, estresse oxidativo e desenvolvimento da placa aterosclerótica.

Os grãos de quefir utilizados neste estudo foram previamente analisados quanto a sua composição microbiológica em bactérias e leveduras (concentração acima de 10⁵UFC/mL) (Tabela 1). As bactérias predominantes foram do gênero *Lactobacillus*, enquanto três diferentes gêneros de leveduras foram encontrados. A composição microbiológica de grãos de quefir é bastante variável em número e espécies de microorganismos, como mostram diversos estudos da literatura (ÂNGULO et al., 1993; SIMOVA et al., 2002; LIU et al., 2004; WITTHUHN et al., 2004; SEYDIM et al., 2005; YANG et al., 2007; ZHOU et al., 2009), e varia de acordo com a origem dos grãos e sua forma de cultivo. O leite é um meio mais rico em nutrientes do que a solução com açúcar mascavo, o que influencia diretamente na diversidade da microbiota dos grãos

de quefir. Mas vale ressaltar que, assim como nos grãos deste estudo, bactérias ácido-láticas e leveduras sempre são encontradas nos grãos de quefir.

A contagem total de bactérias ácido-láticas (BAL) e leveduras no quefir produzido no presente estudo mostrou que o fermentado aquoso possuía uma quantidade expressiva desses microrganismos após a fermentação de 24 horas (Tabela 4). Embora não existam especificações para o quefir aquoso em nenhuma legislação, comparando a contagem obtida com a definição do quefir (leite fermentado) descrita pela FAO/WHO (2001), em que a soma total de microrganismos específicos constituintes da cultura mãe do quefir deve ser no mínimo 10^7 UFC/g e de leveduras, no mínimo, 10^4 UFC/g, os valores encontrados estão coerentes. Na legislação brasileira (ANVISA, 2010), a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo. Nesse caso, são consideradas determinadas espécies de bactérias, em sua maioria do gênero *Lactobacillus*, inclusive o *L. casei*, que também foi identificado nos grãos de quefir utilizados neste estudo. Assim, a contagem total de microrganismos do quefir aquoso utilizado nos experimentos parece satisfatória para considerá-lo um probiótico, se seus efeitos benéficos à saúde forem comprovados.

Muitas bactérias ácido-láticas são probióticos já conhecidos por seus benefícios ao trato intestinal, como balancear a microbiota, melhorar a imunidade e o trofismo das células (LEE et al., 2009), mas também pode exercer efeito hipocolesterolêmico, já demonstrado por diversos estudos (USMAN & HOSONO, 2000; CHIU et al., 2006; JAIN et al., 2009; LEE et al., 2009; WANG et al., 2009). Assim, como o quefir utilizado neste estudo apresentou uma elevada concentração de BAL, também poderia exercer atividade hipocolesterolêmica. Os possíveis mecanismos pelos quais as bactérias ácido-láticas exerceriam essa atividade hipocolesterolêmica seriam: (a) ligação direta das células bacterianas ao colesterol e sua assimilação, impedindo sua absorção pelo organismo (GILLILAND et al., 1985); (b) desconjugação dos sais biliares e produção de ácidos biliares livres, que são mais susceptíveis à excreção, diminuindo a reabsorção dos mesmos via entero- hepática e favorecendo a utilização de colesterol para síntese de novos sais biliares (St-ONGE et al., 2002; XIAO et al., 2003); (c) inibição da HMG-CoA redutase (síntese de colesterol) por alguns metabólitos das bactérias ácido-láticas, como o ácido propiônico (FUKUSHIMA & NAKANO, 1996).

A bactéria *Lactobacillus plantarum*, identificada nos grãos de quefir do presente trabalho, apresenta grande potencial em melhorar o perfil lipídico, como foi constatado

num estudo recente realizado por WANG et al. (2009). Os autores avaliaram os efeitos da *L. plantarum* MA2 isolado de grãos de quefir do Tibet (dose de 10^{11} cels/dia/animal) no metabolismo lipídico de ratos alimentados com dieta rica em colesterol por 5 semanas. No grupo que recebeu a *L. plantarum*, houve redução dos níveis séricos de colesterol total, LDL e triglicerídeos, bem como dos níveis hepáticos de colesterol total e triglicerídeos, além de aumento na excreção fecal de colesterol e ácido propiônico.

No presente estudo, a ingestão dietética e, especialmente, a ingestão de quefir foram semelhantes entre os grupos, indicando boa aceitação da bebida fermentada pelos camundongos ApoE^{-/-}. A evolução ponderal também não foi influenciada pela ingestão do quefir. Isso mostra que o uso do quefir, na forma que foi administrada, não influenciou no crescimento dos animais.

A investigação de possíveis efeitos do quefir no metabolismo lipídico, estresse oxidativo e desenvolvimento da placa aterosclerótica foi realizada inicialmente em experimentos com camundongos LDLr^{-/-} submetidos à dieta aterogênica (Apêndice A), mas nenhum parâmetro avaliado foi modificado pela ingestão da bebida fermentada. Houve apenas uma discreta tendência à elevação dos níveis de HDL (p=0,09). Esta tendência, porém, não refletiu na fração aterogênica nem no índice aterogênico, provavelmente devido aos níveis muito elevados de colesterol total sérico atingidos após as 6 semanas experimentais, demonstrando a influência da dieta aterogênica e da modificação genética desses camundongos no desenvolvimento de hipercolesterolemia grave (FAZIO & LINTON, 2001; HANSSON & LIBBY, 2006). A partir desses resultados prévios e considerando-se que a maioria dos estudos que obtiveram efeitos positivos do quefir como agente hipocolesterolêmico foi realizada em animais que não desenvolvem hipercolesterolemia (TAMAI, 1996; PEREIRA, 2007; LIU et al., 2006), o presente estudo foi desenhado para verificar os efeitos do quefir (na mesma concentração do estudo piloto) em outro modelo animal de aterosclerose que apresenta hipercolesterolemia intermediária (ApoE^{-/-}).

A avaliação do perfil lipídico dos camundongos ApoE^{-/-} alimentados com dieta comercial, mostrou que o quefir foi capaz de elevar a concentração sérica de HDL, reduzir a fração aterogênica, bem como os níveis de triglicerídeos, após as 4 semanas experimentais. Somente dois estudos foram realizados com o quefir aquoso no perfil lipídico de animais experimentais. Os resultados do presente trabalho estão em concordância com aqueles encontrados por PEREIRA (2007), que também constatou elevação dos níveis séricos de HDL, diminuição dos níveis de triglicerídeos e de VLDL,

em ratos tratados com dieta hiperlipídica que receberam 1,5mL por dia (8,6g/Kg) de quefir em solução de açúcar mascavo na mesma concentração deste estudo (50g/L) durante 21 dias. Entretanto, esses achados não concordam com BISSOLI (2005), em que a suplementação dietética (4%) de quefir em solução de açúcar mascavo (200g de grãos de quefir/ 400mL solução nutriente/ 48horas) durante 30 dias em coelhos não promoveu alteração no perfil lipídico sérico dos animais. Somente o grupo de coelhos que foi suplementado com os grãos de quefir na dieta (4%) apresentou níveis significativamente elevados de colesterol total e HDL.

