

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO EXPERIMENTAL  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos  
Área de Nutrição Experimental

**Avaliação do consumo de lipídios oxidados na indução do  
estresse oxidativo associado à aterosclerose em modelo animal**

Marina Sayuri Nogueira

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.  
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

**Orientadora:**

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Inar Alves de Castro

**São Paulo**

**2015**

**Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Nogueira, Marina Sayuri  
N778av Avaliação do consumo de lipídios oxidados na indução do  
estresse oxidativo associado à aterosclerose em modelo animal /  
Marina Sayuri Nogueira. -- São Paulo, 2015.  
101p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da  
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição  
Experimental.

Orientador: Castro, Inar Alves de

1. Nutrição experimental : Ciência dos alimentos 2. Arteriosclerose  
3. Estresse oxidativo I. T. II. Castro, Inar Alves de, orientador.

641.1 CDD

Marina Sayuri Nogueira

**Avaliação do consumo de lipídios oxidados na indução  
do estresse oxidativo associado à aterosclerose em  
modelo animal**

Comissão Julgadora da  
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Inar Alves de Castro  
Presidente/Orientadora

-----  
1º. Examinador

-----  
2º. Examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_de\_\_\_\_\_de 2015

## Agradecimentos

Palavras não são suficientes para demonstrar a minha gratidão a todos que direta ou indiretamente fizeram parte deste projeto.

Primeiramente agradeço a **Deus**, por ter me guiado até aqui e ter colocado em meu caminho as melhores pessoas para me ajudar.

Aos meus pais **Paulo** e **Emi**, agradeço por acreditarem e estarem sempre torcendo por mim. Não conquistaria nada sem o apoio e amor de vocês. Amo vocês!

Aos meus avós **Paulo** e **Olivia**, obrigada pelo apoio e preocupação, aos meus tios e tias, primos e primas, obrigada por estarem sempre me apoiando. Vocês estão sempre no meu coração!

A minha orientadora, Professora **Inar Castro**, muito obrigada por toda paciência, por todo ensinamento, pela confiança, pela compreensão e principalmente pelas conversas e “broncas” que só me fizeram crescer e amadurecer mais. Admiro seu amor pela ciência e seu profissionalismo!

Às amigas do laboratório,

**Bianca** obrigada por tudo e mais um pouco, a parceria, a ajuda seja pra discutir resultados ou para fazer uma análise, por me agüentar, por viver me dando bronca.

**Helena e Livia** obrigada pela ajuda nas análises, pelas conversas, pela troca de informações e experiências sempre muito úteis.

**Thamyris, Raquelzinha, Aline e Carol**, agradeço a colaboração diária e os momentos de descontração.

Ao trio terror **Guilherme, João e Yuri**, obrigada por me ensinarem o quão difícil é ensinar.

Ao Professor **Dr. Bruno Cogliati** do Laboratório de Patologia Morfológica e Molecular da FMVZ/USP e a **Cintia Araujo** pelas análises de esteatose e toda a colaboração neste projeto.

Ao Professor **Dr. Francisco Blazquez** e a **Aliny Ladd**, pela análise das aortas.

Às meninas do “lado”:

**Camille, Luiza, Mari, Gabi e Vanessa** muito obrigada por terem me acolhido no começo quando ainda estava sozinha, por participarem da eutanásia dos animais e por todas as risadas.

**Rach** te agradeço em especial, não só toda a ajuda no laboratório, como também pela convivência em casa, pelas caronas, pelas conversas até tarde.

Aos amigos do andar de baixo, **Mayara, Fabia, Grazi, Kelly, Ju, Jana, Laura, Bruna, Roberto, Ernesto, Paulo Eduardo**, obrigada pela ajuda, pelas conversas e pela amizade.

À **Luciene e Ivanir**, obrigada por toda ajuda, por socorrer toda vez que te liguei com uma duvida. Não tenho como agradecer.

À **Joana** e a **Lurdinha**, pelo carinho, atenção e auxílio prestado meu muito obrigado.

A secretaria do bloco 14, **Cléo, Edilson, Monica e Roberta** que sempre ajudaram sem hesitar.

Aos funcionários do biotério pelo suporte, carinho e cuidado despendido com os animais.

Aos amigos do Instituto Butantan de PAP e do laboratório de farmacologia que não tive a chance de agradecer desta maneira antes, em especial a, **Karina, Mari** (sister), **Ana Eduarda, Neide, Renata, Juliana, Livia, Marlos, Eduardo, Marcio, Elbio, Lucas, Elisa, Vanessa** por toda ajuda, por todos os ensinamentos, por todas as conversas e brincadeiras.

Muito obrigada aos animais que foram utilizados para que mais esse estudo pudesse ser realizado, meu profundo respeito e gratidão.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

## Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1. PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO DAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES NO MUNDO E NO BRASIL.....	7
2.2. ATHEROSCLEROSE E DOENÇAS CARDIOVASCULARES.....	8
2.3 ATHEROSCLEROSE E DISLIPIDEMIA.....	10
2.4 ATHEROSCLEROSE E INFLAMAÇÃO.....	10
2.5 ATHEROSCLEROSE E ESTRESSE OXIDATIVO.....	12
2.6 MODELO ANIMAL PARA INDUÇÃO DE ATHEROSCLEROSE.....	14
2.6.1 DIFERENTES ESPÉCIES DE ANIMAIS COMO MODELO DE INDUÇÃO DE ATHEROSCLEROSE.....	14
2.6.2 CAMUNDONGOS COMO MODELO DE INDUÇÃO DE ATHEROSCLEROSE.....	19
2.7 O CONSUMO DE LIPÍDIOS OXIDADOS E A INDUÇÃO DE ATHEROSCLEROSE.....	21
2.8 CONSUMO DE SAL, FERRO E SELÊNIO PELA POPULAÇÃO.....	22
2.9 JUSTIFICATIVA.....	24
3 HIPÓTESES.....	27
4 OBJETIVOS.....	27
5 RELEVÂNCIA DA PESQUISA.....	28
6 MATERIAL & MÉTODOS.....	29
6.1 MATERIAL.....	29
6.2 PREPARAÇÃO DO ÓLEO OXIDADO.....	29
6.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	30
6.4 OXIDAÇÃO DO ÓLEO UTILIZADO NO PREPARO DAS DIETAS.....	33
6.4.1 ANÁLISE DE HIDROPERÓXIDOS NO ÓLEO.....	33
6.4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MALONALDEÍDO POR TBARS (THIOBARBITURIC ACID REACTIVE SUBSTANCES) NO ÓLEO.....	34
6.4.3 ANÁLISE DE HEXANAL.....	34
6.4.4 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS NO ÓLEO.....	35



6.5 ANÁLISES DA RAÇÃO .....	36
6.5.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS RAÇÕES .....	36
6.5.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO DA RAÇÃO.....	36
6.5.3 EFEITO DA PELETIZAÇÃO NA OXIDAÇÃO DO ÓLEO PRESENTE NAS RAÇÕES.....	37
6.6 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS RELATIVOS AO ENSAIO BIOLÓGICO. ....	37
6.6.1 DETERMINAÇÃO DO GANHO DE PESO E CONSUMO DE RAÇÃO PELOS ANIMAIS. 37	
6.6.2 DETERMINAÇÃO DOS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	37
6.6.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD).....	37
6.6.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE. ....	38
6.6.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPX).....	38
6.6.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GLUTATIONA REDUTASE (GR).....	39
6.6.7 GLICEMIA E LIPOPROTEÍNAS.....	39
6.6.9 ANÁLISE DE MALONALDEÍDO HEPÁTICO.....	40
6.6.10 ESTUDO ESTEROLÓGICO DA AORTA.....	41
6.6.11 PERFIL LIPÍDICO PLASMÁTICO E HEPÁTICO .....	43
6.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	44
7 RESULTADOS.....	45
7.1 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE LINHAÇA USADO NA FORMULAÇÃO DAS RAÇÕES	45
7.2 OXIDAÇÃO ACELERADA E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO ÓLEO DE LINHAÇA EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO. ....	46
7.3 EFEITO DA PELETIZAÇÃO DA RAÇÃO NA ESTABILIDADE DO ÓLEO DE LINHAÇA.....	50
7.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS RAÇÕES.....	52
7.5 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DAS RAÇÕES.....	53
7.6 CONSUMO CALÓRICO E GANHO DE PESO DOS ANIMAIS. ....	54
7.7 PESO RELATIVO DOS TECIDOS .....	56
7.8 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DETERMINADOS NO PLASMA .....	57
7.9 DETERMINAÇÃO DE MDA EM HOMOGENATO DE TECIDO HEPÁTICO E PLASMA ...	58
7.10 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS .....	59
7.11 DETERMINAÇÃO DE ESTEATOSE HEPÁTICA .....	61
7.12 ATIVIDADE E EXPRESSÃO DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO FÍGADO .....	62

7.13 ESTUDO ESTEREOLÓGICO DA AORTA.....	63
8. DISCUSSÃO.....	64
POR QUE O ÓLEO DE LINHAÇA FOI SELECIONADO PARA A PRODUÇÃO DAS DIETAS?..	64
POR QUE FORAM UTILIZADOS NÍVEIS MODERADOS DE OXIDAÇÃO?.....	65
POR QUE EM TERMOS DE PRODUTOS SECUNDÁRIOS, OBSERVOU-SE MAIOR VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE MDA QUE NA CONCENTRAÇÃO DE HEXANAL? .....	66
POR QUE NÃO FOI OBSERVADA DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS EM RELAÇÃO AO PERFIL DE GLICEMIA E LIPOPROTEÍNAS? .....	68
POR QUE O PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO GRUPO HIGH FOI SEMELHANTE AO GRUPO CONT+? .....	70
O CONSUMO DE ÓLEO DE LINHAÇA OXIDADA ALTEROU BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO?.....	70
O CONSUMO DE ÓLEO DE LINHAÇA OXIDADO ALTEROU A MORFOLOGIA DA AORTA DOS ANIMAIS? .....	73
9. CONCLUSÕES .....	74
10. REFERÊNCIAS: .....	75

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais vias endógenas e exógenas de produção de ROS.....	5
Figura 2: Mortes por Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil em 2012 .....	8
Figura 3: Processo de formação da placa aterosclerótica.....	9
Figura 4: Processo inflamatório na aterosclerose .....	11
Figura 5: Etapas da oxidação lipídica e da catálise mediada por metais.. .....	13
Figura 6: Delineamento do ensaio biológico. ....	30
Figura 7: Concentração de hidroperóxidos .....	46
Figura 8: Concentração de TBARS .....	48
Figura 9: Reação do TBHQ com espécies reativas.....	49
Figura 10: Ração MED em pó e Ração MED peletizada .....	50
Figura 11: Concentração de hidroperóxidos nas rações antes e após a peletização. ....	51
Figura 12: Correlação entre a concentração de hidroperóxidos e TBARS nas rações, antes e após a peletização.....	51
Figura 13: Peso dos animais durante o período experimental .....	54
Figura 14: Ganho de peso dos animais durante o período experimental.....	55
Figura 15: Peso relativo do fígado, tecido adiposo abdominal, tecido adiposo retro-epididimal e tecido adiposo retro-peritoneal dos animais .....	56
Figura 16: Concentração de glicose sanguínea dos animais, colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicerídeos .....	57
Figura 17: Concentração de MDA no fígado e e no plasma .....	58
Figura 18: Imagem representativa dos fígados dos animais corados com HE para análise de esteatose. ....	61
Figura 19: Imagem representativa das aortas dos animais.....	63
Figura 20: Formação de peróxidos e MDA a partir do ácido linolênico .....	66
Figura 21: Formação do hexanal a partir do 13OOH do ácido linoleico. ....	67
Figura 22: Esquema do sistema das enzimas antioxidantes. ....	72

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Composição da dieta utilizada no ensaio biológico (g/kg). .....	31
Tabela 2: Composição dos Mix de Minerais das rações (g/Kg). .....	32
Tabela 3: Proporção dos principais ácidos graxos observada no óleo de linhaça (T0). .....	45
Tabela 4: Níveis de oxidação do óleo de linhaça selecionados para compor as rações. .....	47
Tabela 5: Composição química centesimal das dietas. ....	52
Tabela 6: Composição de ácidos graxos de cada uma das rações .....	53
Tabela 7: Consumo de ração e o aporte calórico diário dos animais. ....	54
Tabela 8: Composição de ácidos graxos do tecido hepático.....	59
Tabela 9: Composição de ácido graxos do plasma .....	60
Tabela 10: Composição de ácidos graxos do tecido adiposo total. ....	60
Tabela 11: Atividade das enzimas Antioxidantes no fígado .....	62
Tabela 12: Estimativas estereológicas do volume da aorta dos camundongos.....	63

**LISTA DE QUADROS**

Quadro 1: Principais vantagens e desvantagens dos modelos experimentais direcionados ao estudo da aterosclerose. ....	17
Quadro 2: Descrição dos modelos experimentais de camundongos transgênicos. ....	20
Quadro 3: Protocolos experimentais aplicados em roedores.....	25

## Resumo

NOGUEIRA, M.S. Avaliação do consumo de lipídios oxidados na indução do estresse oxidativo associado à aterosclerose em modelo animal. 2015. 101f. [Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015].

Estudos envolvendo cultura de células, animais e humanos tem sido extensivamente aplicados no monitoramento da aterosclerose, visando seu controle ou mesmo reversão. Entre os modelos animais atualmente utilizados, tem-se observado uma resposta adequada à indução de dislipidemia e inflamação, porém elevada resistência à indução de estresse oxidativo. Uma alternativa para superar essa limitação seria a ingestão de dietas contendo ácidos graxos oxidados. Entretanto, os estudos que investigaram o efeito do consumo de peróxidos e produtos secundários da oxidação lipídica na progressão da aterosclerose têm mostrado resultados inconclusivos. Portanto, o objetivo deste estudo foi de alterar um modelo animal de referência para desenvolvimento de aterosclerose, visando elevar a variação de biomarcadores de estresse oxidativo, através do consumo crônico de ácidos graxos poli-insaturados parcialmente oxidados, em concentrações naturalmente presentes na dieta humana. Camundongos “knockout” para receptores LDL (C57BL/6), foram divididos em 4 grupos experimentais. Todos os grupos receberam uma dieta hiperlipídica modificada composta por 30% de lipídios durante 90 dias. Três níveis de oxidação foram induzidos no óleo de linhaça, representando neste estudo um nível baixo, moderado e elevado, caracterizados por uma concentração de hidroperóxidos de  $2,47 \pm 0,02$  (LOW),  $3,87 \pm 0,04$  (MED) e  $4,69 \pm 0,04$  meq LOOH/Kg (HIGH), respectivamente. O grupo que recebeu a ração LOW pode ser considerado o grupo controle negativo, pois o óleo utilizado na formulação de sua ração não sofreu o processo de oxidação. O quarto grupo recebeu a dieta LOW, além da indução de diabetes mellitus do tipo 1 através de estreptozotocina no início do estudo sendo esse o grupo controle positivo (CONT+). O óleo de linhaça pré-oxidado utilizado no preparo das rações foi mantido a 4°C. A peletização das rações alterou a concentração dos marcadores primários e secundários, porém de forma proporcional, mantendo assim a diferença entre os três níveis. O grupo CONT+ apresentou menor ganho de peso que os demais. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos em relação ao perfil lipoproteico. Os grupos CONT+ e HIGH apresentaram menor concentração de ácidos graxos no fígado, em especial de ácidos graxos poli-insaturados. Igualmente, ambos os grupos CONT+ e HIGH apresentaram maior concentração de MDA hepático que os grupos MED e LOW, sugerindo um aumento do estresse oxidativo decorrente da ingestão de ácidos graxos poli-insaturados parcialmente oxidados. O grupo HIGH também apresentou um aumento da espessura da parede vascular e do tamanho do lúmen da aorta. Este perfil de resultados sugere que a ingestão crônica de ácidos graxos poli-insaturados parcialmente oxidados contribui para o aumento do estresse oxidativo em camundongos LDLr<sup>-/-</sup>, promovendo um aumento na concentração de MDA hepático similar àquele obtido com modelos que utilizam formas mais agressivas de indução. Considerando-se a tendência de aumento no consumo de ácidos graxos poli-insaturados Omega 3, os resultados deste estudo realizados com o óleo de linhaça apontam para a necessidade controle da estabilidade oxidativa desses óleos durante seu processamento e armazenamento, visto que níveis moderados de oxidação já poderiam apresentar potencial aterogênico.

Palavras Chaves: Aterosclerose; Estresse Oxidativo; Lipídios Oxidados.

## Abstract

NOGUEIRA, M.S. Consumption of oxidized lipids in the induction of oxidative stress associated with atherosclerosis in an animal model. 2015. 101f. [Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015].

Studies involving cell culture, animals and humans have been extensively applied in the monitoring of atherosclerosis, aiming its control or even this reversal. Among the animal models, it has been observed an appropriate response to the induction of dyslipidemia and inflammation, but a high resistance to oxidative stress induction. An alternative to overcome this limitation would be by the intake of diets containing oxidized fatty acids. However, studies that investigated the effect of consumption of peroxides and secondary products of lipid oxidation in the progression of atherosclerosis have shown controversial results. Therefore, the aim of this study was to alter an animal model for the development of atherosclerosis, aiming to raise the variation in biomarkers of oxidative stress through chronic consumption of polyunsaturated fatty acids partially oxidized under concentrations naturally present in the human diet. LDL receptor “knockout” mice (C57BL / 6) were divided into 4 experimental groups. All groups received a modified fat diet containing 30% fat for 90 days. Three levels of oxidation were induced in flaxseed oil, representing low, moderate and high levels, characterized by a hydroperoxide concentration of  $2.47 \pm 0.02$  (LOW),  $3.87 \pm 0.04$  (MED) and  $4.69 \pm 0.04$  LOOHs meq / kg (HIGH), respectively. The fourth group received the LOW diet, beyond diabetes mellitus type 1 through induction by streptozotocin at baseline (CONT +). The pre-oxidized flaxseed oil used to prepare the diets was maintained at 4 ° C. The pelletization changed the concentration of primary and secondary products, but proportionally, maintaining the difference between the three levels. CONT + group showed less weight gain than the others. No differences were observed between groups in relation to the lipoprotein profile. The CONT + and HIGH groups showed lower concentration of fatty acids in the liver, especially polyunsaturated fatty acids. In addition both CONT+ and HIGH groups showed higher concentrations MDA in the liver than MED and LOW groups, suggesting increased oxidative stress resulting from the intake of polyunsaturated fatty acids partially oxidized. The HIGH group also showed an increase in the thickness of the vascular wall and the size of the aorta lumen. This profile suggests that the chronic ingestion of partially oxidized polyunsaturated fatty acids contributes to increase oxidative stress in mice LDLr<sup>(-/-)</sup>, similar to that obtained with models using more aggressive forms of induction. Considering the trend of increased consumption of polyunsaturated fatty acids Omega 3, the results of this study conducted with flaxseed oil highlight to the need of controlling the oxidative stability of these oils during processing and storage, since moderate oxidation levels already present atherogenic potential.