Outros estudos com quefir no leite também mostraram melhora do perfil lipídico, (TAMAI et al., 1996), caracterizado por diminuição dos níveis de colesterol total e fosfolípidos séricos no grupo de ratos alimentados com dieta hiperlipídica suplementada com o quefir. Nesse caso, diferentemente do presente estudo, o quefir não promoveu alteração nos níveis séricos de HDL e de triglicérides entre os grupos. LIU et al. (2006), realizaram um trabalho com 8 grupos de hamsters que receberam dieta livre ou rica em colesterol acrescida de 10% de leite em pó desnatado, quefir-leite, leite de soja ou quefir-leite de soja (os três últimos liofilizados) por 8 semanas. Os animais suplementados com o quefir (leite e leite de soja) apresentaram diminuição do colesterol total e de triglicérides séricos, além de aumento de HDL sérico, parâmetros que levaram à redução do índice aterogênico, resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho. Em contrapartida, o único estudo realizado com humanos foi controverso, pois indivíduos ligeiramente hipercolesterolêmicos que ingeriram quefir (leite) por 4 semanas não tiveram o perfil lipídico sérico (colesterol total, LDL, HDL e triglicérides) modificado pela bebida fermentada (St-ONGE et al., 2002).

Em resumo, os resultados de melhora no perfil lipídico sérico dos camundongos obtidos no presente trabalho, corroboram com a maioria dos estudos encontrados na literatura, seja com o quefir aquoso ou a bebida láctea, sugerindo um papel adjuvante desse probiótico na prevenção das doenças cardiovasculares (DCVs) em condições de hipercolesterolemia moderada. Níveis elevados de HDL plasmáticos estão inversamente relacionados com o risco de desenvolvimento da aterosclerose, como já mostrado em diversos estudos (NCEP III, 2002; LIMA & COUTO, 2006; TALL, 2008; LOWENSTEIN & CAMERON, 2010; TSOMPANIDI et al., 2010). A HDL, além de realizar o *clearance* de colesterol do organismo, tem propriedades antioxidante, antiinflamatória, vasodilatadora (produção de NO) e antitrombótica. Contudo, é provável que seu principal papel anti-aterogênico seja a capacidade de remover

colesterol e oxisteróis das células espumosas (macrófagos repletos de colesterol na placa aterosclerótica), das células musculares lisas e das células endoteliais na parede arterial, bem como neutralizar fosfolipídeos oxidados (TALL, 2008). Estudos também já demonstraram que a HDL fornece proteção direta ou indireta contra a oxidação de LDL. A HDL pode inibir a oxidação da LDL quando causada por íons de metais de transição e prevenir a formação de peróxidos lipídicos pela lipoxigenase (NAVAB et al., 2000; FREDENRICH & BAYER, 2003).

Para avaliação de possíveis alterações na absorção e/ou excreção de lipídeos foi avaliado o perfil lipídico hepático e cecal dos animais. Os resultados sugerem uma discreta elevação dos níveis de triglicerídeos hepáticos com o consumo do quefir ($p=0,07$), contudo os níveis de lipídeos totais e colesterol total hepáticos não foram modificados. O perfil lipídico do conteúdo cecal também não foi modificado pela ingestão do quefir. No presente estudo, a ingestão do quefir reduziu os níveis sanguíneos de triglicerídeos, e aumentou os níveis de HDL. Como os principais carreadores de TG são VLDL e QM, um mecanismo proposto para os resultados obtidos seria: quando TG de VLDL e QM são hidrolisados pela lipase lipoprotéica nos capilares, a concha externa destas lipoproteínas dá origem às HDL nascentes, que, por sua vez, farão o transporte reverso de colesterol. Assim, a redução de TG no sangue (causada pela atuação da lipase) está relacionada com um aumento de HDL.

A hiperglicemia também pode contribuir, por meio de diferentes mecanismos, no agravamento da aterosclerose. A glicose pode aumentar o estresse oxidativo e a geração de espécies reativas de oxigênio pelas células endoteliais, contribuindo, inclusive, para a oxidação da LDL. (MARITIM et al., 2003). Além disso, a molécula de glicose pode se ligar de forma não enzimática a proteínas, levando à formação de proteínas glicadas e produtos avançados de glicação, que estão correlacionados positivamente com doenças vasculares (DUAN et al., 2005). No presente estudo, os níveis glicêmicos dos animais APOE^{-/-} não foram alterados pela ingestão do quefir após as 4 semanas experimentais. Então, o fato do quefir ter sido preparado em solução de açúcar mascavo não elevou a glicemia nestas condições experimentais.

Um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a capacidade antioxidante do organismo caracteriza o estresse oxidativo. Por isso, a próxima etapa do estudo foi a investigação de possíveis efeitos do quefir no estresse oxidativo dos animais ApoE^{-/-}. Assim, a avaliação da peroxidação lipídica foi realizada por dois métodos, dosagem de TBARS e concentração de hidroperóxidos, ambos em

tecido hepático e renal. Esse último constitui um método mais específico, visto que, no método de TBARS, vários produtos primários e secundários de outros componentes (como proteínas e carboidratos) podem reagir com o ácido tiobarbitúrico, mascarando o resultado da oxidação de lipídeos (ARAÚJO, 2001). Os resultados obtidos mostraram que a ingestão do quefir por 4 semanas foi capaz de reduzir a concentração de hidroperóxidos no fígado dos animais. A relevância desse resultado está no fato de o fígado ser um órgão metabolicamente ativo, com alta produção de ERO, e o quefir mostrou-se eficaz em reduzir o estresse oxidativo neste órgão. Essa redução, porém, não foi detectada no rim por ambas as técnicas, tampouco no fígado pela técnica de TBARS.

Visto que o quefir reduziu a peroxidação lipídica no fígado, o próximo passo foi a avaliação da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase, que constituem sistemas de defesa do organismo contra o estresse oxidativo. Estas enzimas decompõem as ERO, sendo a SOD conversora de radicais superóxido (O_2^-) em H_2O_2 e O_2 , e a catalase responsável pela decomposição do H_2O_2 em H_2O e O_2 (AFONSO et al., 2007; POWERS e JACKSON, 2008). De acordo com os resultados obtidos, o quefir não exerceu ação sobre a atividade da SOD no fígado, no entanto, houve forte tendência estatística à redução de atividade da catalase nesse órgão ($p=0,06$).

Em síntese, o quefir promoveu redução da peroxidação lipídica e da atividade de catalase no fígado. A catalase é uma enzima que se adapta à situação de estresse oxidativo estabelecida (WASSMANN et al., 2004), então nesse caso, sua diminuição foi um efeito positivo do quefir, pois os animais ApoE^{-/-} já possuem um maior estresse oxidativo, pois a ApoE é antioxidante, além da hipercolesterolemia e aterosclerose, que também contribuem para aumento dessa condição. Assim, o meio já era pró-oxidante e exigia uma maior atividade da enzima, e o quefir mostrou um papel antioxidante.

Alguns estudos já demonstraram o potencial antioxidante do quefir. NAGIRA et al. (1999), em um estudo *in vitro*, mostraram ação do quefir na proteção aos danos oxidativos causados pelas ERO ao DNA, a proteínas e aos lipídeos. GÜVEN et al. (2003a) realizaram um estudo em camundongos albinos *swiss* com quefir-leite, e observaram menor peroxidação lipídica no plasma dos animais. Contudo, a atividade das enzimas antioxidantes glutathiona reduzida (GSH), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e catalase, medidas nas hemácias, não foi modificada pela ingestão de quefir. De acordo com nossos resultados, GÜVEN et al. (2003b) também obtiveram diminuição da

peroxidação lipídica no fígado e o poder antioxidante do quefir foi superior ao da vitamina E. Em relação às enzimas antioxidantes, os autores verificaram que a ingestão de quefir promoveu aumento da atividade de GSH, GSH-Px, glutathione-S-transferase (GST), mas sem modificação da atividade da catalase, diferente do resultado obtido no presente estudo. CENEZIS et al. (2008), também observaram menor peroxidação lipídica no fígado em camundongos *swiss* com criptas aberrantes colônicas (induzidas por azoximetano).