Key Words: Atherosclerosis; Oxidative stress; Oxidised lipids.

## 1. Introdução

As doenças cardiovasculares (DCV) são responsáveis por um terço da mortalidade no mundo, sendo a aterosclerose sua principal causa (Lou-Bonafonte *et al.*, 2012). A aterosclerose afeta artérias de médio e alto calibre, levando ao enrijecimento da parede vascular causado pelo acúmulo de lipídios e cálcio. Esse acúmulo conduz à formação da placa, podendo restringir o fluxo de sangue e em caso de ruptura, originar coágulos com consequente isquemia (Lönn, Dennis e Stocker, 2012). A aterogênese desenvolve-se essencialmente em três fases: a disfunção do endotélio vascular, formação de estrias gordurosas e desenvolvimento da cápsula fibrosa. A hipótese mais aceita para a etiologia da aterosclerose pressupõe que a lesão inicial ocorra em resposta à injúria ao endotélio causada por distúrbio no fluxo sanguíneo (*shear stress*), presença de lipídios oxidados nas lipoproteínas ou presença de agentes infecciosos (Lou-Bonafonte *et al.*, 2012).

A lesão inicial gera uma condição inflamatória sub-clínica crônica, na qual há constante liberação de citocinas pró-inflamatórias, infiltração de monócitos, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e oxidação de moléculas de lipídios, colesterol e proteínas presentes na lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Iwata e Nagai, 2012). Dessa forma, três condições básicas estão presentes no processo aterosclerótico: dislipidemia, inflamação e estresse oxidativo. Estudos envolvendo cultura de células, animais e humanos tem sido extensivamente aplicados no estudo da aterosclerose, visando seu controle ou mesmo regressão. Entre os modelos animais atualmente utilizados, tem-se observado uma resposta adequada à indução de dislipidemia e inflamação, porém elevada resistência à indução de estresse oxidativo. Essa limitação metodológica tem sido superada através de intervenções mais agressivas e muitas vezes sem correspondência com o modelo humano, tais como exposição à radiação, aplicação de tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) e manipulação genética como os animais knockouts para as enzimas antioxidantes (Nomura e Yamaoka, 1999; Cooper *et al.*, 2002; Kunitomo *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Chew *et al.*, 2010; Sakata *et al.*, 2012; Jang *et al.*, 2013; Laher *et al.*, 2013).

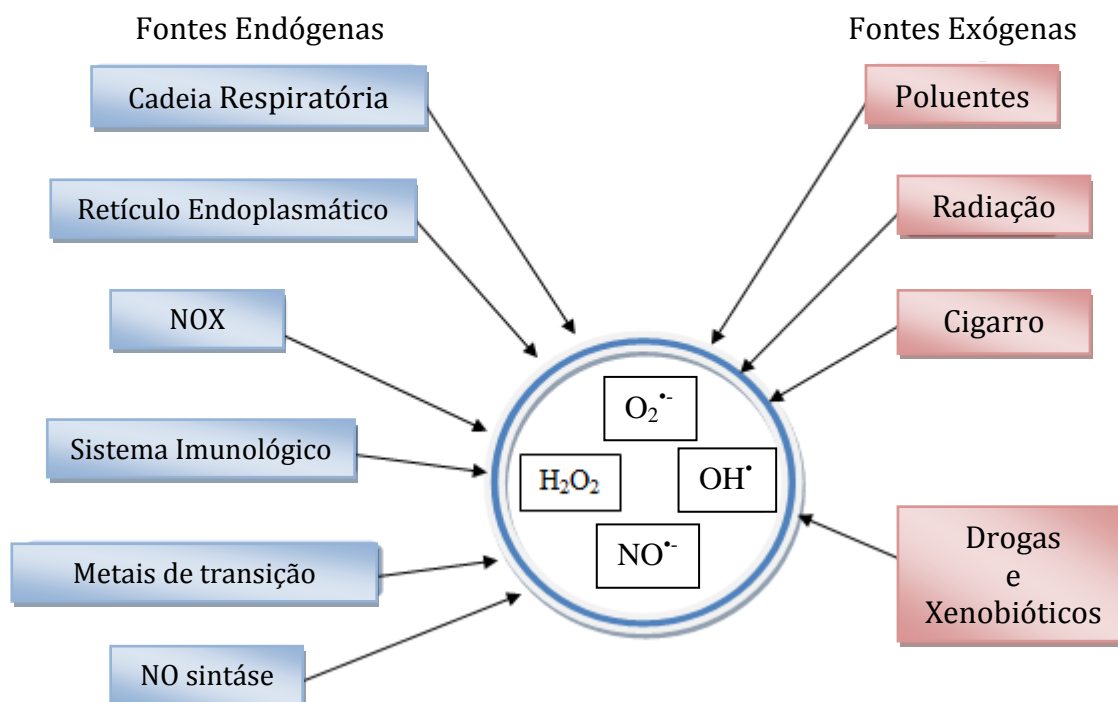
A utilização de camundongos “knockout” Apo E<sup>(-/-)</sup> ou “knockout” para receptor de LDL (LDL<sup>(-/-)</sup>) associada a uma dieta rica em gorduras melhorou significativamente a



indução da dislipidemia em roedores. Entretanto, biomarcadores de inflamação e estresse oxidativo ligados a peroxidação lipídica praticamente não se alteram, apesar dos animais apresentarem estrias de gordura, e em alguns casos esteatose hepática (Praticò, 2001; Umemoto *et al.*, 2012; Botelho *et al.*, 2013). Uma das alternativas para aumentar a resposta inflamatória poderia ser alcançada pela maior ingestão de ácidos graxos saturados, como o ácido palmítico (C16:0) que atuam pela via do receptores do tipo toll-like estimulando a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelas células (Kennedy *et al.*, 2009), ou ácidos graxos poli-insaturados Omega 6, como o ácido linoléico (LNA; C18:2 n6). Após a ingestão, o ácido linoléico é convertido através das enzimas dessaturases e elongases em ácido araquidônico (ARA; C20:4 n6), que atua como substrato das enzimas ciclooxygenases (COX) e lipoxigenases (LOX) na síntese de eicosanoides pró-inflamatórios (séries 2 e 4) a partir do ARA (Kuiper *et al.*, 2008).

As formas de indução do estresse oxidativo são mais complexas, incluindo exposição à radiação, administração de CCl<sub>4</sub>, aplicação de estreptozotocina para indução de diabetes, exposição excessiva à poluentes ou fumaça de cigarro, exercício físico extenuante, ou uso de animais transgênicos ou “knockout” para enzimas antioxidantes (Nomura e Yamaoka, 1999; Cooper *et al.*, 2002; Kunitomo *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Chew *et al.*, 2010; Sakata *et al.*, 2012; Jang *et al.*, 2013; Laher *et al.*, 2013). Entretanto, tratam-se de formas muito agressivas para um animal dislipidêmico, e exceto pela indução de diabetes, sem relação com as causas mais comuns que afetam indivíduos que desenvolvem aterosclerose. Por exemplo, camundongos geneticamente silenciados para a expressão de Superóxido Dismutase 2 (SOD2) apresentam elevada mortalidade neonatal, ou sobrevivem apenas por poucos dias (Sentman *et al.*, 2006).

O estresse oxidativo configura-se como um desequilíbrio entre a exposição do organismo aos agentes oxidantes e a defesa antioxidante, conferida por enzimas endógenas específicas e compostos com elevado potencial de redução (Ozkanlar e Akcay, 2012; Riccioni *et al.*, 2012). As principais fontes geradoras de ROS no organismo são a cadeia respiratória e a ativação da NADPH-oxidase (NOX) pelo sistema imunológico e vascular (**Figura 1**).



**Figura 1:** Principais vias endógenas e exógenas de produção de ROS. Adaptado de Bhattacharyya *et al.* (2014)

Ambas as condições contribuem para a formação principalmente de ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e radical hidroxila ( $HO^{\bullet}$ ) (Blokina, Virolainen e Fagerstedt, 2003). Porém, para gerar uma diferença significativa nos biomarcadores em modelos animais, seria necessária a condução de um protocolo agressivo pouco associado às condições presentes no modelo humano para indução de aterosclerose. Além da cadeia respiratória e da ação da NOX, outra forma de gerar ROS no organismo é através da reação de Fenton (Blokina, Virolainen e Fagerstedt, 2003). Nesse caso, os hidroperóxidos formados através da oxidação dos ácidos graxos insaturados teriam sua decomposição catalisada pela presença de ferro, principalmente na forma ferrosa ( $Fe^{2+}$ ), levando à formação de radicais hidroxila (**Figura 1**). Embora haja controvérsia, alguns estudos têm demonstrado que a ingestão direta desses hidroperóxidos através do consumo de alimentos contendo lipídios parcialmente oxidados favoreceria o estresse oxidativo e, conseqüentemente, a oxidação das lipoproteínas presentes no endotélio, levando à formação de estrias gordurosas (Awada *et al.*, 2012; Sato *et al.*,

2012; Staprans *et al.*, 2005). Embora não se tenha informação sobre quanto da gordura ingerida pela população já estaria oxidada ou parcialmente oxidada, estima-se que essa fração seja representativa, principalmente em regiões onde a reutilização dos óleos de fritura ocorre com maior frequência (Monteiro, Mondini e Costa, 2000). Assim, a indução do estresse oxidativo e consequente progressão do processo aterosclerótico através do consumo crônico de lipídios oxidados parece ser mais condizente com o modelo humano que outras formas de indução tais como exposição à radiação ou alterações genéticas (de Godoy *et al.*, 2007; Heshmati, Mishra e Koupil, 2013).

Além do consumo de lipídios oxidados, uma maior ingestão de sal e ferro assim como menor ingestão de selênio comum na dieta ocidental, também estão associadas ao aumento dos fatores de risco para DCV. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) o consumo de sal e açúcar pela população tem sido superior ao limite recomendado. O aumento no consumo desses ingredientes aumenta o risco de hipertensão arterial, obesidade e diabetes, contribuindo para o aumento de DCV (OMS 2012). O selênio é essencial para a formação de selenoproteínas, como a glutathione peroxidase (GPx) e a tioredoxina redutase (TrxR/TXNRD), sendo essencial à atividade antioxidante endógena (Fairweather-Tait *et al.*, 2011). O excesso de íons ferro também poderia contribuir para o estresse oxidativo através de sua ação catalítica na reação de Fenton. Embora a proporção de ferro biodisponível para a reação de Fenton no organismo seja baixa, tratamentos que elevam os níveis plasmáticos de ferro em pacientes com anemia ou doença renal crônica, por exemplo, apresentaram aumento nos mediadores de estresse oxidativo e inflamação, promovendo uma maior incidência de DCV nesses indivíduos (Lim e Vaziri, 2004). Nesse contexto, ressalta-se que em alguns países incluindo o Brasil, a suplementação com ferro é involuntária (OMS, 2012).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi alterar um modelo animal de referência para desenvolvimento de aterosclerose, caracterizado pelo uso de camundongos “knockout” para receptor de LDL submetidos à dieta hiperlipídica, visando elevar a variação de biomarcadores de estresse oxidativo e desfechos clínicos para aterosclerose, através do consumo de uma dieta contendo ácidos graxos poli-

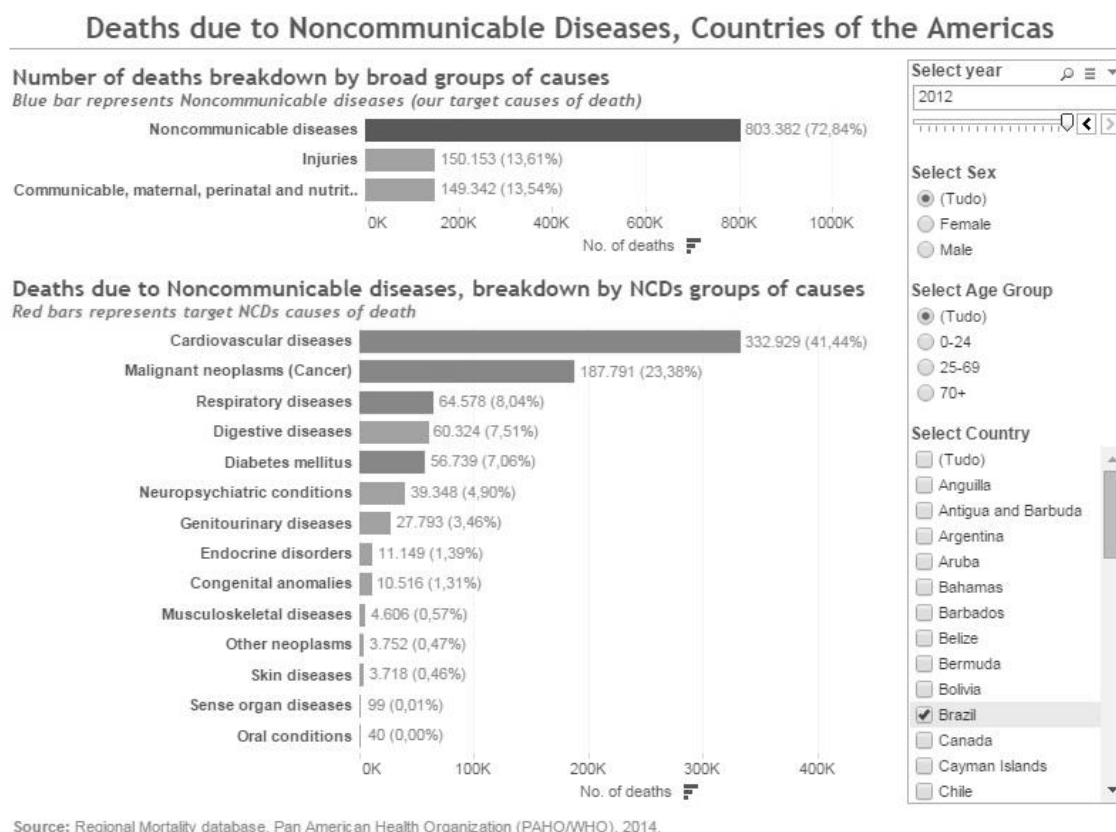
insaturados parcialmente oxidados, maior consumo de sal e ferro e menor consumo de selênio.

## **2. Revisão de literatura**

### **2.1. Panorama epidemiológico das doenças cardiovasculares no mundo e no Brasil.**

Segundo a OMS em 2008, 68% das mortes no mundo foram decorrentes de doenças não transmissíveis (DNT) sendo as quatro principais: DCV, câncer, diabetes e doenças respiratórias crônicas. Dentre estas, as DCV correspondem à principal causa da mortalidade mundial totalizando 17,5 milhões de mortes, o que representa 46% dos óbitos por DNT e 30% do total de mortes.

Contudo, este percentual pode ser ainda maior nos países pouco desenvolvidos e em desenvolvimento, podendo representar mais de 80% dos óbitos acometendo quase que igualmente ambos os sexos. Apenas na região das Américas, estes números correspondem a 1,6 milhões de mortes sendo que 30% destas ocorrem prematuramente em indivíduos de 30 a 69 anos (PAHO/WHO, 2014). No Brasil 72% dos óbitos ocorrem devido às DNT sendo 41% destes devido às DCV como mostra a **Figura 2.**



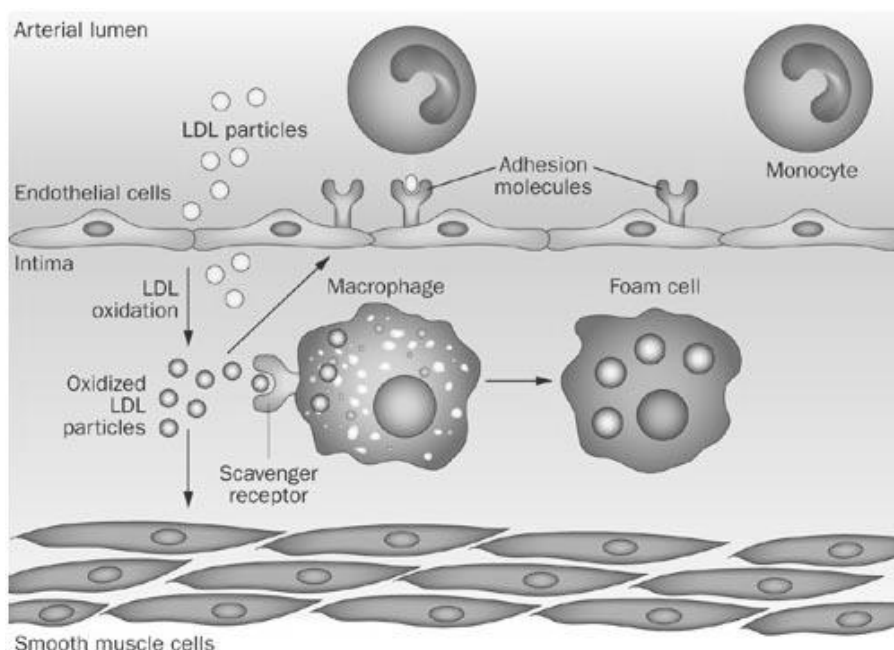
**Figura 2:** Mortes por Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil em 2012, PAHO/WHO (2014)

Apesar dos esforços direcionados à prevenção e ao tratamento das DCV, estima-se que em 2030 cerca de 23,3 milhões de indivíduos irão a óbito devido as DCV no mundo (Mathers e Loncar, 2006).