O estresse oxidativo também contribui para aumento na oxidação de LDLs, formando as LDLs oxidadas, que desempenham um importante papel na iniciação e progressão da aterosclerose. 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 de anticorpos anti-LDL oxidada no soro, portanto, é uma medida indireta da oxidação de LDL. Como o quefir teve ação antioxidante no fígado e aumento de HDL, que também possui ação antioxidante, esperava-se uma diminuição na oxidação de LDL, entretanto esse efeito não foi constatado. O consumo por 4 semanas de quefir não interferiu na quantidade sérica de anticorpos anti-LDL oxidada dos ApoE^{-/-}. Não há estudo na literatura que correlaciona o consumo de quefir com a presença de anticorpos anti-LDL oxidada, todavia, CAVALLINI et al. (2009) avaliaram os efeitos de um iogurte de soja puro ou fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 (probiótica) na concentração de anticorpos anti-LDL oxidada, em coelhos com hipercolesterolemia induzida. Os autores mostraram que somente o grupo que recebeu o iogurte de soja apresentou redução dessa medida, não sugerindo efeito da bactéria probiótica. A falta de resultados positivos do quefir na oxidação de LDL pode ser devido à presença de inúmeros antioxidantes no soro, o que torna difícil a detecção de um possível efeito do quefir. Além disso, estas modificações são discretas, ocorrendo muitas vezes pelo efeito de glicação das apolipoproteínas (DUAN et al., 2005). Como a glicemia não foi alterada pelo quefir, pode ser que o efeito de sua suplementação não tenha sido suficiente para reverter ou minimizar os efeitos da glicação e oxidação das LDL circulantes.

Após a investigação do papel do quefir no metabolismo lipídico e estresse oxidativo, ambos fatores de risco para a aterosclerose, e nos quais a bebida fermentada exerceu efeitos protetores, o próximo procedimento foi investigar se a melhora destes fatores proporcionou diminuição da lesão aterosclerótica em diferentes sítios. Os resultados mostram que as áreas de lesão aterosclerótica na válvula aórtica

e nas aortas abdominal e torácica foram semelhantes entre os grupos. Como mostrado na imunohistoquímica utilizando anticorpo anti-macrófagos de camundongo MOMA, as lesões ateroscleróticas na válvula aórtica apresentaram grande acúmulo de macrófagos, mas que foram semelhantes em porcentagem de área entre os grupos. Nas aortas abdominal e torácica dos animais ApoE^{-/-}, notou-se a presença das lesões nas regiões de ramificações, em que há uma força de cisalhamento sanguíneo (*shear stress*) oscilatório, que danifica o endotélio. Desse modo, esse fator hemodinâmico está fortemente correlacionado à formação de placas ateroscleróticas, uma vez que a disfunção endotelial, em conjunto com outros fatores, é responsável pelo início do processo aterosclerótico (CHENG et al., 2006).

Em um estudo semelhante a este, porém com utilização de uma bactéria isolada, PORTUGAL et al. (2006) investigaram a influência da ingestão de *Lactobacillus delbrueckii* (10^{12} UFC/mL em solução salina) no desenvolvimento da aterosclerose em camundongos ApoE^{-/-} com dieta comercial por 6 semanas. Em concordância com nossos resultados, nenhuma redução na área de lesão na válvula aórtica foi observada com a ingestão da bactéria.

Nem sempre a melhora de alguns fatores de risco da aterosclerose refletirá sobre a redução de formação de lesão em curto prazo, isso pode ocorrer após um período mais longo. Não se pode descartar a possibilidade de que, em um tratamento mais prolongado, o aumento de HDL induza a redução na velocidade de formação da lesão. Entretanto, quatro semanas é um período relativamente longo, uma vez que camundongos ApoE^{-/-} desenvolve placas após este período, o que corresponderia a mais de 10 anos em humanos. Por outro lado, a LDL oxidada, essencial para a captação pelos macrófagos e desenvolvimento de aterosclerose, não foi alterada o que está em concordância com a falta de efeitos do quefir na aterogênese.

Embora existam relatos na literatura do efeito de quefir em dislipidemias, este é o primeiro estudo desenhado para verificar os efeitos do quefir, não só nos fatores de risco, como principalmente no evento final, a aterosclerose. Os resultados apresentados nos levam a concluir que, embora haja uma melhora em alguns fatores de risco, este efeito não foi de intensidade suficiente para alterar o curso da doença aterosclerótica na raiz da válvula ou na aorta especificamente.

VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, v.105, p.121-126, 1984.
- ANVISA. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/>. Acesso em: 03 fev. 2010.
- AFONSO, V.; CHAMPY, R.; MITROVIC, D.; COLLIN, P.; LOMRI, A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. *Joint Bone Spine*, v.74, p.324-29, 2007.
- ALLAIN, C.C.; POON, L.S.; CHAN, C.S.; RICHMOND, W.; FU, P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical Chemistry*, v.20, p.470-475, 1974.
- ALVAREZ-LEITE, J. I. Lipoproteínas e transporte de lipídios no organismo. In: VIEIRA, E.C.; ALVAREZ-LEITE, J.I. ; GOMEZ, M.V.; FIGUEIREDO, E.A. (Ed.) *Química Fisiológica*. Rio de Janeiro: Atheneu, 1995. p.17-31.
- ALVAREZ-LEITE, J.I.; OLIVEIRA, D.R.; PELUZIO, M.C.G. Dislipidemias. In: NETO, F. T.(Ed.) *Nutrição Clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, p.196-211.
- ÂNGULO, L., LOPEZ, E., LEMA, C. Microflora present in kefir grains grown in milk and in soy milk. *Journal of Dairy Research*, v.60, p.263-267, 1993.
- ARAÚJO, J.M.A. *Química de Alimentos: Teoria e Prática*. Viçosa: UFV, 2001. 416p.
- BANERJEE, D. et al. Determination of absolute hydrogenperoxide concentration by spectrophotometric method. *Current Science*, v.83, n.10, p.1193-1194, 2002.
- BARTER, P. The inflammation: Lipoprotein cycle. *Atherosclerosis Supplements*, v.6, p.15-20, 2005.
- BERLINER, J.A.; NAVAB, M.; FOGELMAN, A.M.; FRANK, J.S.; DEMER, L.L.; EDWARDS, P.A.; WATSON, A.D.; LUSIS, A.J. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation and genetics. *Circulation*, v.91, p.2488-2496, 1995.
- BRESLOW, J.L. Mouse models of atherosclerosis. *Science*, v.272, p.685-688, 1996.
- BRUCE C, CHOUINARD JR RA, TALL AR. Plasma lipid transfer proteins, highdensity lipoproteins, and reverse cholesterol transport. *Annual Review of Nutrition*v.18, p.297–330, 1998.
- BISSOLI, M.C. *Respostas lipidêmicas de coelhos à ingestão de ração suplementada com quefir*. Alfenas: Escola de Veterinária da UNIFENAS, 2005. 48p. (Dissertação, Mestrado em Ciência Animal).
- BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, v.52, p.302-310, 1978.
- 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.

- CAVALLINI, D.C.U.; ABDALLA, D.S.P.; VENDRAMINI, R.C.; BEDANI, R.; BOMDESPACHO, L.Q.; PAULY- SILVEIRA, N.D.; VALDEZ, G.F.; ROSSI, E.A. Effects of isoflavone-supplemented soy yogurt on lipid parameters and atherosclerosis development in hypercholesterolemic rabbits: a randomized double-blind study. *Lipids in Health and Disease*, v.8, n.40, p.1-10, 2009.
- CENESIZ, S; DEVRIM, AK; KAMBER, U; SOZMEN, M. The effect of kefir on glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) levels in mice with colonic abnormal crypt formation (ACF) induced by azoxymethane (AOM). *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, v.115(1), p.15-19, 2008.
- CHAMPE, P. C., HARVEY, R. A., FERRIER, D. R. Lipids metabolism. In: *Biochemistry*, 4ª edição, 2007, 520p.
- CHENG, C.; TEMPEL, D.; HAPEREN, R.; BAAN, A.; GROSVELD, F.; DAEMEN, M.J.A.P.; KRAMS, R.; CROM, R. Atherosclerotic lesion size and vulnerability are determined by patterns of fluid shear stress. *Circulation*, v.113, p.2744-2753, 2006.
- CHIU, C-H.; LU, T-Y.; TSENG, Y-Y.; PAN, T-M. The effects of Lactobacillus-fermented milk on lipid metabolism in hamsters fed on high-cholesterol diet. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.71, p.238–245, 2006.
- 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 in Enzymology*, v.128, p.181-209, 1986.
- 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.
- DUAN, W.; PAKA, L.; PILLARISSETTI, S. Distinct effects of glucose and glucosamine on vascular endothelial and smooth muscle cells: evidence for a protective role for glucosamine in atherosclerosis. *Cardiovascular Diabetology*, v.5, p.4-16, 2005.
- FAO/WHO. CODEX Standard for Fermented Milks #243. Disponível em <http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.jsp> Acesso em: 10 mar. 2008.
- FARNWORTH, E.R. Kefir – a complex probiotic. *Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods*, v.2(1), p.1-17, 2005.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Science*, v.94, p.4647-4652, 1997.
- FAZIO, S.; LINTON, M.F. Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis. *Frontiers in Bioscience*, v. 6, p. 515–525, 2001.
- FIELDING, C.J. Lipoprotein synthesis, transport, and metabolism. In: *Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition*, Philadelphia. 2000, p.351-364.

- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal Biological Chemistry*, v.226, p.497-509, 1957.
- FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clinical Chemistry*, v.28(10), p.2077-2080, 1982.
- FRANSSSEN R.; MONAJEMI, H.; TROES, E.S.G.; KASTELEIN, J.J.P. Obesity and Dyslipidemia. *Endocrinology & Metabolism Clinics of North America*, v.37 p. 623–633, 2008.
- FREDENRICH, A.; BAYER, P. Reverse cholesterol transport, high-density lipoproteins and HDL cholesterol: recent data. *Diabetes & Metabolism*, v.29, n.3, p.201-205, 2003.
- FREEDMAN, J.E. Oxidative stress and platelets. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v.28, p.11–16, 2008.
- FUKUSHIMA, M.; NAKANO, M. Effects of a mixture of organisms, *Lactobacillus acidophilus* or *Streptococcus faecalis* on cholesterol metabolism in rats fed on a fat- and cholesterol-enriched diet. *British Journal of Nutrition*, v.76, n.6, p.857-67, 1996.
- GALKINA, E.; LEY, K. Immune and Inflammatory Mechanisms of Atherosclerosis. *Annual Review of Immunology*, v.27, p.165–197, 2009.
- GARROTE, G.L.; ABRAHAM, A.G.; ANTONI, G.L. Inhibitory power of kefir: the role of organic acids. *Journal of Food. Protection*, v.63 (3), p.364-369, 2000.
- GENESTRA, M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular Signaling.*, v.19, p.1807-1819, 2007.
- GIJBELS, J.J.; CAMMEN, M.; LAAN, L.J.W.; EMEIS, J.J.; HAVEKES, L.M.; HOFKER, M.H.; KRAAL, G. Progression and regression of atherosclerosis in APOE3-Leiden transgenic mice: an immunohistochemical study. *Atherosclerosis*, v.143, p.15-25, 1999.
- GILLILAND, S.E.; NELSON, C.R.; MAXWELL, C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.49, p.377–381, 1985.
- GOETZ, M. E., LUCH, A. Reactive species: A cell damaging rout assisting to chemical carcinogens. *Canc. Lett.*, v.266 p.73–83, 2008.
- GONÇALVES, J.L. *Suplementação Dietética com Agaricus blazei Murril e suas Implicações na Aterogênese em Camundongos apo-E Nocaute*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2007. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- GUPTA, S.; PABLO, A.M.; JIANG, X.; WANG, N.; TALL, A.R.; SCHINDLER, C. IFN-gamma potentiates atherosclerosis in apo-E knockout mice. *The Journal of Clinical Investigation*, v.99, p.2752-2761, 1997.

- GÜVEN, A., GÜVEN, A.; GÜLMEZ, M. The effect of kefir on the activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO levels in carbon tetrachloride-induced mice tissues. *Journal of Veterinary Medicine*, v.50 (8), p.412-416, 2003.
- GÜVEN, A., GÜVEN, A.; GÜLMEZ, M.; BEYTUT, E.; ERISIR, M.; TARIHI, G. Protective Role of Supplementat Kefir and Yogurt on Increased Lipid Peroxidation Caused by High- Cholesterol Diet. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, v.9, n.1, p.79-83, 2003.
- GÜZEL-SEYDIM, Z.B., SEYDIM, A.C., GREENE, A.K. AND BODINE, A.B. Determination of organic acids and volatile flavor substances in kefir during fermentation. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.13, p.35-43, 2000.
- HANSSON, G.K.; LIBBY, P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology*, v. 6, p. 508-519, 2006.
- HEISTAD, D.D. Oxidative stress and vascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v.26, p.689-695, 2006.
- HERTZLER, S.R.; CLANCY, S.M. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association*, v.103, p. 582-587, 2003.
- 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.
- HOSONO, A.; TANABE, T.; OTANI, H. Binding properties of lactic acid bacteria isolated from kefir milk with mutagenic amino acid pyrolyzates. *Milchwissenschaft*, v.45, p.647-651, 1990.
- ISHIBASHI, S.; GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S.; HERZ, J.; BURNS D.K.; Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *The Journal of Clinical Investigation*, v.93(5), p.1885-1893, 1994.
- JAIN S.; YADAV H.; SINHA P.R. Antioxidant and cholesterol assimilation activities of selected lactobacilli and lactococci cultures. *Journal of Dairy Research*. v.76, n.4, p.385-391, 2009.
- JAWIEN, J.; NASTALEK, P.; KORBUT, R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 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. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v.29, p.35-39, 2009.
- KUBO, M.; ODANI, T.; NAKAMURA, S. Pharmacological study on quefir - a fermented milk product in Caucasus on antitumor activity. *Yakugaku Zsshi*, v.112, n.7, p.489-95, 1992.