## 2.2. Aterosclerose e doenças cardiovasculares

A etiologia das DCV é multifatorial e está relacionada ao estilo de vida, às doenças metabólicas e a hereditariedade (Zaina e Lund, 2011). Contudo, um dos principais fatores envolvidos no desenvolvimento das DCV é o consumo de uma dieta rica em gorduras, proteínas animais, açúcares e sal (Daniels e Greer, 2008). Atualmente a aterosclerose é considerada uma doença crônica e progressiva (Ratheesh *et al.*, 2011) que afeta artérias de grande e médio calibre, acarretando a infiltração de lipoproteínas na parede vascular (Zaina e Lund, 2011). A aterosclerose é predominante em regiões de fluxo sanguíneo irregular, como na raiz da aorta, curvatura menor do arco aórtico, raiz da artéria inominada, bifurcação da carótida e ramificação da artéria celíaca com a aorta abdominal, tanto quanto em outras regiões do sistema coronariano (Rezvan *et al.*, 2011). O processo aterosclerótico leva a indução de uma resposta inflamatória que

se inicia quando monócitos presentes na monocamada endotelial ativada penetram na camada íntima (**Figura 3**). Nessa etapa, os monócitos se diferenciam em macrófagos que, por sua vez, são capazes de fagocitar a LDL que foi oxidada pelas ROS presentes no local, formando as células espumosas (Rocha e Libby, 2009).



**Figura 3:** As partículas de LDL circulantes em excesso no lúmen arterial infiltram-se na túnica íntima onde sofrem oxidação mediada pelas ROS. Uma vez oxidadas (oxLDL), ocorre ativação de moléculas de adesão, internalização de monócitos que se diferenciam em macrófagos e fagocitam as partículas de oxLDL formando células espumosas, iniciando-se assim a formação da placa aterosclerótica. Adaptado de Rocha e Libby (2009).

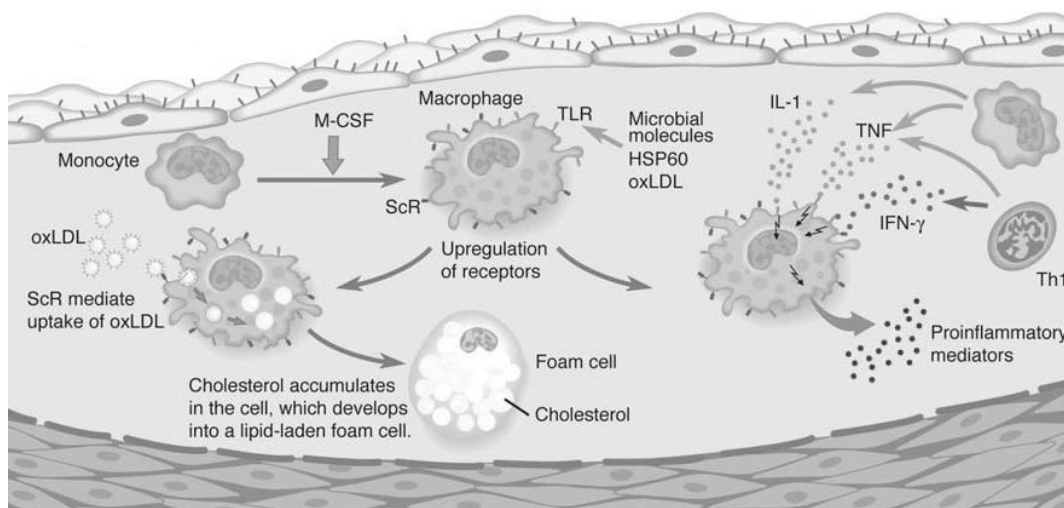
O acúmulo de lipídios e o aumento na liberação de citocinas inflamatórias levam a alterações histológicas cada vez mais complexas, com considerável variabilidade individual. A presença das células espumosas na túnica íntima contribui para o aumento da síntese de citocinas inflamatórias, causando um aumento na quimiotaxia de leucócitos para o local, contribuindo para exacerbar a resposta inflamatória. Além disso, as células musculares lisas migram da túnica média para a íntima, ocasionando um aumento da produção de matriz extracelular e, conseqüentemente, a formação de uma capa fibrosa (Libby, Ridker e Hansson, 2011). Desta forma, excesso de LDL (dislipidemia), inflamação e estresse oxidativo são condições associadas à gênese e progressão da aterosclerose.

### 2.3 Aterosclerose e dislipidemia

A elevada concentração de colesterol total, triglicerídeos e LDL e baixa concentração plasmática de HDL (high density lipoprotein), são considerados importantes fatores de risco para doenças coronárias, uma vez que a deposição de lipoproteínas no espaço subendotelial consiste em uma das etapas fundamentais para o início e a progressão da aterogênese (Stocker e Keaney, 2004; Houston *et al.*, 2009). A importância da dislipidemia no processo aterosclerótico pode ser evidenciada pela redução da mortalidade por DCV associada à terapia a base de estatinas tanto em pacientes com quadro de dislipidemia como em pacientes com dislipidemias primárias. Estatinas são fármacos capazes de inibir a síntese endógena de colesterol, reduzindo de forma expressiva o nível de LDL circulante e apresenta como efeito pleiotrópico de redução da inflamação (Wierzbicki, Poston e Ferro, 2003). Segundo o estudo 4S (The Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S), 1994) realizado com 4.444 pacientes de risco cardiovascular, as estatinas reduziram 35% do colesterol, e em 42% o risco de morte por ataque cardíaco após 5 anos de intervenção.

### 2.4 Aterosclerose e inflamação

Na resposta inflamatória ocorre o recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório, sendo os neutrófilos e os monócitos as primeiras células a migrarem para o local da lesão. Essa migração é dependente dos mediadores quimiotáticos gerados no tecido injuriado (**Figura 4**).



**Figura 4:** Após a migração dos monócitos para a túnica íntima vascular, ocorre à diferenciação destes em macrófagos via M-CSF (macrophage colony-stimulating factor). Os macrófagos reconhecem a LDL oxidada através de receptores scavengers (ScR), as internalizam gerando células espumosas ricas em colesterol, liberando fatores teciduais, ROS, citocinas, metaloproteinases de matriz. Outros macrófagos sofrem a ativação via interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) liberado pelos linfócitos Th1 que são reconhecidos via receptores TLR (tool like receptors), levando ao aumento do processo inflamatório no sítio da lesão aterosclerótica. Adaptado de Hansson, Robertson e Söderberg-Nauclér (2006).

Esses mediadores aumentam a expressão de moléculas de adesão, contribuindo para o processo de rolamento e adesão dos leucócitos à parede do vaso sanguíneo (Granger e Kubes, 1994; Hubbard e Rothlein, 2000; Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004). No sítio inflamatório, o macrófago passa por um processo de ativação que o capacita a desenvolver quimiotaxia, fagocitose, síntese e exposição de antígenos, lise de parasitas intracelulares e atividade antitumoral. Ao desempenhar essas funções, as células liberam grande quantidade de enzimas hidrolíticas, diversos mediadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), a interleucina 6 (IL-6) e a proteína C reativa (PCR), além do aumento da expressão de moléculas de adesão como as ICAM (*Inter-Cellular Adhesion Molecule 1*), VCAM (*vascular cell adhesion molecule 1*), e-selectina e óxido nítrico (Haddy *et al.*, 2003; Ratheesh *et al.*, 2011). Além desses mediadores, há elevada produção de metabólitos do ácido araquidônico (ARA), como as prostaglandinas (PGs) e leucotrienos (LTBs) pela via das ciclooxygenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2), e lipoxigenases (LOX) com liberação de moléculas como  $\text{OH}^{\bullet}$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$



pelos eicosainóides (Keaney e Vita, 1995; MacMicking, Xie e Nathan, 1997; Pouliot *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1998).

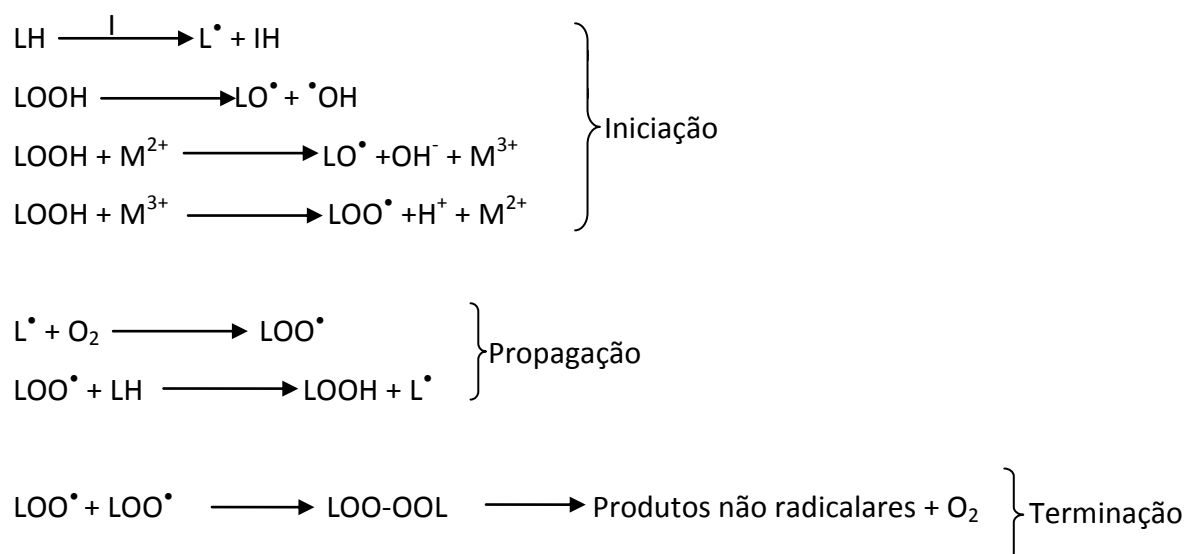
Apesar dos inúmeros estudos realizados visando associar a aterogênese com o processo inflamatório, diferentemente da dislipidemia, não há até o momento nenhum resultado conclusivo em que a relação ao uso de antiinflamatórios e a redução de desfechos clínicos (Couzin-Frankel, 2012).

## 2.5 Aterosclerose e estresse oxidativo

A oxidação nos sistemas biológicos ocorre devido à ação das espécies reativas radicalares e não radicalares presentes no organismo. As espécies reativas radicalares apresentam um elétron desemparelhado no último orbital, o tornando a molécula reativa (Blokhina, Virolainen e Fagerstedt, 2003). Elas podem ser geradas por fontes endógenas ou exógenas. As fontes endógenas incluem processos biológicos que normalmente ocorrem no organismo, tais como: redução de flavinas e tióis; resultado da atividade de oxidases, ciclooxigenases, lipoxigenases, desidrogenases e peroxidases; presença de metais de transição no interior da célula e o sistema de transporte de elétrons da cadeia respiratória. Essa geração de espécies reativas envolve várias organelas celulares, como mitocôndrias, lisossomos, peroxissomos, núcleo, retículo endoplasmático e membranas (Machlin e Bendich, 1987).

As principais fontes exógenas geradoras de espécies reativas incluem tabaco, poluição, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações (Machlin e Bendich, 1987; Sener *et al.*, 2005). Nos processos biológicos há formação de diversas espécies reativas, sendo as principais: ânion superóxido, radical hidroxila, peróxido de hidrogênio, radicais alcoxila e peroxila, oxigênio singlete,  $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}/\text{Cu}^{+}$  e óxido nítrico (Erenel, Erbaş e Aricioğlu, 1993; Rice-Evans e Burdon, 1993). Em condições específicas, as espécies reativas podem causar danos, agindo diretamente sobre proteínas, lipídios, DNA e outros. Por exemplo, os ácidos graxos poli-insaturados presentes nos fosfolipídios de membranas são muito susceptíveis a ação oxidante das ROS, em função da ligação- $\pi$  presente nos ácidos graxos insaturados. Essa ligação é mais fraca e de menor energia, porque os elétrons  $\pi$  estão mais expostos e consequentemente, responsável pela maior reatividade dos ácidos graxos insaturados

(Chaiyasit *et al.*, 2007; Frankel, 2005). Em resumo, a oxidação lipídica pode ser descrita em três etapas (**Figura 5**), conhecidas como iniciação, propagação e terminação:



**Figura 5:** Etapas da oxidação lipídica e da catálise mediada por metais. I: iniciador que pode ser uma espécie reativa, LH: ácido graxo, L•: ácido graxo com radical centrado no carbono; LOO•/LO•: radical peroxila e alcóxila, LOOH: hidroperóxido, M: metais. Adaptado de Frankel (2005).

Ésteres de colesterol e triacilgliceróis contendo ácidos graxos poli-insaturados são oxidados na presença de ROS, metais como os íons de ferro ou cobre e radicais liberados pelas células endoteliais da parede arterial. Os hidroperóxidos formados pela oxidação dos lipídios se decompõem em aldeídos que interagem com a lisina livre da apolipoproteínaB (apoB). Além da apoB, as partículas de LDL são compostas principalmente por colesterol livre, colesterol esterificado e triacilgliceróis, formando um complexo envolvido por uma monocamada de fosfolipídios. Cerca de 80% da LDL humana é composta de lipídios, sendo mais da metade poli-insaturados, como o ácido linoleico e o ácido araquidônico, altamente susceptíveis à oxidação (Itabe, 2012; Spiteller, 2005). A oxidação do LDL forma uma mistura de produtos, que inclui  $\alpha$ - e  $\beta$ -epoxicolesterol, 7- $\alpha$  e 7- $\beta$ -hydroxicolesterol e 7-ceto-colesterol, sendo estes produtos responsáveis pela maior parte da citotoxicidade gerada pelas partículas de LDL oxidadas (Frankel e Meyer, 2000; Frankel, 2005). Desta forma, a oxidação desses ácidos graxos poli-insaturados favorece a formação de novas espécies, capazes de

oxidar os grupos amino livres dos resíduos de lisina da apoB. Nessa reação ocorre anulação da carga positiva da lisina, tornado a LDL negativamente carregada (Brown e Goldstein, 1983). A LDL oxidada (oxLDL) é caracterizada pela presença de vários lipídios oxidados e resíduos de aminoácidos modificados, não sendo mais reconhecida pelos receptores de LDL nos tecidos. Essa oxLDL é então fagocitada pela ação do sistema imunológico, contribuindo assim para o processo aterosclerótico (Itabe, 2012; Iwata e Nagai, 2012).

## **2.6 Modelo animal para indução de aterosclerose**

### **2.6.1 Diferentes espécies de animais como modelo de indução de aterosclerose**

Estudos relativos à gênese e progressão da aterosclerose, assim como intervenções que visem a redução da placa aterosclerótica, têm sido conduzidos *in vitro*, *ex-vivo*, e *in vivo*. Embora os modelos animais apresentem limitações em termos de similaridade com processos biológicos e patológicos em humanos, têm sido muito utilizados na investigação das vias metabólicas associadas à alterações observadas nos desfechos clínicos, assim como na identificação de novos biomarcadores. Entre os modelos animais mais utilizados no estudo da aterosclerose, têm-se camundongos, ratos, coelhos, *hamsters* e porquinhos da Índia, geralmente alimentados com uma dieta rica em gordura e/ou colesterol (Rezvan *et al.*, 2011).

Coelhos são amplamente utilizados em estudos com aterosclerose e tem o mérito de serem pequenos e relativamente de menor custo, mas suficientemente grandes para permitir intervenções cirúrgicas. Sendo herbívoro, o coelho não é inerentemente propenso à aterosclerose. Nesse caso a indução de lesões vasculares necessita de uma dieta rica em colesterol (Russell e Proctor, 2006; Staprans *et al.*, 2000). Richardson *et al.* (1997) demonstraram que a doença respiratória comum em coelho conhecida como "snuffles" (*Pasteurella multocida*) tem consequências aterogênicas. Foi demonstrado que coelhos livres de patógenos específicos e alimentados com uma dieta rica em colesterol não conseguem desenvolver lesões aórticas. Essas informações trouxeram algumas críticas sobre estudos em coelhos,

especialmente aqueles realizados antes da atual ênfase em padrões rígidos de saúde microbiológica em animais experimentais (Russell e Proctor, 2006). Coelho Watanabe Heritable Hypelipidemic (WHHL) têm deficiência natural de receptor de LDL e são utilizados como modelo de hipercolesterolemia familiar (Moghadasian, 2002).

Os ratos normais, assim como os cães, são tipicamente resistentes ao desenvolvimento de aterosclerose, tornando-os um modelo inadequado para investigação de doenças cardiovasculares. Além disso, o metabolismo lipídico do rato normal é baseado principalmente no transporte através de HDL, em lugar de LDL como nos humanos, contribuindo assim para a resistência à aterogênese (Moghadasian, 2002). Ratos Zucker são uma linhagem que incorpora um gene mutante espontâneo (*fa*) que afeta a ação da leptina, um hormônio envolvido na regulação da ingestão de alimentos. Assim, os ratos Zucker desenvolvem uma variação da síndrome metabólica, tornando-se obesos, moderadamente insulino resistentes e hipertrigliceridêmicos, mas sem progressão para a diabetes ou complicações cardiovasculares (Russell e Proctor, 2006). Já os ratos Zucker obesos diabéticos (ZDF), variação desenvolvida por Peterson *et al.* (1990) exibem muitas das complicações do estado diabético, particularmente dano microvascular, levando à esclerose glomerular e retinopatia. Porém, também não há relatos de aterosclerose nesses animais.

Koletsky (1973) observou uma nova mutação em uma linhagem proveniente do cruzamento entre ratos Sprague-Dawley e ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Animais dessa linhagem eram hipertensos e se tornaram altamente obesos, hiperlipidêmicos e hiperinsulinêmicos. O mais interessante, é que esses animais desenvolveram aterosclerose incluindo lesões avançadas. A nova linhagem, designada como SRHOB foi mantida como uma colônia fechada, mas sendo criada de forma muito seletiva, acabou resultando em consangüinidade e perda de susceptibilidade às DCV. Pesquisas recentes utilizando a linhagem SHORB concentra-se em hipertensão, doença renal e síndrome metabólica. Os ratos das linhagens SHR / N-cp e LA/N-cp, sendo linhagens congênicas, têm por definição a característica de serem altamente puras e manterem o fenótipo de obesidade. Porém a consangüinidade ao longo de muitos anos tem sido acompanhada por mudanças genéticas e fenotípicas desses ratos. Nesse caso, a resistência à insulina e por consequência, o grau de hiperinsulinemia, diminuíram significativamente. Além disso, as linhagens congênicas

perderam totalmente a característica de propensão à aterosclerose. Assim, essas linhagens são úteis para estudos metabólicos, mas falta a DCV espontânea (Russell e Proctor, 2006).