- LEE, K.; JANG, S.; BAEK, E.H.; KIM, M.J.; LEE K.S.; SHIN, H.S.; CHUNG, M.J.; KIM, J.E.; LEE, K.O.; HA, N.J. Lactic acid bacteria affect serum cholesterol levels, harmful fecal enzyme activity, and fecal water content. *Lipids Health and Disease*, v.8, p.8-21, 2009.
- LEE, M.Y.; AHN, K.S.; KWON, O.K.; KIM, M.J.; KIM, M.K.; LEE, I.N.; OH, S.R.; LEE, H.K. Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in a mouse asthma model. *Immunobiology*, v.212, p.647–654, 2007.
- 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. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v.19. p.734-742, 1999.
- LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, v.420, p.868-874, 2002.
- LIMA, E.S.; COUTO, R.D. Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade. *Jornal Brasileiro Patologia e Medicina Laboratorial*, v.42, n.3, p.169-178, 2006.
- LIU, B.F.; FAN, M.T.; JIN, D. Isolation of lactic acid bacteria from Tibetan kefir grains and study on its fermentation performance. *Journal of Northwest Science & Technology, University of Agriculture and Forrest*, v.32, p.83–86, 2004.
- LIU, J.R.; CHEN, M.J.; LIN, C.W. Characterization of polysaccharide and volatile compounds produced by kefir grains grown in soymilk. *Journal of Food Science*, v.67, p.104-108, 2002.
- LIU, J.R.; WANG, S.Y.; LIN, Y.Y.; LIN, C.W. Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-bearing mice. *Nutrition and Cancer*, v.44, p.182-187, 2002.
- LIU, J.R.; WANG, S.Y.; CHEN, M.J.; CHEN, H.L.; YUEH, P.Y.; LIN, C.W. Hypocholesterolaemic effects of milk-kefir and soymilk-kefir in cholesterol-fed hamsters. *British Journal of Nutrition*, v.95, p.939–946, 2006.
- LOPITZ- OTSOA, F.; REMENTERIA, A.; ELGUEZABAL, N.; GARAIZAR, J. Kefir: A symbiot yeasts- bacteria community with alleged healthy capabilities. *Rev Iberoam Micol*, v.23, p.67-74, 2006.
- LOSCALZO, J. *Molecular mechanisms of atherosclerosis*. New York: Taylor & Francis, 2005. 296 p.
- LOWENSTEIN, C.J.; CAMERON, S.J. High-density lipoprotein metabolism and endothelial function. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity*, v.17, 2010.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v.193, p.265-75, 1951.
- LUSIS, A.J. Atherosclerosis. *Nature*, v.407, p.233-241, 2000.

- 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.
- MANN, E.J. Kefir and koumiss. *Dairy Industry International*, v.50, p.11-12, 1985.
- 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 CD36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v.29, p.19-26, 2009.
- MARITIM, A.C.; SANDERS, R.A.; WATKINS, J.B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, v.17, p.24-38, 2003.
- MEIR, K.S.; LEITERSDORF, E. Atherosclerosis in the apoprotein E-deficient mouse: a decade of progress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v.24, p.1-9, 2004.
- 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.
- MOREIRA, M.E.C.; DOS SANTOS, M.H.; ZOLINI, G.P.P.; WOUTERS, A.T.B.; CARVALHO, J.C.T.; SCHNEEDORF, J.M. Anti- Inflammatory and Cicatrizing Activies of a Carbohydrate Fraction Isolated from Sugary Kefir. *Journal of Medicine Food*, v.11(2), p.\356-361, 2008.
- NAGIRA, T.; NARISAWA, J.; TERUYA, K.; KUSUMOTO, K.; KATAKURA, Y.; W.BARNES, T.; TOKUMARU, S.; SHIRAHATA, S. Supression of Apoptosis in UV-Damaged Human Melanoma Cells by a Fermented Milk, Kefir. In: Bernard et al. (eds.) *Animal Cell Technology: Products from Cells, Cells as products*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1999, p.437-439.
- NAVAB M.; HAMA S.Y.; ANANTHARAMAIAH G.M. et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *Journal of Lipid Research*, v.41, p.1495–1508, 2000.
- 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. *Journal of Lipid Research*, v.39, p.354-368, 1998.
- NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SAMADI, J.; WOLFF, S.P. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation – xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anaytical Biochemistry*, v. 220(2), p.403-409, 1994.

- OHASHI, R.; MU, H.; YAO, Q.; CHEN, C. Cellular and Molecular Mechanisms of Atherosclerosis with Mouse Models. *Trends in Cardiovascular Medicine*, v.14, n.5, p.187-190, 2004.
- ORGANIZATION, W.H. Cardiovascular diseases (CVDs); Media Centre. Disponível em: <<http://www.who.int>>. 2008. Acesso em: 05 jun. 2008.
- OSADA, K.; NAGIRA, K.; TERUYA, K.; TACHIBANA, H.; SHIRAHATA, S.; MURAKAMI, H. Enhancement of interferon- β production with sphingomyelin from fermented milk. *Biotherapy*, v.7, p.115-123, 1994.
- ÖTLES, S.; CADINGI, Ö. Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pakistan Journal of Nutrition*, v.2, p.54–59, 2003.
- PALINSKI, W.; ORD, 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. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v.14; p.605-616, 1994.
- PAIGEN, B.; MORROW, A; HOLMES, P.A.; MITCHELL, D.; WILLIAMS, A. Quantitative assessment of atherosclerosis lesions in mice. *Atherosclerosis*, v.68, p.231-240, 1987.
- PATOCKOVA, J.; KRŠIAK, M.; MARHOL, P.; TUMOVA, E. Cerebrolysin inhibits lipid peroxidation induced by insulin hypoglycemia in the brain and heart of mice. *Physiological Research*, v.52, p.455-460, 2003.
- PEREIRA, M.C.A. *Efeito das farinhas de polpa de casca de banana e do fermentado de quefir nos níveis glicêmicos e lipídêmicos de ratos*. Lavras: Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA, 2007. 132p. (Tese, Doutorado em Ciência de Alimentos).
- PORTUGAL, L.R.; GONÇALVES, J.L.; FERNANDES L.R.; SILVA, H.P.S.; ARANTES R.M.E.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q.; ALVAREZ-LEITE, J.I. Effect of *Lactobacillus delbrueckii* on cholesterol metabolism in germ-free mice and on atherogenesis in apolipoprotein E knock-out mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.39, p.629-635, 2006.
- POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiological Reviews*, v.88, p.1243–76, 2008.
- RADER, D.J.; DAUGHERTY, A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature*, v.451, p.904-913, 2008.
- RADER, D.J.; WILSON, J.M. *Gene therapy for lipid disorders*. In: HARBER, E. (Ed.). *Molecular cardiovascular medicine*. New York: Scientific american, 1995, p.97-114.
- RODRIGUES, K.L.; GAUDINO, L.R.C.; CARVALHO, J.C.T.; EVANGELISTA, J.; SCHNEEDORF, J.M. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.25, p.404–408, 2005.

- ROJKIND, M.; DOMÍNGUEZ-ROSALESA, J.A.; NIETOB, N.; GREENWEL P. Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.59, p.1872–1891, 2002.
- ROSS, R. Atherosclerosis, an overview. In: HABER, E. (Ed.). *Molecular cardiovascular medicine*. New York: Scientific American, p.11-30, 1995.
- ROSS, R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine*, v. 340, p.115-126, 1999.
- SALOFF-COSTE, C.J.K. Probióticos. *Danonne Newsletter*, n.11, p.1-8, 1986.
- SARKAR, S. Potential of kefir as a dietetic beverage – a review. *British Food Journal*, v. 109(4), p. 280-290, 2007.
- SCHAAFSMA, G. State of the art concerning probiotic strains in milk products. *IDF Nutrition Newsletter*, v. 5, p. 23-24, 1996.
- SCHNEEDORF J.M.; ANFITEATRO, D. O Quefir e inflamação. In: CARVALHO, J.C.T. (Org.). *Fitoterápicos anti-inflamatórios. Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas*. São Paulo: Tecmedd, 2004, v.1, p.459-486.
- SCHNITZER, E. et al. Lipid oxidation in unfracionated serum and plasma. *Chemistry and Physics of lipids*, v.92, p.151-170, 1998.
- SEGREST, J.P.; JONES, M.K.; DE LOOF, H.; BROUILLETTE, C.G.; VENKATACHALAPATHI, Y.V.; ANANTHARAMAIAH, G.M. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *Journal of Lipid Research*, v.33, p.141-166, 1992.
- SEYDIM, Z.G.; WYFFELS, J.T.; SEYDIM, A.C.; GREENE, A.K. Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscopic observation. *International Journal of Dairy Technology*, v.58, p.25–29, 2005.
- SIMOVA, E.; BESHKOVA, D.; ANGELOV, A.; HRISTOZOVA, T.; FRENGOVA, G.; SPASOV, Z. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.28, p. 1–6, 2002.
- SORESCU, D.; WEISS, D.; LASSEGUE, B.; CLEMPUS, R.E.; SZOCS, K., et al. Superoxide production and expression of Nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation*, v.105, p.1429–1435, 2002.
- STEPHENS, J.W.; KHANOLKAR, M.P.; BAIN, S.C. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, v.202, p.321–329, 2009.
- STEFFENS, S.; MACH, F. Inflammation and Atherosclerosis. *HERZ*, v.29, p.741-748, 2004.

- ST-ONGE, M.P.; FARNWORTH, E.R.; SAVARD, T.; CHABOT, D.; MAFU, A.; JH JONES, P. Kefir consumption does not alter plasma lipid levels or cholesterol fractional synthesis rates relative to milk in hyperlipidemic men: a randomized controlled trial. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 2, p. 1-7, 2002.
- SVIRIDOV D.; NESTEL P. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. *Atherosclerosis*, v. 161, p. 245–254, 2002.
- TAMAI, Y.; YASHIMITSU, N.; WATANABE, Y.; KUWABARA, Y.; NAGAI, S. Effects of milk fermented by culturing with various lactic acid bacteria and a yeast on serum cholesterol level in rats. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 81, p. 181-182, 1996.
- TALL, A.R. Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins (Review). *Journal of Internal Medicine*, v.263, p.256–273, 2008.
- THIRD Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. *Circulation*, v.106, p.3143, 2002.
- THOREUX, K.; SCHMUCKER, D.L. Kefir milk enhances intestinal immunity in young but not old rats. *The Journal of Nutrition*, v.131, p.807–812, 2001.
- TRACHOOTHAM, D.; LU, W.; OGASAWARA, M.A.; VALLE, N.R.D.; HUANG, P. Redox Regulation of Cell Survival. *Antioxidants & Redox Signaling*, v.10, n.8, p.1343-1374, 2008.
- TRINDER, P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *Journal of Clinical Pathology*, v.22(2), p.158-61, 1969.
- TSOMPANIDI, E.M.; BRINKMEIER, M.S.; FOTIADOU, E.H.; GIAKOUMI, S.M.; KYPREOS, K.E. HDL biogenesis and functions: Role of HDL quality and quantity in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, v.208, p.3-9, 2010.
- 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. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v.26, p.2096-2102, 2006.
- UMEDA C; SONOYAMA K; YAMAGUCHI N; SAITO R; AKASHI K; MOTOSHIMA H; KAWABATA J. Oral administration of freeze-dried kefir reduces intestinal permeation of and oral sensitization to ovalbumin in mice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*; v.69(1), p.249-51, 2005.
- UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. *Tabela brasileira de composição de alimentos - TACO: versão 2 (2.ed)*. Campinas: NEPA UNICAMP, 2006, 113 p.
- USMAN, H.A.; HOSONO, A. Effect of Administration of *Lactobacillus gasseri* on Serum Lipids and Fecal Steroids in Hypercholesterolemic Rats. *Journal of Dairy Research*, v.83, p.1705–1711, 2000.

- VINDEROLA, G., PERDIGÓN, G., DUARTE, J., FARNWORTH, E., MATAR, C. Effects of the oral administration of the products derived from milk fermentation by kefir microflora on immune stimulation. *Journal of Dairy Research*, v.73, p.472–479, 2006.
- WANG, Y.; XU, N.; XI, A.; AHMED, Z.; BIN, Z.; BAI, X. Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. *Applied Microbial and Cell Physiology*, v.84, n.2, p.341- 347, 2009.
- WASSMANN, S.; WASSMANN, K.; NICKENIG, G. Modulation of Oxidant and Antioxidant Enzyme Expression and Function in Vascular Cells Modulation. *Hypertension*, v.44, p.381-386, 2004.
- WITTHUHN, R.C., SCHOEMAN, T.; BRITZ, T.J. Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains. *International Journal of Dairy Technology*, v.57, p.33–37, 2004.
- XIAO, J.Z.; KONDO, S.; TAKAHASHI, N.; MIYAJI, K.; OSHIDA, K.; HIRAMATSU, A.; IWATSUKI, K.; KOKUBO, S.; HOSONO, A. Effects of milk products fermented by *Bifidobacterium longum* on blood lipids in rats and healthy adult male volunteers. *Journal of Dairy Science*, v.86, p.2452–2461, 2003.
- YANG, X.J.; FAN, M.T.; SHI, J.L.; DANG, B. Isolation and identification of preponderant flora in Tibetan kefir. *China Brewing*, v.171, p.52–55, 2007.
- ZHANG, S.H.; REDDICK, R.L.; PIETRAHITA, J. A.; MAEDA, N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*, v.258, p.468-471, 1992.
- ZHOU, J., LIU, X.; JIANG, H.; DONG, M. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology*, v.26, p.770–775, 2009.

Anexo A – Dieta LABINA

LABINA

Indicação do produto:

Produto destinado para a alimentação de ratos, camundongos e hamsters de laboratório.

Composição básica do produto:

MILHO INTEGRAL MOIDO, CLORETO DE SÓDIO (SAL COMUM), ADITIVO ANTIFUNGO FUNGISTÁTICO, CLORETO DE COLINA, Premix Vitaminico Mineral, FENO DE ALFAFA, FOSFATO BICALCICO, SOJA INTEGRAL MOIDA (TRAT. POR PRESSAO), CALCÁRIO CALCÍTICO, FARELO DE SOJA, FARINHA DE PEIXE, FARELO DE TRIGO, REMOÍDO DE TRIGO

Eventuais substitutivos:

LISINA, CASCA DE ARROZ MOIDA, TREONINA, TRIPTOFANO, ÓLEO DE SOJA DEGOMADO, HÍDROXIDO DE TOLUENO BUTILADO (B.H.T.), FARELO DE ARROZ, ARROZ QUEBRADO, CAULIM, CASCA DE SOJA MOIDA, METIONINA, ÓLEO DE SOJA REFINADO, FARELO DE GLUTEN DE MILHO - 60, ETOXIQUIN, FARINHA DE TRIGO, SOJA INTEGRAL EXTRUSADA, FARELO DE GLUTEN DE MILHO 21, FARINHA DE CARNE, GERME DE MILHO

Enriquecimentos por quilograma do produto:

Colina	2.800,0000 mg
Vitamina A	25.577,0000 UI/kg
Biotina	0,1600 mg
Ácido Fólico	13,0000 mg
Iodo	1,0000 mg
Ferro	180,0000 mg
Manganês	110,0000 mg
Sódio	2,8000 g
Magnésio	1,7000 g
Ácido Propiónico	1.540,0000 mg
Vitamina E	82,0000 mg
Vitamina B12	40,0000 mcg
Vitamina K	6,4000 mg
Niacina	220,0000 mg
Ácido Pantoténico	90,0000 mg
Piridoxina - Vitamina B6 HCl	11,0000 mg
Vitamina D3	4.000,0000 UI/kg

VIII APÊNDICE

Apêndice A – Resultados do Experimento com Animais LDLr^{-/-}

A.1 Animais e Grupos

Vinte animais LDLr^{-/-} fêmeas, de 9 a 11 semanas de idade, homogêneas quanto ao peso e colesterol total sérico, foram divididos em dois grupos: grupo “Controle”, que recebeu água filtrada pura no mesmo pH do quefir; e grupo “Quefir”, que recebeu o quefir (50g/L) em substituição à água. Os dois grupos foram alimentados com dieta hiperlipídica, que foi preparada no Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional da UFMG e oferecida na forma de *pellets* aos camundongos. A Tabela 7 apresenta os ingredientes dessa dieta e a Tabela 8 mostra sua composição em macronutrientes.