Hamsters configuram-se como animais adequados para o estudo de aterosclerose, devido as suas muitas semelhanças metabólicas com humanos. Ao contrário de outros roedores, hamsters desenvolvem lesões na aorta quando alimentados com uma dieta aterogênica. No entanto, hamsters também possuem perfis de lipoproteínas plasmáticas diferentes de humanos, sendo o desenvolvimento de lesões relatado como inconsistente e, normalmente, pouco reproduzível (Ye, Cheah e Halliwell, 2013).

Os porquinhos da Índia apresentam perfil de lipoproteínas semelhantes ao dos humanos, além de apresentarem compatibilidade entre as enzimas ligadas ao metabolismo lipídico, e similar resposta à dieta, exercícios e tratamento medicamentoso. Apesar das semelhanças, os porquinhos da Índia não tem sido a primeira escolha de modelo animal para o estudo da aterosclerose (Ye, Cheah e Halliwell, 2013), pois não apresentam lesões ateroscleróticas avançadas, além de serem escassos os anticorpos para o estudo das vias envolvidas na inflamação aterogênica (Xiangdong *et al.*, 2011).



Camundongos não são ideais para o estudo de alterações ateroscleróticas induzidas pela dieta, devido à sua tolerância inata às dietas ricas em colesterol, e considerável diferença no perfil de lipoproteínas plasmáticas quando comparados aos humanos (Ye, Cheah e Halliwell, 2013). Entretanto, camundongos são muito práticos e apresentam menor custo para manutenção das linhagens. Dessa forma, alterações genéticas conduzidas através de transgenia, silenciamento (knockout) ou super expressão permitiram a obtenção de linhagens capazes de desenvolver estrias gordurosas ou mesmo placas ateroscleróticas, apresentando também um perfil lipoproteico mais próximo ao humano após consumo de dietas ricas em gordura (Hermans *et al.*, 2007).

Xiangdong *et al.* (2011) em sua revisão sobre modelos animais para aterosclerose, resumiu as principais vantagens e desvantagens de cada espécie animal. **(Quadro 1)**

**Quadro 1:** Principais vantagens e desvantagens dos modelos experimentais direcionados ao estudo da aterosclerose.

Modelo animal	Vantagens	Desvantagens
<p>Coelhos</p> 	<p>Naturalmente deficientes de receptor de LDL e hipertrigliceridêmicos. Fáceis de manter e manipular, amplamente utilizados em pesquisa, respondem bem ao colesterol da dieta e apresentam disponibilidade de linhagens transgênicas.</p>	<p>Locais de lesão menos semelhantes aos locais observados em humanos. A maior parte do colesterol em circulação está na forma de <math>\beta</math>-VLDL. Necessária concentração muito elevada de colesterol no plasma para induzir a aterosclerose, sem lesões avançadas, lipase hepática deficiente e sem aterosclerose espontânea.</p>
<p>Ratos</p> 	<p>Fáceis de manter e manusear, várias linhagens de ratos com hiperlipidemia hereditária (alguns dos quais estão associados à aterogênese) e ratos transgênicos com superexpressão da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) humana mais susceptíveis à aterosclerose.</p>	<p>Altamente resistentes a aterosclerose, alta concentração de HDL, naturalmente não expressam CETP.</p>
<p>Hamsters</p> 	<p>Expressam CETP. Podem desenvolver hipercolesterolemia e aterosclerose precoce com estrias gordurosas e placas complexas sob indução com dieta, sendo fáceis de serem manuseados.</p>	<p>Resultados inconsistentes e irreproduzíveis, principalmente em relação às lesões aórticas.</p>

Continuação do **Quadro 1**

Modelo animal	Vantagens	Desvantagens
<p>Porquinhos-da-Índia</p> 	<p>A maior parte do colesterol circulante está na forma de LDL, expressam CETP e LCAT, e apresentam inflamação aterogênica significativa com aumento de citocinas na aorta.</p>	<p>Ausência de lesões ateroscleróticas avançadas, os anticorpos envolvidos na inflamação aterogênica são pouco disponíveis e não consistem em bons modelos cirúrgicos.</p>
<p>Camundongos</p> 	<p>Geneticamente bem definidos, de fácil reprodução, tempo de geração curto, fáceis de serem mantidos e manuseados, e disponibilidade de várias linhagens transgênicas.</p>	<p>Altamente resistente à aterogênese, alta concentração de HDL plasmático, não expressam CETP, e dificuldades na coleta de sangue e na dissecação dos vasos de pequeno /médio porte.</p>

### **2.6.2 Camundongos como modelo de indução de aterosclerose**

O desenvolvimento da aterosclerose em modelo animal ocorre na presença de dislipidemia, inflamação sub-clínica crônica e estresse oxidativo. Em relação à dislipidemia, um expressivo progresso foi obtido com a manipulação genética de camundongos. Os modelos mais utilizados têm sido animais “knockout” para receptor de LDL (Chakraborty *et al.*, 2013; Nakamura *et al.*, 2013), “knockout” para ApoE (Ishibashi *et al.*, 1994; Surra *et al.*, 2013), duplo “knockout” para receptor de LDL e leptina, todos usando a linhagem C57BL/6 como background (Hasty *et al.*, 2007). Modelos ob/ob (Li *et al.*, 2009) e db/db (Kobayashi *et al.*, 2000; Hatley *et al.*, 2003; Laher *et al.*, 2013) também já foram estudados. Cada uma dessas linhagens apresenta características próprias, como descrito no **Quadro 2**.



**Quadro 2:** Descrição dos modelos experimentais de camundongos transgênicos.





Modelo de camundongo transgênico	Descrição
<p>Knockout para apolipoproteína E (ApoE<sup>-/-</sup>)</p> 	<p>Os animais dessa linhagem apresentam um aumento de 5 a 6 vezes o valor de colesterol plasmático em relação ao camundongo wild-type</p>
<p>Knockout para receptor de LDL (LDLr<sup>-/-</sup>)</p> 	<p>Os animais que sofreram o silenciamento do gene que codifica LDL receptor apresentam o dobro da concentração de colesterol em relação ao camundongo wild-type, além de apresentarem aumento de 7 a 9 vezes na concentração de IDL e LDL sem diferença significativa em relação ao HDL</p>
<p>Camundongo db/db</p> 	<p>Os animais db/db apresentam maior oxidação de ácidos graxos em relação ao wild-type, em paralelo a hiperglicemia</p>
<p>Camundongo ob/ob</p> 	<p>Os animais ob/ob não apresentam ação de leptina, responsável pelo controle da ingestão alimentar, e exibem obesidade e disfunção endotelial.</p>

Tabela adaptada de Leong, Ng e Jaarin (2015)

Várias linhagens de camundongos têm sido desenvolvidas com objetivo de induzir endogenamente o estresse oxidativo, portanto sem uso de drogas ou indutores artificiais. Tratam-se de animais transgênicos ou “*knockout*” para enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), que tem sido utilizado para avaliação dose-dependente de compostos antioxidantes e drogas que mimetizam SOD (Melov, 2002). Um modelo muito interessante foi reportado por Oikawa et al. (2012). Os autores desenvolveram um camundongo transgênico (OKD48) capaz de responder significativamente à indução de estresse oxidativo por arsenito de sódio, dimetilmaleato ou irradiação. Embora eficientes, esses animais ainda representam um custo elevado para preparo e manutenção das linhagens em biotérios. Dessa forma, a

indução de estresse oxidativo nesses modelos configura-se como um desafio, dada a resistência dos animais em alterar os biomarcadores usualmente determinados na pesquisa clínica que incluem: MDA, atividade das enzimas antioxidantes por exemplo. Os métodos mais utilizados tem sido a indução de diabetes tipo 1 através da administração de estreptozotocina (Sakata *et al.*, 2012), dieta com ausência de tocoferol (Ramirez-Tortosa *et al.*, 2001) ou excesso de ferro (Fischer *et al.*, 2002), exposição dos animais ao CCl<sub>4</sub> (Nomura e Yamaoka, 1999), cloreto de cálcio (Wang, Krishna e Golledge, 2013) ou 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina-dicloreto (herbicida paraquat), submissão dos animais à inalação de fumaça de cigarro ou injeção de nicotina (Kunitomo *et al.*, 2009), e exposição à radiação (Jang *et al.*, 2013). Rezvan *et al.* (2011) também sugerem a indução de injúria vascular através de estenose química ou elétrica. Entretanto, a maior parte desses métodos não apresentam correlação com os fatores endógenos ou exógenos que causariam estresse oxidativo em humanos.

## **2.7 O consumo de lipídios oxidados e a indução de aterosclerose**

Apesar da ausência de estimativa para o consumo de lipídios oxidados pela população, acredita-se que esse valor seja elevado. A presença de maior proporção de açúcares e sal nos alimentos poderia contribuir para mascarar o caráter sensorial negativo decorrente da oxidação lipídica, permitindo que alimentos oxidados sejam consumidos, mesmo quando a concentração dos produtos secundários da oxidação já esteja elevada. Outro fator que contribui para esse quadro é o próprio consumo de uma dieta desequilibrada pela população, contendo maior proporção de gordura e carboidratos em lugar de proteínas, vitaminas e minerais (Leino *et al.*, 1999; de Godoy *et al.*, 2007). Entretanto, talvez os fatores que mais contribuam para o maior consumo de alimentos oxidados sejam a maior reutilização dos óleos de fritura e a permanência desses óleos por longos períodos de tempo sob altas temperaturas, associados ao pobre perfil de ácidos graxos característico dos óleos de menor custo (Costa Neto *et al.*, 2000).

Segundo Staprans *et al.* (1996 e 2005), foi observado em humanos e roedores que os lipídios oxidados são absorvidos pelo intestino e secretados como quilomícrons, da mesma maneira que os lipídios não oxidados. Em roedores, os ácidos graxos oxidados

que alcançam o fígado são em parte utilizados para a formação das VLDL e, consequente, formação de LDL já oxidada.

Estudos reportados por Spiteller (2005) sugeriram que o consumo direto de peróxidos através da dieta oxidada seria responsável por um expressivo dano cardiovascular.

## **2.8 Consumo de sal, ferro e selênio pela população**

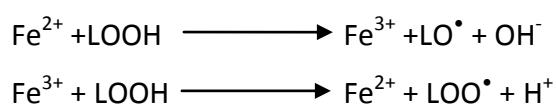
O sódio é o principal nutriente responsável pela manutenção do balanço ácido-base no organismo, pela transmissão de impulsos nervosos e pela função celular normal. Em pessoas saudáveis quase 100% do sódio ingerido é absorvido, e sua excreção é realizada pelo sistema urinário, como forma de manter homeostase (Holbrook *et al.*, 1984). Altas concentrações de sódio na circulação sanguínea acarretam em problemas cardiovasculares, como aumento da pressão arterial, e problemas renais como a formação de cálculos (OMS, 2012).

Apesar de o sódio ser comumente associado ao sal de cozinha, ele também está presente em outros diversos alimentos, como bolachas, carnes processadas e salgadinhos (Webster, Dunford e Neal, 2010). Segundo Cogswell *et al.* (2014), 43 % do consumo de sódio pelas crianças em idade escolar nos Estados Unidos é proveniente de pizza, salgadinhos, sanduíches, pães e carnes processadas. Esse padrão reflete também o consumo da população mundial (OMS, 2012), que ingere o dobro de sódio recomendado pela OMS (Malta, Moraes Neto e Silva Junior, 2011). Devido aos riscos do consumo em excesso deste nutriente, a OMS lançou o Plano de Ação de 2013-2020, que sugere estratégias para a redução da ingestão de sal, sendo essa uma das abordagens de menor custo para a prevenção de DNT.

O ferro é o nutriente presente na hemoglobina, sendo responsável pelo transporte de oxigênio no organismo. O baixo consumo desse nutriente acarreta em anemia ferropriva, constituindo-se na doença de desordem nutricional mais comum no mundo (OMS, 2013). Com o objetivo de melhorar o quadro desse problema, principalmente entre gestantes e crianças, o Ministério da Saúde, criou em 1999 o “Compromisso social para a redução da anemia ferropriva no Brasil” que dentre as cláusulas contém a iniciativa de enriquecimento de farinha de trigo e milho com ferro

(Jordão, Bernardi e Barros Filho, 2009). Em função desse programa, o número de casos de anemia vem sendo reduzido. Entretanto, essa suplementação pode levar a um consumo elevado de ferro nas pessoas saudáveis, conduzindo para um excesso de ferro livre no organismo (Swanson, 2003). Essa condição pode ser prejudicial, uma vez que o ferro livre pode catalisar a decomposição dos hidroperóxidos, contribuindo para o aumento do estresse oxidativo via reação de Fenton (Huang, 2003; Kabat *et al.*, 2007).

Reação de Fenton (Adaptado de Frankel (2005):



O selênio é um mineral essencial para a saúde por ser constituinte das selenoproteínas. Dentre elas destaca-se a glutathione peroxidase (GPx), uma enzima antioxidante que catalisa a remoção do peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos de lipídios e fosfolipídios, além de modular a síntese de eicosanóides. A deficiência de selênio na dieta pode predispor a menor síntese de GPx, e, conseqüente, aumento da concentração de peróxido de hidrogênio, aumentando o estresse oxidativo (Rayman, 2000; Fairweather-Tait *et al.*, 2011).

## 2.9 Justificativa

Em síntese, modelos animais são necessários ao estudo dos mecanismos envolvidos na progressão da aterosclerose, assim como na avaliação de potenciais formas de tratamento ou prevenção. Em geral, os modelos atualmente aplicados respondem satisfatoriamente à dislipidemia, inflamação e até mesmo, dependendo do tempo de intervenção, ao desfecho clínico. Entretanto, tais modelos costumam apresentar elevada resistência a alterações dos biomarcadores do estresse oxidativo, tais como os marcadores da peroxidação lipídica e a atividade antioxidante. O **Quadro 3** apresenta alguns exemplos de protocolos experimentais aplicados à roedores, capazes de promover elevações no perfil de lipoproteínas e marcadores inflamatórios, mas sem sucesso na alteração de biomarcadores associados ao estresse oxidativo. Também estão exemplificados no **Quadro 3** protocolos eficientes para a elevação dos parâmetros oxidativos. Em todos esses modelos, a forma de indução aplicada pode ser considerada agressiva e, portanto, apresentam baixa correlação com as formas de indução humana.

**Quadro 3:** Protocolos experimentais aplicados em roedores.

Modelo Animal	Tempo de Tratamento	Intervenção	Principais Resultados	Ref.
Camundongo LDLr <sup>(-/-)</sup>	24 semanas	Dieta aterogênica com 2% de colesterol	1000mg/dL de colesterol total, 50mg/dL de triglicerídeos, 20% da aorta apresentou lesão aterosclerótica, aumento da expressão de ICAM e IL-6	Dupasquier, Chantal MC, et al. <i>American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology</i> 293.4 (2007)
Camundongo LDLr <sup>(-/-)</sup>	12 semanas	Dieta High Fat (0,15% de colesterol e 36,2% de gordura)	Lesão aterosclerótica significativa na aorta, com presença de macrófagos na lesão, aumento da expressão de ICAM e VCAM, aumento na produção de ânion superóxido	Sun, Li, et al. <i>Cardiovascular Research</i> (2009).
Camundongo LDLr <sup>(-/-)</sup>	12 semanas	Dieta Western-Type (42% de gordura do leite e 0,15% de colesterol)	858mg/dL de colesterol, total, 369mg/dL de triglicerídeos, apresentou 2,3 vezes mais isoprostanos na urina em relação ao baseline, lesão na aorta	Hasty, Alyssa H., et al. <i>The Journal of Nutritional Biochemistry</i> 18.2 (2007)
Camundongo LDLr <sup>(-/-)</sup>	18 semanas	Dieta rica em colesterol (4% de colesterol e 10% de manteiga de cacau)	60% de lesão na aorta, 3 vezes mais espessa a camada intima em relação ao animais controle, disfunção endotelial em relação ao controle, aumento da expressão de NF-κB, e menor expressão de IL-10	Mehta, Jawahar L., et al. <i>Circulation Research</i> 100.11 (2007)
Camundongo LDLr <sup>(-/-)</sup>	12 semanas	Dieta High Fat (0,15% colesterol e 41% de gordura)	1842mg/dL de colesterol total, 147mg/dL de triglicerídeo, 285mg/dL de glicose, aumento da concentração de Leptina, MCP-1 e resistina, 5% de lesão na aorta, aumento da expressão genica de SOD, GPx e Catalase, aumento da concentração de isoprostanos no plasma.	Collins, Alan R., et al. <i>Circulation Research</i> 104.6 (2009)
Camundongo LDLr <sup>(-/-)</sup>	16 semanas	Dieta High Fat (30,72% de gordura)	306mg/dL de colesterol total, 115mg/dL de triglicerídeos, 2,6nmol de MDA/mg pnt, não apresentou diferença nas enzimas antioxidantes SOD, GPx, GR e catalase com relação aos demais grupos.	Botelho, Patrícia Borges, et al. <i>European Journal of Lipid Science and Technology</i> (2015).
Camundongo C57BL/6	4 semanas	Dieta High Fat (70% de gordura)	1,41nmol/mg ptn de MDA, apresentaram valores menores de GSH, Catalase e GPx em relação a dieta padrão, menor expressão de RNA mensageiro de Catalase e GPx.	Lin, Chun-che, and Mei-chin Yin. <i>British Journal of Nutrition</i> 99.01 (2008).