Antes de iniciar o experimento, os animais receberam a dieta mencionada durante 3 dias, para adaptação. O experimento teve a duração de 6 semanas.

Tabela 7 - Ingredientes da dieta ocidental

Nutriente	Quantidade (g/Kg)
Caseína	195.00
DL- Metionina	3.00
Açúcar Refinado	341.46
Amido de Milho	150.00
Manteiga sem sal	210.00
Colesterol	1.50
Celulose	50.00
Mistura de Minerais	35.00
Carbonato de Cálcio	4.00
Mistura de Vitaminas	10.00
Antioxidante (BHT)	0.04

Tabela 8 - Composição centesimal da dieta ocidental

Macronutriente	Dieta Ocidental ^a
Carboidrato	25,1%
Proteína	17,9%
Lipídeo	36,7%
Densidade calórica	4,5 Kcal/g

^a Composição calculada pela tabela TACO (2006).

A.2 Resultados

A.2.1 Ingestão Dietética, de Líquido e Evolução ponderal

Tabela 9 - Ingestão dietética e de líquido (água ou quefir) diária por animal.

Ingestão diária/ animal	Controle (água)	Quefir
Dieta (g)	2,30 ± 0,08	2,24 ± 0,10
Líquido (mL)	3,22 ± 0,13	3,17 ± 0,17

Dados apresentados em média ± erro padrão.

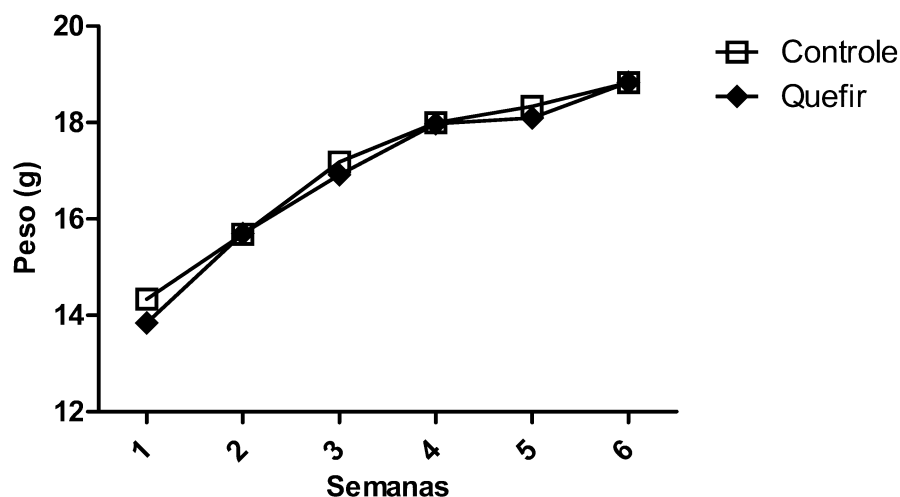


Figura 19: Evolução ponderal de camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta ocidental, recebendo quefir ou água por 6 semanas, grupos Controle e Quefir, n=10. Resultados expressos em média do peso em gramas; teste t de Student, p>0,05.

A.2.2 Perfil Lipídico Sérico

Em relação ao perfil lipídico sérico dos animais LDLr^{-/-}, ao final das 6 semanas experimentais, a dieta ocidental (hiperlipídica), associada à modificação genética dos camundongos, contribuiu para o aumento significativo ($p < 0,0001$) dos níveis de colesterol total (Controle= 1088,0mg/dL \pm 87,6 e Quefir= 1048,0mg/dL \pm 55,4) em relação aos valores iniciais, que eram similares entre os grupos (Controle= 486,0mg/dL \pm 54,8 e Quefir= 558,3mg/dL \pm 45,8, $p > 0,05$). A Tabela 10 apresenta os parâmetros lipídicos mensurados no final do período experimental, demonstrando que o quefir não promoveu alteração nos mesmos, comparados ao grupo Controle.

Tabela 10 - Perfil lipídico sérico, após 6 semanas, de camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta ocidental, recebendo quefir ou água.

Parâmetro	Controle	Quefir	p
Colesterol total (mg/dL) ^a	1088,0 ± 87,6	1048,0 ± 55,4	0,71
HDL (mg/dL)	74,3 ± 5,6	90,6 ± 6,9	0,09
Fração aterogênica (mg/dL) ^b	1003,0 ± 87,7	971,5 ± 16,9	0,78
Índice aterogênico	13,0 ± 1,6	10,2 ± 0,8	0,13
Triglicerídeos (mg/dL)	189,4 ± 26,8	180,4 ± 26,4	0,81

Dados apresentados como média ± erro padrão, teste t de *Student*, p>0,05.

^aControle: n=10 e Quefir: n=9.

^bControle: n=10 e Quefir:n=6; demais: n=10 por grupo.

A.2.3 Perfil Lipídico Hepático e Cecal

Tabela 11 - Perfil lipídico hepático e cecal de camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta ocidental, recebendo quefir ou água por 6 semanas.

Parâmetro (mg/g)	Controle	Quefir	p
Lipídeos totais hepáticos	148,0 ± 23,1	137,0 ± 16,3	0,70
Colesterol total hepático	15,22 ± 1,33	17,32 ± 1,51	0,31
Triglicerídeos hepáticos	12,26 ± 1,03	12,64 ± 1,03	0,80
Lipídeos totais cecais ^a	80,23 ± 12,52	97,55 ± 12,56	0,35
Colesterol total cecal	10,30 ± 1,14	12,41 ± 1,05	0,19

Dados apresentados como média ± erro padrão, teste t de *Student*, n=10, exceto em ^aControle: n=10 e Quefir: n=9.

A.2.4 Glicemia

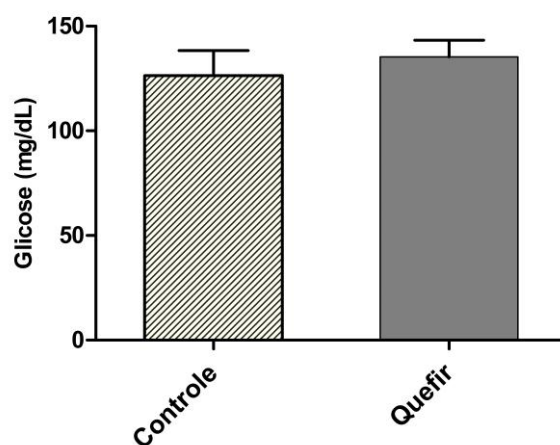


Figura 20: Glicemia após 6 semanas de camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta ocidental, recebendo quefir ou água, n=10; p= 0,54. Resultados expressos em média ± erro padrão, teste t de Student.

A.2.5 TBARS em Tecido Hepático e Renal

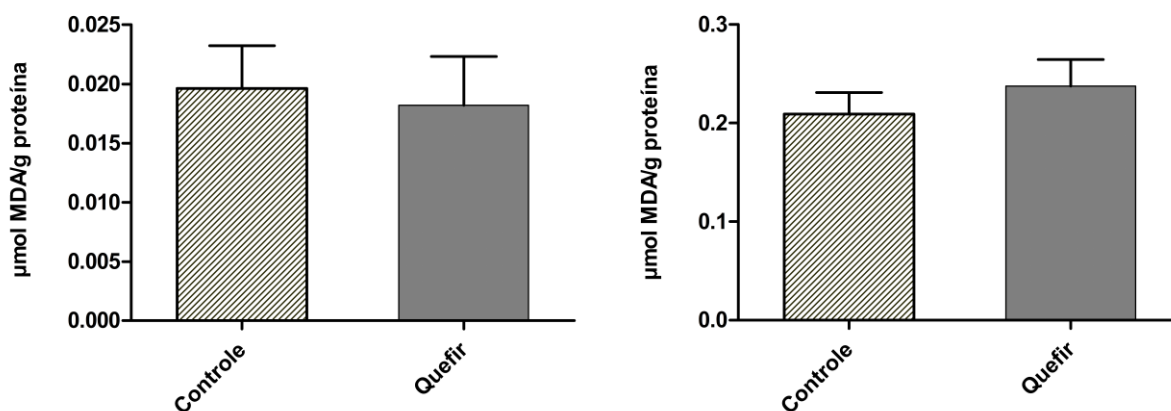


Figura 21: Dosagem de TBARS em camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta ocidental, recebendo quefir ou água por 6 semanas, n=10. Resultados expressos em média ± erro padrão; teste t de Student. (A) Tecido hepático, p= 0,80. (B) Tecido renal, p= 0,42.

A.2.6 Hidroperóxidos em Tecido Hepático e Renal

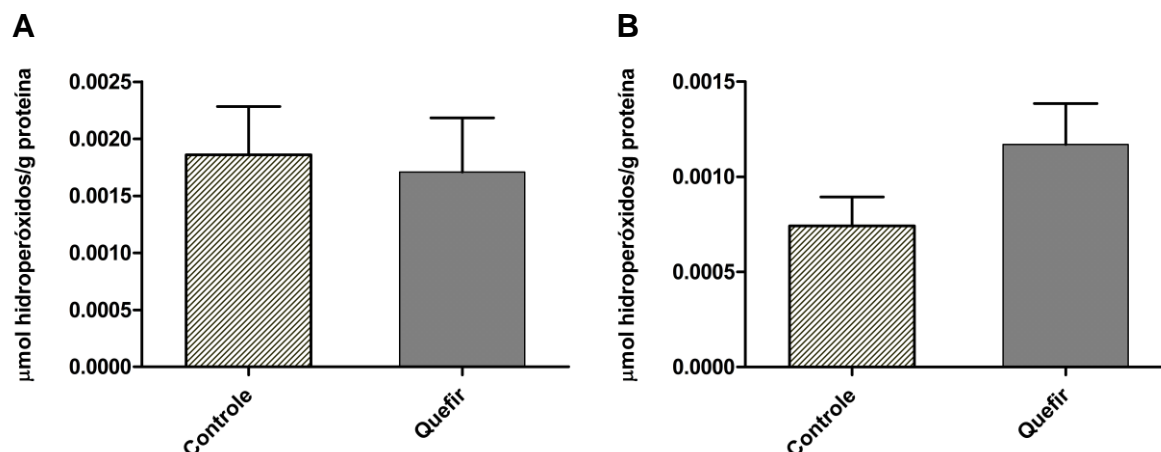


Figura 22: Avaliação do estresse oxidativo pela concentração de Hidroperóxidos em camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta ocidental, recebendo quefir ou água por 6 semanas. Resultados expressos em média \pm erro padrão; teste t de *Student*. (A) Tecido hepático, n=10 por grupo, p= 0,82. (B) Tecido renal, Controle: n=9 e Quefir: n=10, p= 0,23.

A.2.7 Área da Lesão Aterosclerótica na Aorta Torácica e Abdominal

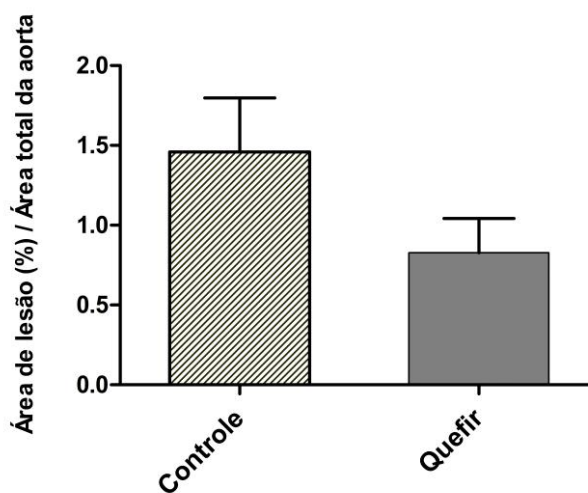


Figura 23: Área de lesão nas aortas torácica e abdominal dos camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta ocidental, recebendo quefir ou água, após 6 semanas. Os valores são apresentados como média \pm Erro padrão (n=10). p= 0,14.

A.2.8 Área da Lesão Aterosclerótica na Raiz Aórtica

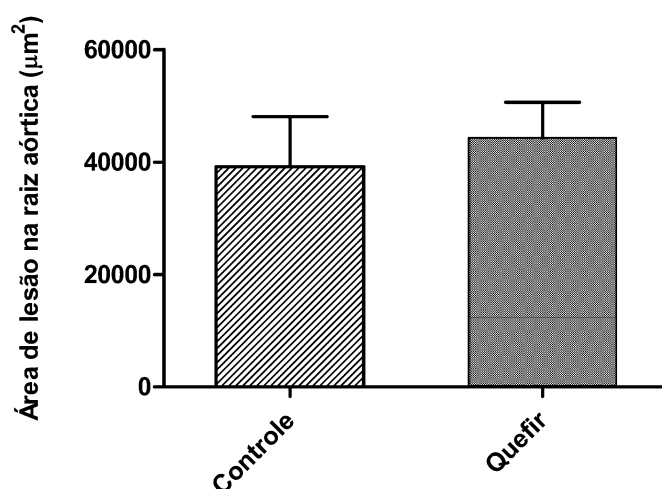


Figura 24: Área de lesão aterosclerótica na válvula aórtica de camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta ocidental, recebendo quefir ou água por 6 semanas. Controle: n=7 e Quefir: n=8. Resultados expressos em mediana, teste Mann Whitney, p= 0,45.

A.2.9 Imunohistoquímica para Macrófagos

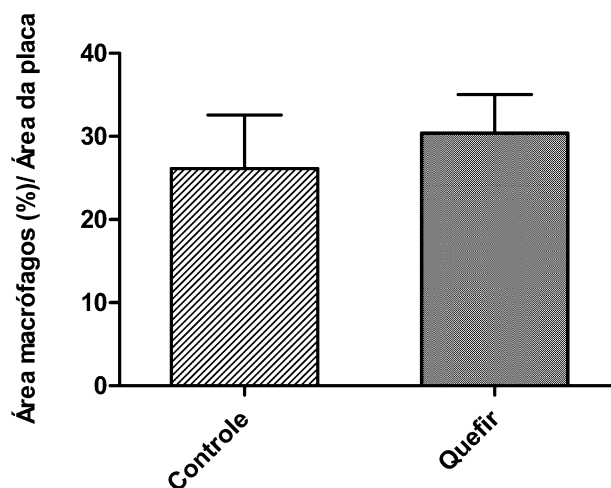


Figura 25: Área de macrófagos na placa aterosclerótica da válvula aórtica (imunohistoquímica) em camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta ocidental, recebendo quefir ou água por 6 semanas. Controle: n=6 e Quefir: n=8. Resultados expressos em média ± erro padrão, teste t de Student, p= 0,59.