Continuação **Quadro 3**

Modelo Animal	Tempo de Tratamento	Intervenção	Principais Resultados	Ref.
Camundongo Kunming	-	CCl <sub>4</sub>	Aumento das aminotransferases, diminuição dos níveis de GSH, menor atividade de SOD, 4,5 nmol/mg ptn de MDA	Yang, Jingyu, et al. <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> 58.10 (2010).
Camundongo Apoe <sup>(-/-)</sup>	16 semanas	Dieta Padrão + 100µL de propileno glicol 3 vezes por semana	1mol/mg ptn de MDA na Aorta, aumento de expressão de NADPH oxidase, e Mn-SOD na aorta, aumento de MCP-1, TNF-α e COX-2	Husain, Kazim, et al. <i>American Journal of Nephrology</i> 32.4 (2010)
Camundongo db/db	6 semanas	Dieta Padrão	Menor expressão de SREBP-1, menor atividade da SOD, GPx e Catalase, 150pmol/mg ptn de MDA	Park, Hea Jin, et al. <i>The Journal of Nutritional Biochemistry</i> 22.4 (2011).
Camundongo C57BL/6	45 dias	170% de Overfeeding com dieta High Fat líquida (35% de óleo de milho)+ 32g de Alcool	1,9nmol/mg ptn de MDA, diminuição da expressão de PPAR-α,	Xu, Jun, et al. <i>Journal of Hepatology</i> 55.3 (2011).
Camundongo FLS	12 dias	Dieta Padrão	10nmol/100mg ptn de MDA, menor atividade de catalase	Harano, Yuichi, et al. <i>Liver International</i> 26.5 (2006).
Camundongo Kun-Ming	-	Etanol	3,5nmol/mg ptn de MDA, não houve diferença na atividade da GPx e SOD em relação ao grupo controle e apresentou uma menor atividade de GR em relação ao grupo controle	Zeng, Tao, et al. " <i>Chemico-Biological Interactions</i> 176.2 (2008).

A baixa ou ausente alteração nos biomarcadores oxidativos, após indução através da dieta hiperlipídica, limita o estudo da ação de antioxidantes como coadjuvantes no tratamento ou prevenção da condição aterosclerótica. Dessa forma, cientes do efeito aterogênico decorrente da ingestão de produtos da oxidação lipídica, buscou-se nesta pesquisa a substituição da gordura presente na dieta por um óleo parcialmente oxidado, sendo esta condição também associada a uma maior ingestão de sal e ferro, e menor ingestão de selênio, típica da dieta ocidental. Assim, espera-se que ao final do período experimental, os animais alocados no grupo que recebeu óleo parcialmente oxidado apresentem concentrações mais elevadas dos biomarcadores oxidativos, e possam ser utilizados em futuras pesquisas envolvendo compostos bioativos, como os antioxidantes naturais.

### **3 Hipóteses**

As seguintes hipóteses foram avaliadas neste estudo:

- Camundongos “knockout” para receptor de LDL mantidos sob uma dieta contendo ácidos graxos poli-insaturados parcialmente oxidados, maior proporção de sal e de ferro, e menor proporção de selênio apresentam alterações mais expressivas para biomarcadores de estresse oxidativo associados à aterosclerose.
- Essa alteração depende do tipo de biomarcador avaliado.
- Essa alteração é dose-dependente em função do nível de oxidação do óleo.

### **4 Objetivos**

O objetivo desse estudo foi de potencializar as alterações observadas nos biomarcadores oxidativos associados à aterosclerose num modelo animal de referência, principalmente através do consumo de óleo de linhaça parcialmente oxidado.



## **5 Relevância da pesquisa**

Os estudos que se propuseram a avaliar o efeito do consumo de lipídios oxidados na progressão da aterosclerose apresentam resultados controversos, normalmente conduzidos com dosagens elevadas. Neste ensaio dosagens dentro do limite considerado adequado ao consumo humano serão avaliados, assim como a formação de produtos da oxidação de um óleo com maior proporção de ácidos graxos omega 3 que omega 6.

Além disso, os resultados obtidos deste ensaio permitirão selecionar um modelo animal, assim como os biomarcadores mais sensíveis à futura intervenção com compostos bioativos, para ser utilizado em investigações visando à reversão do processo aterosclerótico. Embora haja modelos transgênicos mais eficientes para essa proposta, o protocolo utilizado neste estudo é mais próximo do modelo humano, uma vez que o consumo de lipídios oxidados é de ocorrência natural na população.

## 6 Material & Métodos

### 6.1 Material

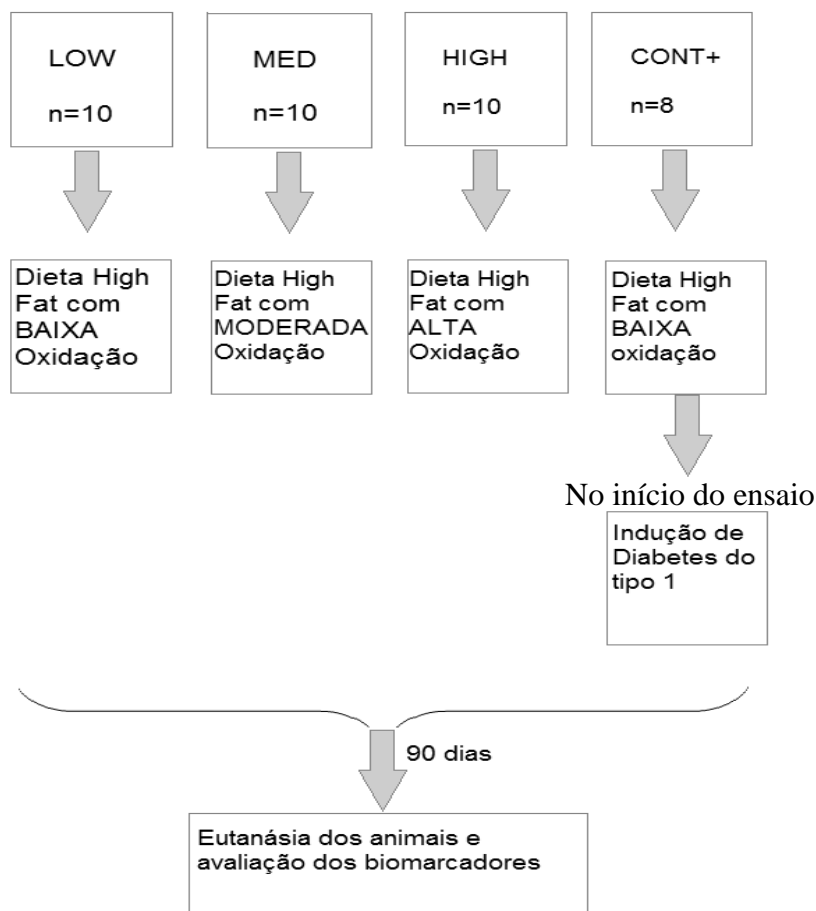
Foram utilizados os seguintes materiais e reagentes: óleo de linhaça dourada adquirido da empresa Pazze Indústria de Alimentos (Panambi, Brasil), acetonitrila, ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido tricloroacético (TCA), BF<sub>3</sub>-metanol 14%, Di-Terc-Butil Metil Fenol (BHT), hidroperóxido de cumeno a 80%, e TEP (tetraetoxi-propano) 97% adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Etanol, metanol, isoctano, heptano e n-hexano grau HPLC foram adquiridos da Merck S.A (Darmstadt, Germany). Os demais reagentes utilizados apresentaram grau de pureza analiticamente compatível. Água MiliQ foi utilizada no preparo de todas as soluções aquosas (Millipore Corp., Billerica, MA, USA).

### 6.2 Preparação do óleo oxidado

Inicialmente, o óleo de linhaça dourada foi submetido à oxidação térmica em diferentes intervalos de tempo (0 a 10 horas), visando à obtenção de um óleo com três níveis de oxidação: baixo, moderado e elevado. Amostras de 40mL de óleo foram colocadas em tubos “tipo Falcon” de 50mL. Os tubos foram mantidos a 100°C em banho maria. Alíquotas foram retiradas em intervalos de 1 hora para análise dos marcadores oxidativos. As amostras coletadas após 0, 5 e 10 horas foram utilizadas no preparo das rações.

### 6.3 Protocolo experimental

A seguir, 40 camundongos da linhagem C57BL/6 “knockout” para receptor de LDL<sup>(-/-)</sup> foram submetidos ao protocolo experimental descrito na **Figura 6**. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP sob protocolo CEUA/FCF/429 (Anexo 1).



**Figura 6:** Delineamento do ensaio biológico.

Os camundongos receberam uma dieta hiperlipídica modificada baseada em Tallman e Taylor (2003), conforme apresentado na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Composição da dieta utilizada no ensaio biológico (g/kg).

Ingrediente	AIN93M <sup>6</sup>	Hiperlipídica Compensada <sup>1</sup>
Amido de Milho	465,692	195,50
Caseína (>85% protein)	140,000	151,20
Amido de Milho Destrinizado (90-94% tetrassacarídeos)	155,000	100,00
Sacarose	100,000	100,00
Banha Suína	-	100,00
Óleo de Soja (sem aditivos)	40,000	-
Óleo de Linhaça <sup>2</sup>	-	200,00
Fibras <sup>3</sup>	50,000	100,00
Mix de Minerais (AIN-93M-MX) <sup>4</sup>	35,000	37,80
Mix de Vitaminas (AIN-93-VX)	10,000	10,80
L-Cistina	1,800	1,94
Bitartarato de Colina (41.1% colina)	2,500	2,70
TBHQ (Terq-butilhidroquinona) <sup>5</sup>	0,008	0,06
Total	1.000,000 g	1.000,00 g

<sup>1</sup>A compensação da dieta foi feita com base na redução de consumo estimado em ensaio piloto. Considerando uma redução de 8%, elevou-se a proporção de caseína, mix de minerais, mix de vitaminas, L-Cistina e Bitartarato de colina em 8%. Assim apesar de menor ingestão por parte dos animais alimentados pela dieta hiperlipídica, ficou garantido o aporte de macro e micronutrientes essenciais.

<sup>2</sup>O óleo de linhaça foi oxidado de forma a obterem-se rações contendo óleo oxidado em três níveis: baixo, moderado e elevado; permitindo assim a avaliação da 3ª hipótese apresentada neste estudo.

<sup>3</sup>A quantidade de fibras foi dobrada para viabilizar a obtenção de uma ração em pó com 30% de óleo, sendo 70% deste na forma física líquida.

<sup>4</sup>Foram realizadas alterações no mix de minerais especificadas na **Tabela 2**.

<sup>5</sup>Calculado a partir de 200ppm sobre o teor de gordura, independente do grau de insaturação.

<sup>6</sup>Dieta padrão AIN93M de acordo com Reeves, Nielsen e Fahey (1993)

**Tabela 2:** Composição dos Mix de Minerais das rações utilizadas no ensaio biológico (g/Kg).

Ingredientes	Mix de minerais	
	AIN 93M	Hiper Lipídica Compensada
Carbonato de Cálcio Anidro (40.04% Ca)	357,00	357,00
Fosfato de potássio monobásico (22.76% P, 28.73% K)	250,00	250,00
Cloreto de Sódio (39.34% Na, 60.66% Cl) <sup>1</sup>	74,00	148,00
Sulfato de Potássio (44.87% K, 18.39% S)	46,60	46,60
Citrato de Potássio (tri-potássio monohidratado) (36.16% K)	28,00	28,00
Óxido de Magnésio (60.38% Mg)	24,00	24,00
Citrato Férrico (16.5% Fe) <sup>2</sup>	6,06	18,18
Carbonato de Zinco (52.14% Zn)	1,65	1,65
Carbonato de Manganês (47.79% Mn)	0,63	0,63
Carbonato Cúprico (54.47% Cu)	0,30	0,30
Iodato de Potássio (59.3% I)	0,01	0,01
Selenito de Sódio Anidro (41.79% Se) <sup>3</sup>	0,01025	0,005125
Paramolibdato de Amônia tetra-hidratado (54.34% Mo)	0,00795	0,00795
Metasilicato de sódio 9-hidratado (9.88% Si)	1,45	1,45
Cromo Sulfato de Potássio 12-hidratado (10.42% Cr)	0,275	0,275
Ácido Bórico (17.5% B)	0,0815	0,0815
Fluoreto de Sódio (45.25% F)	0,0635	0,0635
Carbonato de Níquel (45% Ni)	0,0318	0,0318
Cloreto de Lítio (16.38% Li)	0,0174	0,0174
Vanadato de Amônia (43.55% V)	0,0066	0,0066
Sacarose	209,81	123,69
<b>Total</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>

<sup>1</sup> A proporção de NaCl foi dobrada visando aproximar a dieta brasileira (Portal do Ministério da Saúde, 2014),

<sup>2</sup> A proporção de ferro foi triplicada, com o objetivo de aumentar a disponibilidade de ferro para catálise das reações oxidativas.

<sup>3</sup> A proporção de selênio foi reduzida pela metade visando assim promover redução da atividade da enzima antioxidante glutathione peroxidase (GPx).

O mix de minerais e o óleo oxidado foram entregues a empresa PRAGSOLUÇÕES Biociências (Jau, SP-Brasil) que confeccionou as rações utilizadas no projeto.

O grupo **LOW** representou os animais que receberam a dieta hiperlipídica com baixo grau de oxidação, o grupo **MED** os animais que receberam a dieta hiperlipídica

com moderado grau de oxidação, o grupo **HIGH** os animais que receberam a dieta hiperlipídica com elevado grau de oxidação, e o grupo **CONT+** representou os animais que receberam a dieta hiperlipídica composta por óleo de linhaça de baixo grau de oxidação e submetidos à indução de diabetes tipo 1 através de injeção intraperitoneal de estreptozotocina (180mg/Kg) em dose única, sem necessidade de jejum (Deeds *et al.*, 2011; Chaudhry *et al.*, 2013; Mojibian *et al.*, 2013) no início do experimento.

No dia anterior à eutanásia os animais foram privados de ração por um período equivalente a 5 horas. Após esse período, os animais voltaram a ter acesso à alimentação por 4 horas no período noturno. Após esse ultimo período, a ração foi retirada 8 horas antes do início da eutanásia, com objetivo de reduzir as variações individuais nos biomarcadores.

No dia da eutanásia, os animais foram anestesiados com isoflurano (indução com fluxo de 3% e manutenção com fluxo de 2%). Amostras de sangue foram coletadas através de punção cardíaca com seringas estéreis e transferidas para tubos vacutainer (Becton Dickinson, NJ) contendo EDTA (1%). As amostras foram imediatamente centrifugadas (1,600 x g, 10min, 4°C), congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a – 80°C, até o momento das análises. Tendo em vista o baixo volume de sangue que é possível coletar desses animais, o plasma obtido foi utilizado somente para as análises de glicemia, lipoproteínas, ácidos graxos e MDA. Dessa forma, as demais análises foram realizadas em homogenato de fígado por ser o órgão responsável pela metabolização lipídica, cujo isolamento e preparo está descrito nas metodologias que se seguem.

## **6.4 Oxidação do óleo utilizado no preparo das dietas**

### **6.4.1 Análise de hidroperóxidos no óleo**

A concentração de hidroperóxidos foi determinada de acordo com Shantha e Decker (1994) com algumas modificações. Amostras de 300µL de óleo foram misturadas à solução de isoctano/isopropanol (3:1, v/v) resultando em um volume final de 1,80mL. Após a mistura com o uso do vortex, 200µL dessa solução foram transferidos para uma solução de metanol/1-butanol (2:1, v/v) resultando em um

volume final de 3,0mL. Uma solução de tiocianato/ferro foi preparada misturando 500µL de tiocianato de amônio (3,94 M) e 500µL de sulfato de ferro (0,072 M). Esta última foi obtida a partir da mistura de 1,5mL de sulfato de ferro (0,144 M) com 1,5mL de cloreto de bário (0,132 M) em ácido clorídrico (0,4 M). A solução de tiocianato/ferro (30µL) foi adicionada em cada solução de metanol/1-butanol (3,0mL), misturada e mantida em repouso, ao abrigo da luz, à temperatura ambiente por 20 min. Após este período, foi realizada a leitura da absorbância a 510nm, utilizando o leitor de microplaca Sinergy HT (Bio Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA). As concentrações de hidroperóxidos (meq/kg de óleo) foram determinadas a partir da obtenção prévia de uma curva padrão utilizando-se concentrações conhecidas (de 0,39 a 5,9 meq/kg) de hidroperóxido de cumeno.

#### **6.4.2 Determinação da concentração de malonaldeído por TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) no óleo.**

As concentrações de MDA foram determinadas como TBARS de acordo com a metodologia proposta por McDonald e Hultin (1987). Uma alíquota de 50µL de óleo foi diluída em 450µL de isoctano: isopropanol (3:1 v/v) e adicionada a 1mL de solução contendo 75g de TCA em 414mL de água MiliQ, 8,8mL de HCl, 1,88g de TBA e 15mL de BHT 2% diluído em etanol. As amostras foram mantidas em banho-maria a 95°C por 15min, resfriadas em água gelada por 10min e centrifugadas a 1000 x g por 15min. Após repouso de 10min, foi realizada a leitura da absorbância em 532nm utilizando-se do leitor de microplaca Sinergy HT, (Bio Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA). As concentrações de MDA (mg MDA/L óleo) foram determinadas a partir de obtenção de curva padrão, utilizando concentrações conhecidas (1,4 a 14,4mg MDA/L de solução) usando TEP (tetraetoxi-propano).

#### **6.4.3 Análise de Hexanal**

A concentração de hexanal das amostras foi determinada de acordo com García-Llatas *et al.* (2007) com algumas modificações. As amostras de óleo de linhaça em emulsão (990µL) preparada com 5g do óleo adicionada em 50mL de tampão fosfato + 0,66% de tween 20 e 50mL de água. As emulsões foram inseridas em vials de

20ml com tampa de polipropileno e septos de PTFE/Silicone (Supelco, Bellefonte, PA, EUA) hermeticamente seladas contendo 10 $\mu$ L de Padrão Interno (MBIK 4-metil-2-pentanona, 1 $\mu$ L MBIK/mL em metanol). Os vials foram agitados (1000 x g) durante 15min a 40°C. Após este período, a fibra pré-condicionada (2h/300°C) (Analítica / Cromatografia, Carboxen/ o polidimetilsiloxano, CAR/PDMS; fibras StableFlex; 85 m $\mu$ m; Supelco 57295-U, Bellefonte, PA) foi exposta ao “headspace” dos óleos por 45min sob agitação a 40°C. Em seguida, a fibra foi injetada no GC-MS a 250°C durante 5min, com split de 10:1. Durante a análise, a fibra foi termicamente dessorvida a 250°C durante 3min. Vials contendo apenas água foram inseridos após cada 5 amostras. A análise foi realizada num sistema GC Agilent 7890 equipado com um detector de massa (Palo Alto, CA). A fase estacionária era uma coluna MS ZB-5 capilar (5% polysilarylene/95% de polidimetilsiloxano, 30m x 0,32mm, 1mm de espessura de filme; Phenomenex<sup>®</sup>; Torrance, CA). O gás Hélio foi utilizado como arraste a um fluxo de 3mL/min. A temperatura foi programada para 40°C/5min, elevando-se a 100°C a 4°C/min e depois a 220°C por 10min a 17°C/min. mantendo-se em 220°C por 10min. Os íons foram identificados utilizando-se a biblioteca NIST. A quantificação baseou-se na razão de área de pico da área do composto sobre a área do padrão interno. A curva padrão foi preparada com 5 concentrações de hexanal (0,0-0,08mg/mL de emulsão fresca), mantendo-se a mesma quantidade de MIBK. Os resultados foram expressos como ng hexanal/mL de emulsão.

#### **6.4.4 Composição de ácidos graxos no óleo**

Os ácidos graxos presentes no óleo de linhaça foram determinados por cromatografia a gás, após esterificação descrita por Shirai, Suzuki e Wada (2005). Em uma amostra de óleo (1,5mg) adicionou-se 1mL de NaOH metanólico a 0,5N. A amostra foi homogeneizada e mantida em banho-maria por 5 min a 60°C. À amostra fria foram adicionados 2mL da mistura de esterificação BF<sub>3</sub>-metanol 14% (composta por cloreto de amônio, metanol e ácido sulfúrico), levemente agitada e levada ao banho-maria por mais 5min. Em seguida, à amostra fria foram adicionados 1mL de isooctano e agitado vigorosamente em seguida foi adicionado 5mL da solução saturada



de cloreto de sódio, agitando-se levemente para não emulsionar. A fração dos metil ésteres foi extraída na fase superior. Em seguida, a fase superior foi evaporada em atmosfera de nitrogênio e ressuspensa em 500µL de isooctano (grau HPLC) para a determinação dos ácidos graxos por cromatografia a gás. A composição de ácidos graxos foi determinada em um cromatógrafo a gás Agilent 7890, equipado com uma coluna DB23 60m. Foi utilizado o gás hélio como gás de arraste, com fluxo de 1mL/min. A programação de temperatura inicial da coluna foi de 80°C com acréscimo de 5°C/min., até atingir 175°C, em seguida houve um aumento na temperatura em gradiente de 3°C/min. até atingir a temperatura de 230°C permanecendo nesta temperatura por 5min. Quatro misturas de ácidos graxos foram utilizados como padrão (Sigma Chemical Co.: 4-7801; 47085-U; 49453-U e 47885-U) para identificar os picos. Os resultados foram expressos como quantidade do total de ácidos graxos presentes na amostra (g de ácido graxo/100g óleo).

## **6.5 Análises da Ração**

### **6.5.1 Composição química das rações**

A composição química da dieta fornecida aos camundongos foi determinada de acordo com os métodos descritos pela AOAC (2005). Foram realizadas as análises de umidade, cinzas, lipídios e proteínas. Carboidratos foram obtidos por diferença.

### **6.5.2 Extração do óleo da ração**

A fração lipídica das rações foi obtida segundo a metodologia proposta por Bligh e Dyer (1959). A ração foi pesada, moída e homogeneizada, sendo em seguida adicionada água na proporção de 0,8µL de água: 1mg de ração, clorofórmio na proporção de 1µL de clorofórmio: 1mg de ração e etanol na proporção de 2µL: 1mg de ração. Essa mistura foi agitada 30seg e em seguida foi adicionado clorofórmio na proporção de 1µL :1mg de ração e solução salina 0,88% na mesma proporção. A

amostra foi então centrifugada a 13.000 x g por 2min. A parte inferior contendo clorofórmio foi seca em nitrogênio gasoso até a obtenção da fração lipídica.

### **6.5.3 Efeito da peletização na oxidação do óleo presente nas rações.**

O efeito da peletização das rações na estabilidade do óleo foi avaliado através dos marcadores anteriormente descritos: Hidroperóxidos (item 6.4.1), e TBARS (item 6.4.2) no óleo extraído das rações.

## **6.6 Avaliação dos parâmetros relativos ao ensaio biológico.**

### **6.6.1 Determinação do ganho de peso e consumo de ração pelos animais**

O ganho de peso e o consumo de ração pelos animais foram analisados a cada 2 dias durante 90 dias, aferindo os valores de peso dos animais e a diferença de peso das rações em balança semi-analítica (Marte Científica, Santa Rita do Sapucaí, MG, Brasil)

### **6.6.2 Determinação dos Biomarcadores de Estresse Oxidativo**

### **6.6.3 Atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD).**

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Ewing and Janero (1995). A reação é baseada em uma reação aeróbia entre NADH e o PMS, que gera ânion superóxido radical sob pH não ácido. O azul de nitro tetrazólio (NBT) foi utilizado como detector para avaliar dismutação do ânion superóxido através da redução do produto. Amostras de homogenato de fígado no volume de 25µL, na concentração de 0,024µg de proteína/µL foram adicionadas aos poços da placa contendo 200µL de meio de reação

preparado com 500 $\mu$ L de NBT, 730 $\mu$ L de NADH e 8,77mL de fosfato de potássio 0,1M pH 7,4 com EDTA 1mM sendo em seguida adicionados 25 $\mu$ L de PMS. A leitura foi realizada a cada 60seg a 560nm. A análise foi realizada a 26°C e os resultados expressos em Unidade de atividade (UA) por mg de proteína a partir de curva padrão utilizando concentrações conhecidas de SOD (Sigma, Cod.S8160) (0,69 a 22,15U SOD/mg proteína),

#### **6.6.4 Atividade enzimática da Catalase.**

A atividade da enzima catalase foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Bonaventura et al. (1972). Visto que a função da Catalase é decompor o peróxido de hidrogênio, a metodologia empregada baseia-se no monitoramento do decréscimo do peróxido de hidrogênio por meio da leitura da absorbância a 240nm. Amostras de homogenato de fígado no volume de 20 $\mu$ L, na concentração de 0,05 $\mu$ g de proteína/ $\mu$ L, foram adicionadas aos poços da placa contendo 140 $\mu$ L do tampão fosfato de potássio 50mM pH 7,4 com 10% EDTA e 40 $\mu$ L da solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30mM. A leitura foi realizada cada 45seg a 240nm durante 8min a 30°C. Os resultados foram expressos em Unidade de atividade (UA) por mg de proteína a partir de curva padrão utilizando concentrações conhecidas de Catalase (Sigma Cod. C9322).

#### **6.6.5 Atividade enzimática da Glutathione Peroxidase (GPx).**

A atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx) foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Flohe e Gunzler (1984). Amostras de homogenato no volume de 30 $\mu$ L, na concentração de 2 $\mu$ g de proteína/ $\mu$ L foram adicionadas aos poços da placa contendo 125 $\mu$ L do tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,4 com EDTA 1mM, 5 $\mu$ L de solução GSH e 5,0 $\mu$ L de GR. A placa foi incubada a 37°C por 5min, sendo em seguida adicionados 5 $\mu$ L de solução de terc-butil hidroperóxido 0,46% e 30 $\mu$ L de solução de NADPH 1,2mM. A leitura foi monitorada durante 4min a 340nm a 37°C. Os resultados foram expressos em unidade de atividade (UA) por mg de

proteína a partir de curva padrão utilizando concentrações conhecidas de GPx (Sigma Cod. G6137) (1,5 a 50U de GPx/mg proteína).

#### **6.6.6 Atividade Enzimática da Glutathiona Redutase (GR)**

A atividade da enzima glutathiona redutase foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Torres *et al.* (2011). Amostras de homogenato de fígado no volume de 20µL, na concentração de 4µg de proteína/µL foram adicionadas aos poços da placa de 96 poços contendo 180µL de meio de reação (2mL de PBS 0,1M/L com 1mM/L de EDTA adicionado em 1,5mL de água milli-Q, 10mg de glutathiona dissulfeto e 2mg de NADPH). A leitura foi monitorada durante 26min a 340nm a 37°C. Os resultados foram expressos em unidade de atividade (UA) por mg de proteína a partir de curva padrão utilizando concentrações conhecidas de GR (Sigma, Cod. G3664) (0,003 a 0,25U de GR/mL).

A leitura da atividade das enzimas SOD, catalase, GPx e GR foi realizada em leitor de microplaca Sinergy HT (Bio Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) como proposto por cada método.

#### **6.6.7 Glicemia e Lipoproteínas**

Concentrações de triacilgliceróis, colesterol total (CT), HDL, LDL e glicose foram determinadas no Laboratório Ciência dos Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Métodos colorimétricos enzimáticos da Labtest Diagnostica SA (Lagoa Santa, MG) foram usados para a determinação do colesterol total sérico (Colesterol Liquiform, cat. 76, Enzimático-Trinder), fração HDL (Colesterol HDL, cat. 13, pela precipitação com ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio), triglicerídeos sérico (Triglicérides Liquiform, cat. 87, Enzimático-Trinder), fração LDL (LDL Liquiform, cat. 111, Colorimétrica por surfactante seletivo). O valor das leituras foi determinado em espectrofotômetro da Micronal B-380 (São Paulo). As concentrações de VLDL foram estimadas a partir da fórmula de  $VLDL = CT - HDL - LDL$ . Para a determinação da glicemia em jejum dos animais, também foi utilizado o método colorimétrico da Labtest Diagnostica AS. (Glicose Liquiform, cat.133, Enzimático-Trinder).

### 6.6.8 Esteatose Hepática

Amostras de fígado foram fixadas em formol a 10% durante 24h, sendo em seguida embebidas em parafina. As amostras foram cortadas em seções de 5µm e coradas com hematoxilina e eosina (HE) para a avaliação de esteatose e inflamação.

Esteatose, balonismo hepatocelular e inflamação lobular foram determinados histopatologicamente e classificados conforme Kleiner *et al.* (2005). O grau de esteatose foi classificado utilizando-se a escala de quatro pontos: grau 0, esteatose envolvendo < 5% dos hepatócitos; grau 1, esteatose envolvendo até 33% dos hepatócitos; grau 2, esteatose envolvendo 33-66% dos hepatócitos; e grau 3, esteatose envolvendo > 66% dos hepatócitos. Inflamação lobular também foi classificada em uma escala de quatro pontos: grau 0, sem focos; grau 1, menos de dois focos por X 20 campos; grau 2, 2-4 focos por X 20 campos; e grau 3, mais do que quatro focos por X 20 campos. Balonismo hepatocelular foi classificado em uma escala de três pontos: 0, nenhuma; 1, algumas células balonizadas ; e 2, as células balonizadas de destaque. Para o escore de atividade DHGNA (NAS), características de esteatose, inflamação lobular e balonismo hepatocelular foram combinados, e intervalos de valores de 0 a 8 foram adotados. Casos com escore  $\geq 5.0$  foram considerados NASH, enquanto os casos com valores  $\leq 2$  foram diagnosticados como esteatose simples.

### 6.6.9 Análise de Malonaldeído Hepático

A concentração de malondialdeído (MDA) no homogenato de fígado foi determinada por meio de separação pela cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), como descrito previamente por Hong *et al.* (2000), com modificações. Esta metodologia consistiu na derivatização do MDA com o ácido tiobarbitúrico, no qual um mol de MDA reage com dois mols de TBA, em meio ácido, formando um aduto (TBA-MDA). A quantidade de 50µL de homogenato diluído 1:5 em tampão fosfato foram adicionados 12,5µL de BHT 0,2% em etanol e 6,25µL de NaOH 10N em microtubo de 1,5mL. As amostras foram então mantidas em banho-maria a 60°C por 30min, em seguida foram adicionados 750µL de TCA 7,2% contendo 1% de KI. As amostras foram então resfriadas em gelo por 10min. Após esse período as amostras foram

centrifugadas a 20000 x g a 4°C por 10 min. 500µL de sobrenadante foram transferidos para microtubos de 2mL sendo adicionados 250µL de TBA 0,6%. As amostras foram mantidas em banho-maria por 30min a 95°C, resfriadas, sendo então adicionados 750µL de butanol. As amostras foram homogeneizadas no vortex por 15seg, e em seguida centrifugadas a 20000 x g por 10min a 4°C. 650µL do sobrenadante foram filtrados com membrana de 13mm (Millex, Millipore Corp., Billerica, MA, USA ). A análise cromatográfica foi realizada em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Agilent Technologies 1200 series - Santa Clara USA) conectado a um computador. O conjugado MDA-TBA (20µL) foi injetado em uma coluna analítica de fase reversa Phenomenex C18 (250 mm x 4.6 mm; cinco mm – Phenomenex, Torrance, USA) com pré-coluna LC8-D8 (Phenomenex AJ0-1287 – Torrance, USA) e quantificado fluoremetricamente a uma excitação de 515nm e emissão de 543nm. O fluxo foi de 1mL/min com fase móvel constituída de 60% tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7.4 e 40 % metanol. Uma curva de calibração utilizando TEP (tetraetoxi-propano) nas concentrações 0,5 a 20µM foi preparada. Água milli-Q (branco) e um controle externo constituído pelo TEP, na concentração de 5µM foram injetados em intervalos regulares. Os resultados foram expressos como µM de MDA/mg de proteína.

#### **6.6.10 Estudo Esterológico da Aorta**

As análises estereológicas foram realizadas no Laboratório de Estereologia Estocástica e Anatomia Química (LSSCA), localizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Os parâmetros estereológicos descritos a seguir foram estimados com o auxílio do software estereológico *newCAST™ by Visiopharm* (Versão 4.6.3.857). Subsequentemente à remoção dos corações, as aortas ascendentes foram isoladas com uma secção na altura do seio aórtico e outra no início do arco aórtico. Cada aorta ascendente foi então pesada e medida no seu comprimento, com um paquímetro digital. Após medidas, foram colocadas em sacarose (7%) overnight e então congeladas e seccionadas em criostato Leica com uma espessura de 10µm.

A amostragem da aorta foi baseada no princípio do “smooth fractionator” (Gundersen, 2002) e em seguida, selecionados fracionalmente por meio de

amostragem sistemática e uniformemente aleatória “*Systematic Uniform Random Sampling*” (SURS) (Gundersen et al., 1999). As secções destinadas para a estimativa do volume da aorta (10 secções) foram colocadas em lâminas com aderência eletrostática e coradas com solução de orceína (Merck), em seguida foram desidratadas em séries crescentes de etanóis, diafanizadas em xilóis e montadas sob lamínula com DPX (Fluka).

O “Princípio de Cavalieri” foi utilizado para se estimar o volume dos compartimentos da aorta (lúmen ( $\hat{V}_L$ ) e parede ( $\hat{V}_P$ ) (Mayhew e Olsen, 1991; Van vre et al., 2007; Howard e Reed, 2010; Jordão et al., 2011) utilizando a seguinte fórmula:

$$\hat{V}_L \text{ ou } \hat{V}_P := \sum p \times a(p) \times \bar{t}$$

Onde:

$\sum p$  = somatória de pontos que tocam o lúmen ou a parede;  $\bar{t}$  = espessura média das secções do VE;  $a(p)$  = área associada a cada ponto.

O volume da aorta ( $V_A$ ) foi obtido utilizando a fórmula:

$$\hat{V}_A := \hat{V}_L + \hat{V}_P$$

Onde:

$\hat{V}_L$  = Volume do lúmen;  $\hat{V}_P$  = Volume da parede

O coeficiente de erro (CE) para a estimativa do volume da aorta pelo Princípio de Cavalieri CE ( $V_{VE}$ ) foi estimado de acordo com as seguintes equações (Gundersen et al. 1999).

✓ **Variância “noise” da contagem de pontos:**

$$\text{Var} [\text{noise}] := c. (b/v_a).(\sqrt{n}. \Sigma P),$$

Onde:

$c$  é uma constante ( $c = 0,0724$ ) ;  $b/v_a$  expressa a forma ou complexidade dos perfis analisados;  $n$  é o número de secções utilizadas;  $\Sigma P$  é o número total de pontos utilizados para estimar a área das secções

✓ **Variação devido à amostragem sistematicamente aleatória ( $\text{Var}_{(\text{surs})}$ ):**

$$\text{Var}_{(\text{surs})} := (3(A - \text{Var}_{(\text{noise})}) - 4B+C)/240$$

✓ **Variação total e precisão ( $\text{Var}[\text{total}]$ ):**

$$\text{Var}[\text{total}] := (\text{Var}_{(\text{noise})} + \text{Var}_{(\text{surs})})/(\sum P)^2$$

CE := Var[total]

Sendo assim, os coeficientes de erro para o método aplicado foram de 0,033 para o grupo CONT+; 0,040 para o grupo LOW; 0,032 para o grupo MED e de 0,028 para o grupo HIGH.

#### 6.6.11 Perfil Lipídico plasmático e hepático

As amostras de plasma ou homogenato de fígado foram derivatizadas utilizando a técnica de esterificação direta descrita por Shirai, Suzuki e Wada (2005), sendo a composição determinada por cromatografia gasosa GC (Agilent 7890 um sistema de GC, a Agilent Technologies Inc., Santa Clara, EUA). Para esterificação, foram utilizados 100µL de plasma ou 50µL do homogenato. Em seguida, foram adicionados 1mL de NaOH metanólico a 0,5M. As amostras foram homogeneizadas e mantidas em banho-maria por 5 min. À amostra fria foram adicionados 2mL da mistura de esterificação BF3-metanol 14% (composta por cloreto de amônio, metanol e ácido sulfúrico), agitada e levada ao banho-maria por mais 5 min. Em seguida, à amostra fria foi adicionado 1mL de isooctano, sendo homogeneizado vigorosamente. Foram adicionados 5mL da solução saturada de cloreto de sódio sendo o tubo agitado levemente para não emulsionar. A fração dos metil ésteres foi extraída na fração de isooctano (grau HPLC). Em seguida, a fase superior foi evaporada em atmosfera de nitrogênio e a amostra ressuspêndida em 500µL de isooctano para determinação dos ácidos graxos por cromatografia gasosa. A coluna capilar de sílica fundida (J & W DB-23 Agilent 122-236; diâmetro interno 60m x 250 mm) foi utilizada para a injeção. Gás hélio ultra puro foi utilizado como veículo a um fluxo de 1ml/min. com uma injeção com divisão de 50:1. A programação de aquecimento da coluna foi: inicia-se a 80°C, com velocidade de aquecimento de 5°C/min. até 175°C, seguido por outro gradiente de 3°C/min. até 230°C, e mantida a esta temperatura durante 5 min. A temperatura do injetor e do detector (FID) foram 250°C e 280°C, respectivamente. Os ácidos graxos foram identificados utilizando-se quatro misturas de padrão purificado de ésteres metílicos de ácidos graxos (Sigma Chemical Co.: 4-7801; 47085-U; 49453-U e U-47885).



Os resultados foram expressos como mg ácidos graxo/mL de plasma; mg de ácidos graxos/g de tecido para as amostras de plasma e tecido hepático respectivamente.

## **6.7 Análise estatística**

Os resultados relativos aos ensaios químicos e biológicos tiveram inicialmente a normalidade e heterogeneidade de variâncias avaliadas. A seguir as amostras de óleo nos três diferentes níveis de oxidação, assim como os resultados relativos aos biomarcadores avaliados nos quatro grupos experimentais, foram comparados através de ANOVA, seguido de teste de Tukey para identificação dos contrastes. Quando necessário, dados foram transformados ou teste equivalente não paramétrico foi utilizado na análise. Um valor alfa de 5% foi adotado para rejeição da hipótese de nulidade. O software Statistica versão 9.0 (Statsoft Inc., Tulsa,OK) foi utilizado para a realização dos cálculos e elaboração dos gráficos.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Caracterização do óleo de linhaça usado na formulação das rações

A **Tabela 3** apresenta a proporção de ácidos graxos observada no óleo de linhaça utilizado neste estudo, em comparação aos óleos de soja e de milho.

**Tabela 3:** Proporção dos principais ácidos graxos (g/100g) observada no óleo de linhaça.

Ácidos Graxos <sup>1</sup>	Linhaça	Soja <sup>2</sup>	Milho <sup>2</sup>
C6:0	0,01 ± 0,00	-	-
C8:0	0,01 ± 0,00	-	-
C10:0	0,01 ± 0,00	-	-
C14:0	0,07 ± 0,03	-	-
C15:0	0,02 ± 0,00	-	-
C16:0	6,26 ± 0,37	10,45	10,58
C16:1	0,05 ± 0,01	-	0,11
C16:2	0,21 ± 0,04	-	-
C17:0	-	0,034	0,067
C17:1	0,07 ± 0,01	-	-
C18:0	4,27 ± 0,18	4,43	1,85
C18:1 n9 t	0,01 ± 0,00	-	-
C18:1 n9 c	24,56 ± 0,00	22,55	27,33
C18:2 n6 t	0,04 ± 0,00	-	-
C18:2 n6 c	19,28 ± 0,29	50,95	53,51
C18:3 n3	44,44 ± 0,35	6,79	1,16
C20:0	0,19 ± 0,00	0,36	0,43
C20:1 n9	0,17 ± 0,00	0,23	0,13
C20:3 n3	0,21 ± 0,01	-	-
C22:0	-	0,37	-
C24:0	0,11 ± 0,00	-	-
Total	100,00	96,17	95,21
SAFA	10,96 ± 0,58	15,65	12,95
MUFA	24,87 ± 0,03	22,78	27,58
PUFA	64,17 ± 0,61	57,74	54,68
IP <sup>3</sup>	172,59	122,27	110,50

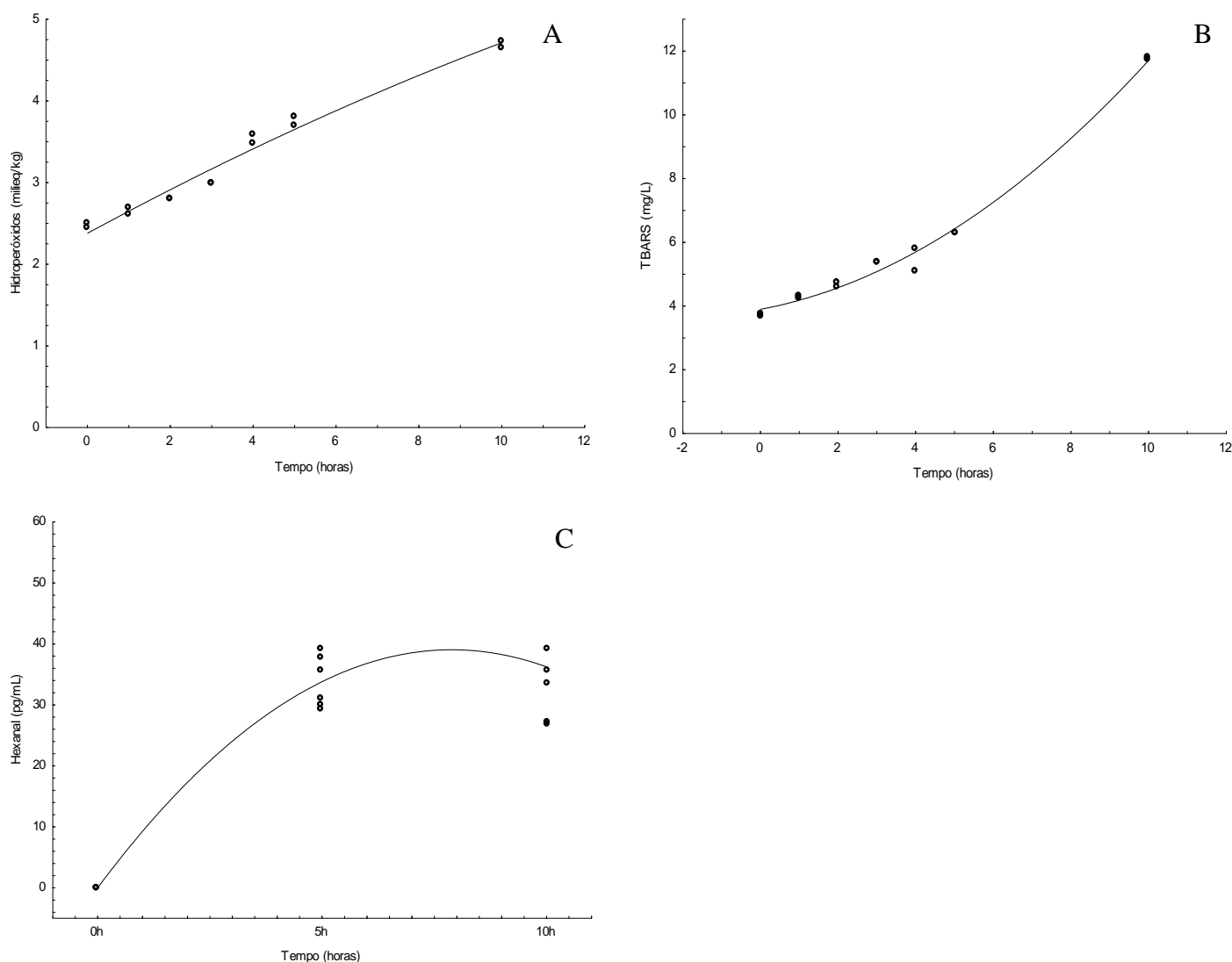
<sup>1</sup>Valores são expressos como média ± DP.

<sup>2</sup>Valores obtidos da tabela de composição de alimentos (USDA, 2004 ).

<sup>3</sup>Índice de peroxidabilidade (IP) = (% dienóico x 1 ) + (% trienoico x 2) (Hsu, Lee e Chen, 2001).

## 7.2 Oxidação acelerada e avaliação da estabilidade do óleo de linhaça em diferentes condições de armazenamento.

Uma vez estabelecido que o óleo de linhaça fresco corresponderia ao nível baixo de oxidação, o mesmo foi submetido a um tratamento térmico visando oxidá-lo a um nível intermediário e outro mais elevado, configurando tais níveis através de marcadores químicos. A **Figura 7** apresenta a concentração de hidroperóxidos (LOOH), TBARS e hexanal encontrada na amostra de óleo de linhaça submetido à oxidação acelerada em banho-maria (100°C) por um período de 10 horas.



**Figura 7:** Concentração de hidroperóxidos (Fig.7A), TBARS (Fig.7B) e hexanal (Fig. 7C) encontrada na amostra de óleo de linhaça submetido à oxidação acelerada em banho-maria (100°C).

Observa-se que em relação às concentrações de LOOH e TBARS, ocorreu um aumento progressivo dos valores com o aumento da temperatura durante as 10 horas de aquecimento. No caso do hexanal, esse aumento ocorreu nas primeiras 5 horas, mantendo-se constante após esse período.

Assim, com base nos marcadores de oxidação lipídica (LOOH, TBARS e hexanal), foram definidos os três níveis de oxidação (baixo, moderado e elevado) a serem avaliados no modelo animal (**Tabela 4**).

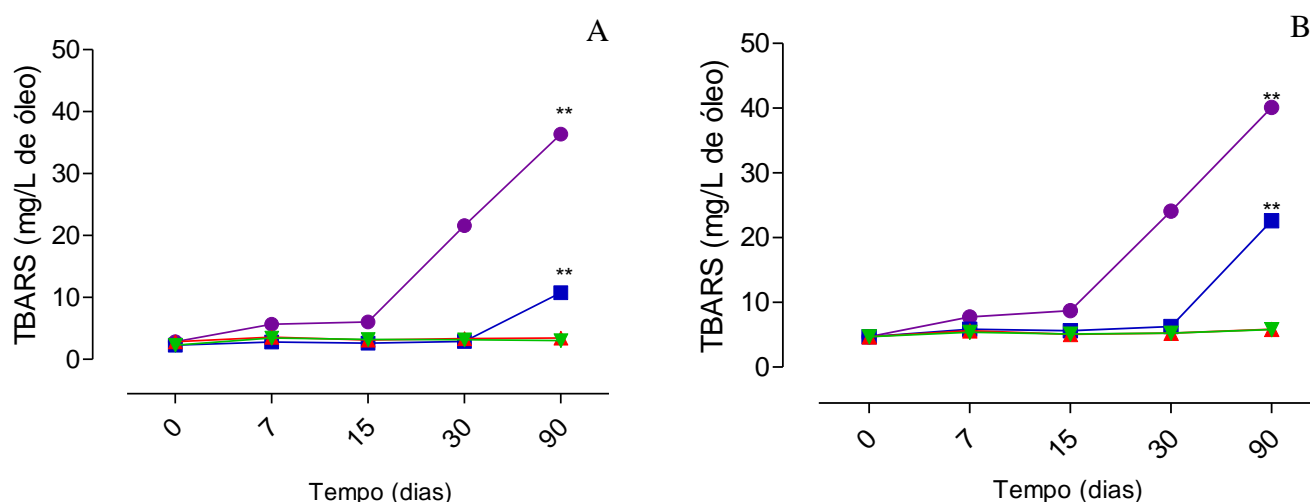
**Tabela 4:** Níveis de oxidação do óleo de linhaça selecionados para compor as rações.

Nível de oxidação	Tempo (h)	LOOH (meq/kg)	TBARS (mg/L)	Hexanal (pg/mL)
Baixo	0	2,47 ± 0,02**a	3,72 ± 0,04**a	ND
Moderado	5	3,75 ± 0,04**b	5,45 ± 0,37**b	33, 81 ± 1.76
Elevado	10	4,69 ± 0,04**c	11,74 ± 0,04**c	36,24 ± 4.21

*Valores são expressos como média ± DP; \*\*P<0,01. Valores seguidos mesma letra não diferem significativamente.*

*ND, não detectado na amostra.*

Uma vez estabelecidos os três níveis, seria preciso mantê-los sem alteração na ração durante o período experimental referente ao ensaio biológico (90 dias). Portanto, uma avaliação preliminar de estabilidade foi realizada adicionando-se TBHQ nos óleos oxidados nos níveis baixo e moderado, mantidos sob refrigeração (4°C) comparados com as mesmas amostras mantidas em estufa (57°C). Os resultados (**Figura 8**) demonstraram que a adição de TBHQ e a manutenção dos óleos sob refrigeração seriam suficientes para inibir alterações nos níveis prévios de oxidação das amostras.

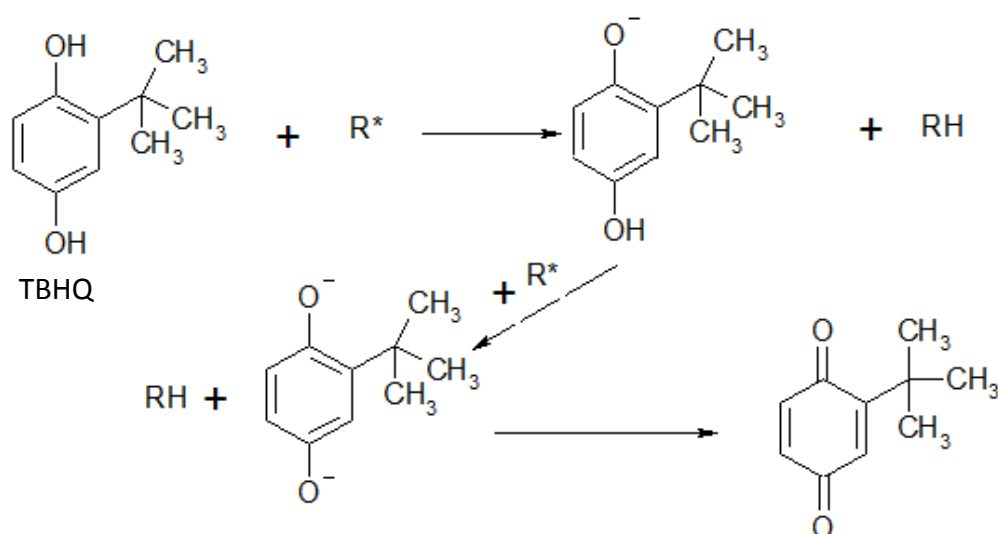


**Figura 8:** Concentração de TBARS observadas em amostras de óleo de linhaça com nível baixo de oxidação (Fig. 8A) e nível moderado de oxidação (Fig. 8B), mantidas sob refrigeração (4°C) e em estufa (57°C). Valores são expressos como média  $\pm$  DP; \*\* $P < 0,01$ . —●— 0 ppm de TBHQ a 57°C; —■— 200 ppm de TBHQ a 57°C; —▲— 0 ppm de TBHQ a 4°C; —▼— 200 ppm de TBHQ a 4°C.

Nesta etapa duas estratégias foram avaliadas visando inibir a oxidação dos óleos pré-oxidados na etapa anterior: redução da temperatura e/ou adição de um antioxidante (TBHQ). Em função da elevada susceptibilidade à oxidação apresentada pelo óleo de linhaça e da maior presença de hidroperóxidos decorrente da prévia exposição do óleo à temperatura, poderia supor-se que mesmo sob refrigeração, o processo oxidativo não seria totalmente inibido (Gray, 1978; Botsoglou *et al.*, 2003). Assim, além da redução de temperatura, a adição de um antioxidante seria recomendável. Neste estudo optou-se pelo TBHQ. O terc-butilhidroquinona (TBHQ) é um composto orgânico aromático derivado da hidroquinona, muito utilizado principalmente em óleos vegetais, com limite máximo de 200 mg/Kg (CODEX Alimentarius, 1995).

Foi possível observar que o TBHQ atuou de forma eficiente nas amostras com baixa e moderada oxidação até os 30 dias de armazenamento a 57°C (**Figura 8**), enquanto que um rápido aumento ocorreu após esse período. A energia de dissociação (BDE) envolvida na ligação do hidrogênio com o anel aromático do TBHQ é menor que aquela envolvida na ruptura da ligação  $\pi$  das duplas ligações na cadeia do ácido graxo (Frankel, 2005). Sendo assim o TBHQ age como antioxidante, doando o

hidrogênio para os radicais presentes no meio, preservando assim os ácidos graxos insaturados, e conseqüentemente evitando a formação de malonaldeído (**Figura 9**).

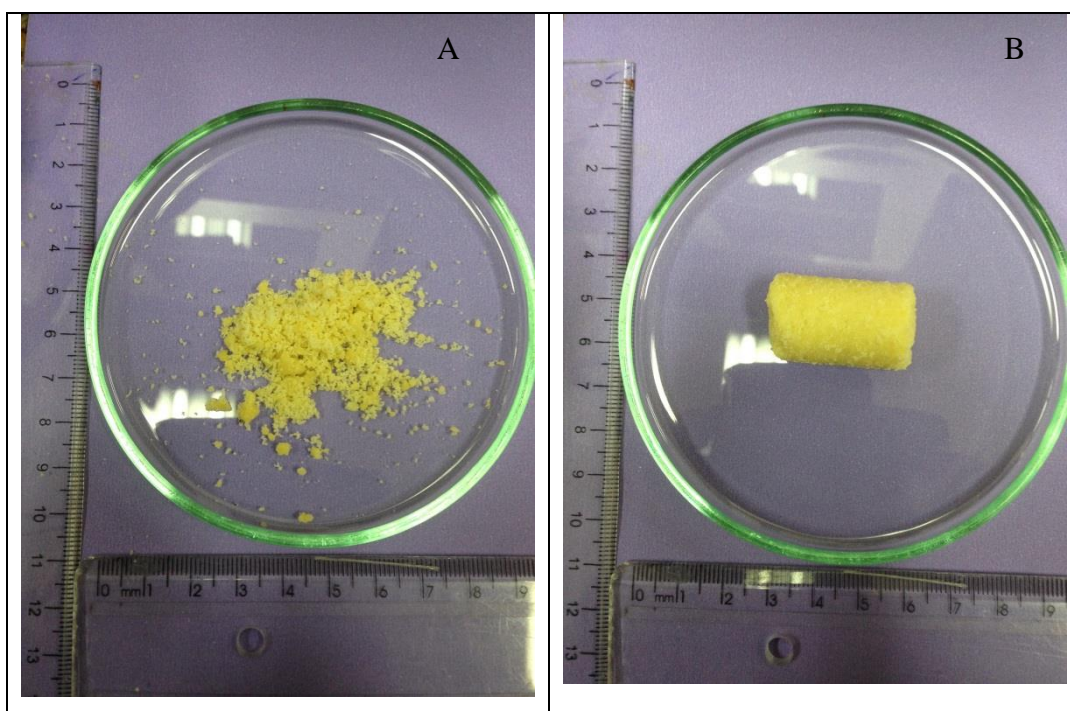


**Figura 9:** Reação do TBHQ com espécies reativas ( $R^\bullet$ ) com formação de compostos estáveis por ressonância. Adaptado de Coultate e Tom (2002).

Entretanto, a ação antioxidante mantém-se enquanto houver moléculas de TBHQ na forma reduzida, disponíveis no meio para reagirem com as espécies reativas. Pode-se sugerir que após 30 dias a  $57^\circ\text{C}$ , essa concentração tenha sido reduzida, induzindo assim a um aumento exponencial nos valores de TBARS a partir do 30º dia. Por outro lado, observou-se que a redução da temperatura foi suficiente para inibir a oxidação dos óleos, com ou sem antioxidantes. Desta forma, optou-se em manter os óleos sob refrigeração e com TBHQ após a indução da oxidação prévia nos três níveis selecionados.

### 7.3 Efeito da peletização da ração na estabilidade do óleo de linhaça.

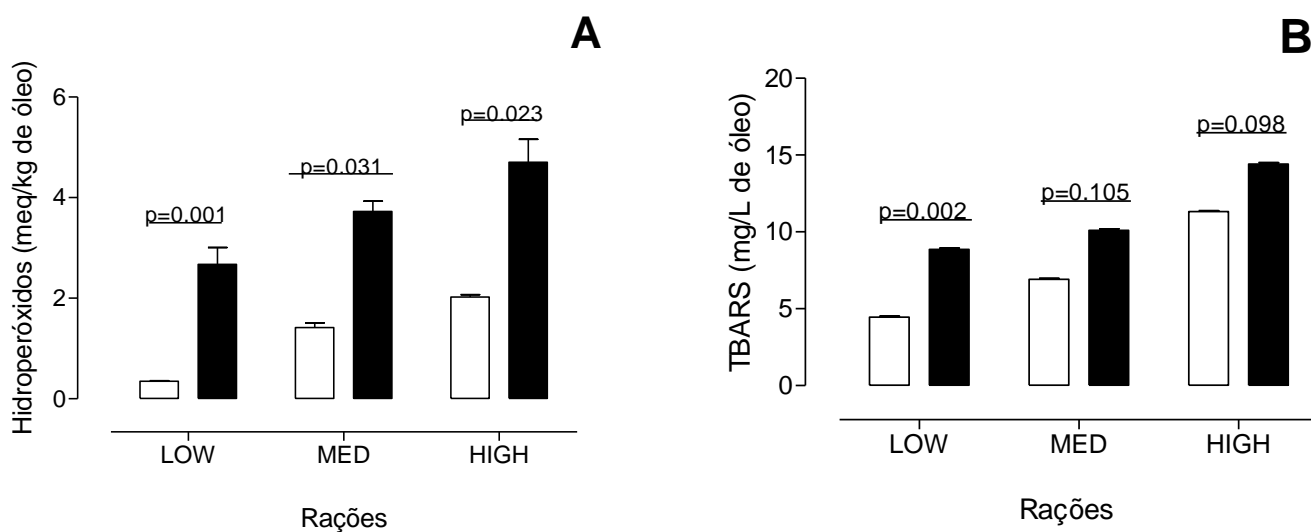
Embora os camundongos sejam capazes de ingerir a ração na forma em pó, a quantificação do consumo e a própria limpeza das caixas podem ficar comprometidas com essa forma de apresentação. Por essa razão, é comum submeter-se a formulação em pó ao processo de peletização, facilitando assim o acesso dos animais à dieta e a quantificação do consumo. A **Figura 10** apresenta as rações em pó e peletizadas.



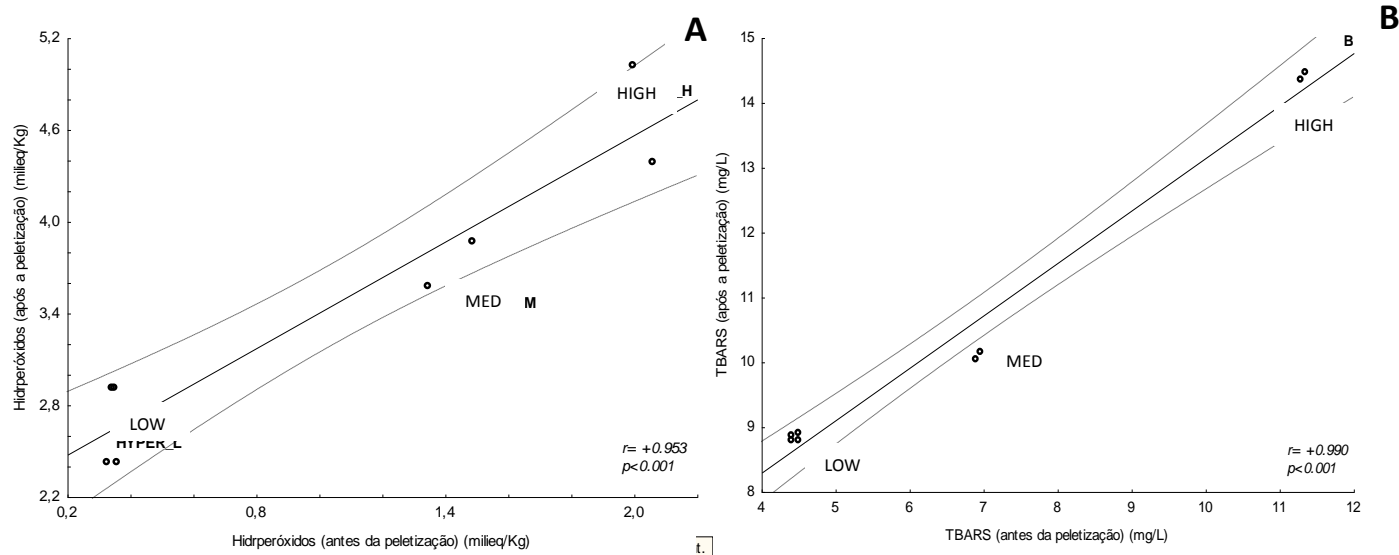
**Figura 10:** Ração MED em pó (Fig. 10A) e Ração MED peletizada (Fig. 10B).

O processo de peletização consiste na passagem da formulação em pó através de uma extrusora onde o produto fica em geral exposto a uma temperatura de 85 a 95°C por cerca de 15min sob pressão de vapor de 1,0 a 1,5 bar. Nesse processamento, a temperatura poderia alterar os níveis previamente definidos de oxidação estabelecidos para o ensaio biológico. Portanto, uma nova avaliação da estabilidade oxidativa foi realizada, comparando-se os marcadores LOOH e TBARS dos óleos já adicionados às rações, antes e depois da peletização. Os resultados (**Figura 11**) demonstraram que a peletização alterou a concentração dos marcadores ( $p < 0.05$ ),

porém essa alteração foi proporcional, mantendo assim a diferença entre os três níveis (Figura 12).



**Figura 11:** Concentração de hidroperóxidos (Fig.11A) e TBARS (Fig.11B) observadas nas rações formuladas com óleo de linhaça com nível baixo (LOW), moderado (MED) e elevado (HIGH) de oxidação. Valores são expressos como média  $\pm$  DP; \* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$ . ). □ Antes da peletização; ■ Após a peletização.



**Figura 12:** Correlação entre a concentração de hidroperóxidos (Fig.12A) e TBARS (Fig.12B) observadas nas rações, antes e após a peletização. Valores são expressos como média  $\pm$  DP).



## 7.4 Composição química das rações.

A **Tabela 5** apresenta a composição química em macronutrientes das 4 dietas avaliadas neste estudo.

**Tabela 5:** Composição química centesimal (g/100g) das dietas oferecidas aos 4 grupos experimentais.

Rações <sup>2</sup>	Nutrientes <sup>1</sup>					
	Umidade	Cinzas	Lipídios	Proteínas	Carboidratos	Energia <sup>3</sup>
<b>LOW</b>	6,5 ± 0,1	3,4 ± 0,1	30,3 ± 0,2	16,8 ± 0,3	42,9 ± 0,6	514,8 ± 0,4
<b>MED</b>	6,5 ± 0,2	3,4 ± 0,1	30,9 ± 0,2	16,8 ± 0,1	42,5 ± 0,2	514,9 ± 1,8
<b>HIGH</b>	6,7 ± 0,0	3,2 ± 0,0	30,9 ± 0,4	16,6 ± 0,0	42,6 ± 0,5	514,7 ± 2,0
<b>CONT+</b>	6,7 ± 0,1	3,2 ± 0,0	30,9 ± 0,3	16,5 ± 0,1	42,7 ± 0,4	514,6 ± 1,0

<sup>1</sup> Valores são expressos como média ± EPM;

<sup>2</sup> Rações: LOW, MED, HIGH e CONT+

<sup>3</sup> Energia em kcal/100g.

No ensaio biológico os 4 grupos receberam a dieta Hiperlipídica Compensada, sendo que para os grupos CONT+ e LOW a fração lipídica foi composta pelo óleo de linhaça com baixo nível de oxidação, para o grupo MED a fração lipídica foi composta pelo óleo de linhaça com moderado nível de oxidação e para o grupo HIGH a fração lipídica foi composta pelo óleo de linhaça com nível elevado de oxidação. Portanto, como esperado, as dietas não diferiram em nenhum dos macronutrientes avaliados.

## 7.5 Perfil de ácidos graxos das rações

Como os lipídios foram submetidos ao aquecimento, analisou-se o perfil de ácidos graxos da ração fornecida aos animais durante o estudo. O resultado encontra-se na **Tabela 6**.

**Tabela 6:** Composição de ácidos graxos de cada uma das rações (g de ácidos graxos/100g de óleo)

Ácidos Graxos <sup>1</sup>	LOW/CONT+	MED	HIGH
C14:0	0,50 ± 0,02	0,50 ± 0,03	0,48 ± 0,04
C16:0	18,73 ± 0,01	18,46 ± 0,33	17,36 ± 1,54
C16:1	0,60 ± 0,04	0,60 ± 0,03	0,57 ± 0,04
C18:0	11,74 ± 0,18	11,53 ± 0,16	10,74 ± 1,09
C18:1 n9 c	24,79 ± 0,05	25,63 ± 0,25	25,03 ± 0,22
C18:1 n9 t	1,21 ± 0,12	1,14 ± 0,03	1,08 ± 0,02
C18:2 n6 c	13,22 ± 0,06	14,87 ± 0,11	14,42 ± 0,26
C18:3 n3	30,04 ± 0,28 <sup>a</sup>	28,10 ± 0,20 <sup>b</sup>	27,62 ± 0,20 <sup>c</sup>
Total	100	100	100
SAFA	30,97 ± 0,20	30,49 ± 0,45	28,58 ± 2,66
MUFA	26,61 ± 0,15	27,37 ± 0,25	26,68 ± 0,26
PUFA	43,26 ± 0,27 <sup>a</sup>	42,97 ± 0,30 <sup>b</sup>	42,04 ± 0,39 <sup>c</sup>

<sup>1</sup>Valores são expressos como média ± DP. Valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

Observou-se uma redução significativa na quantidade de ácidos graxos poli-insaturados entre os três grupos, devido a uma redução na quantidade do ácido alfa-linolênico (ALA, C18:3 n3). Por ser o ácido graxo com maior numero de insaturações dentre os que compõem a ração, pode-se dizer que durante processo de oxidação térmica realizado para a produção dos três níveis de oxidação, o ALA foi degradado em maior quantidade, sendo, portanto responsável pela produção dos principais produtos da oxidação analisados.

## 7.6 Consumo calórico e ganho de peso dos animais.

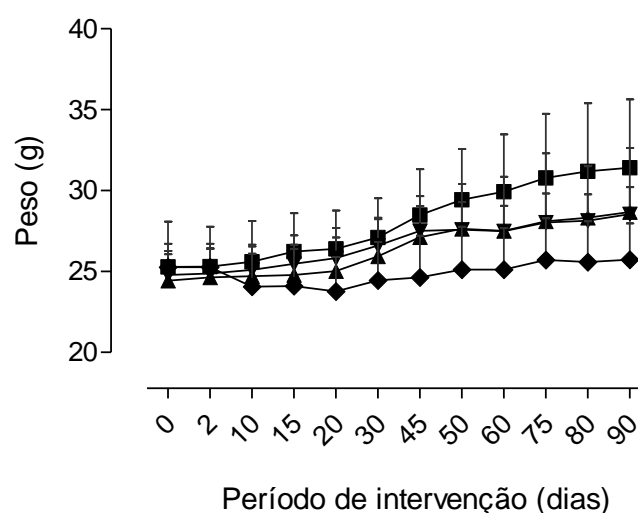
A **Tabela 7** apresenta o consumo de ração e o aporte calórico diário dos animais. Não foi observada diferença no consumo de ração entre os grupos ( $p = 1,000$ ) . Em termos de aporte calórico, também não foi observada diferença entre os grupos ( $p = 0,829$ ) após o período experimental.

**Tabela 7:** Consumo de ração e o aporte calórico diário dos animais.

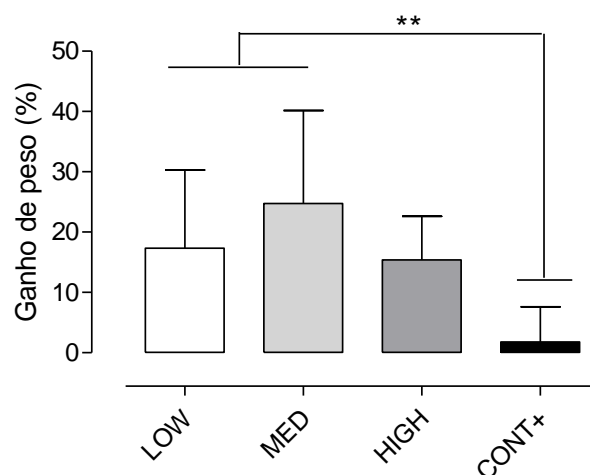
GRUPOS <sup>1</sup>	Ração (g/d/pc)	Energia (kcal/d/pc)
LOW	$0,99 \pm 0,15$	$5,73 \pm 0,87$
MED	$0,86 \pm 0,00$	$4,97 \pm 0,01$
HIGH	$0,90 \pm 0,07$	$5,19 \pm 0,55$
CONT+	$0,88 \pm 0,05$	$5,10 \pm 0,41$

<sup>1</sup>Valores expressos como média  $\pm$  DP

A **Figura 13** apresenta o peso dos animais de acordo com os 4 grupos experimentais, enquanto na **Figura 14** observa-se o ganho de peso de cada grupo.



**Figura 13:** Peso dos animais durante o período experimental (g). Valores são expressos como média  $\pm$  DP; (n=8-10). Grupos:  $\blacktriangle$  LOW;  $\blacksquare$  MED;  $\blacktriangledown$  HIGH;  $\blacklozenge$  CONT+.

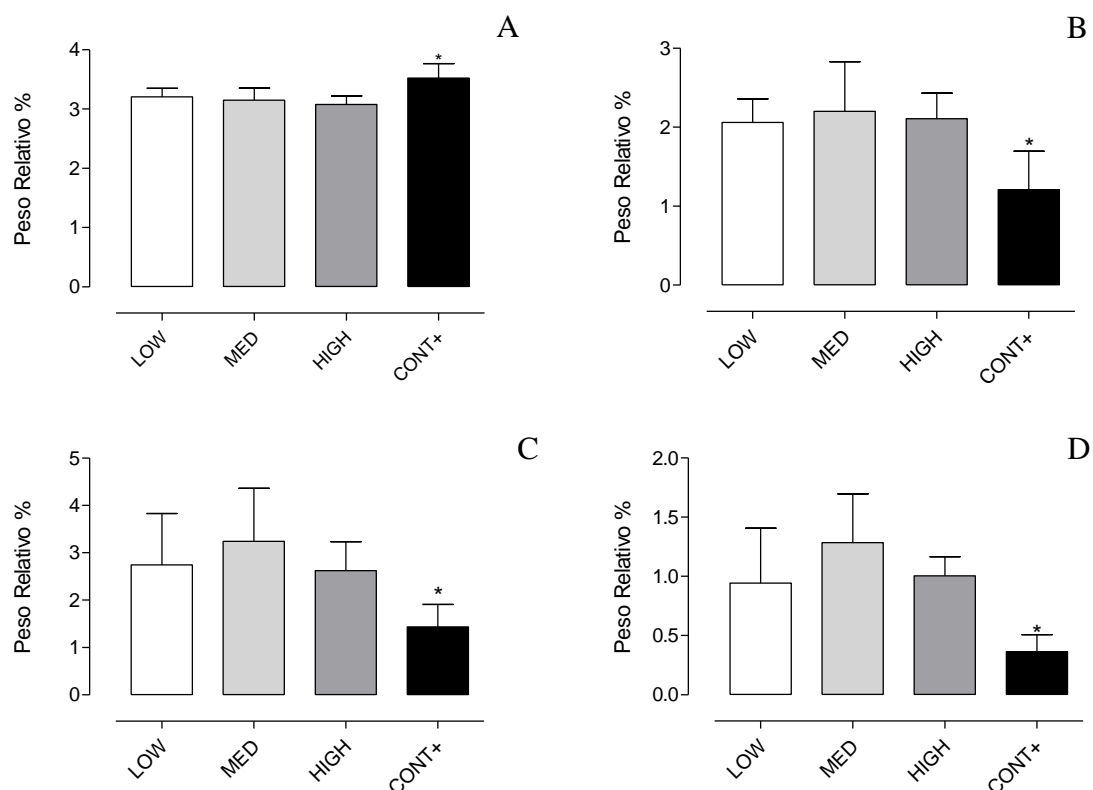


**Figura 14:** Ganho de peso dos animais durante o período experimental (%). Valores são expressos como média  $\pm$  DP; (n=8-10), \*\*  $p < 0,01$

O ganho de peso apresentado pelos animais do grupo CONT+ foi menor que o ganho observado nos grupo LOW e MED não diferindo dos valores obtidos no grupo HIGH. Considerando-se que não houve diferença no consumo de ração e no aporte calórico, essa diferença no ganho de peso observado no grupo CONT+ poderia ser atribuída à diabetes tipo I induzida pela estreptozotocina.

## 7.7 Peso relativo dos tecidos

A **Figura 15** apresenta o peso relativo do fígado (Fig.15A), tecido adiposo abdominal (Fig.15B), tecido adiposo retro-epididimal (Fig.15C) e tecido adiposo retro-peritoneal (Fig.15D) dos animais de acordo com os 4 grupos experimentais.

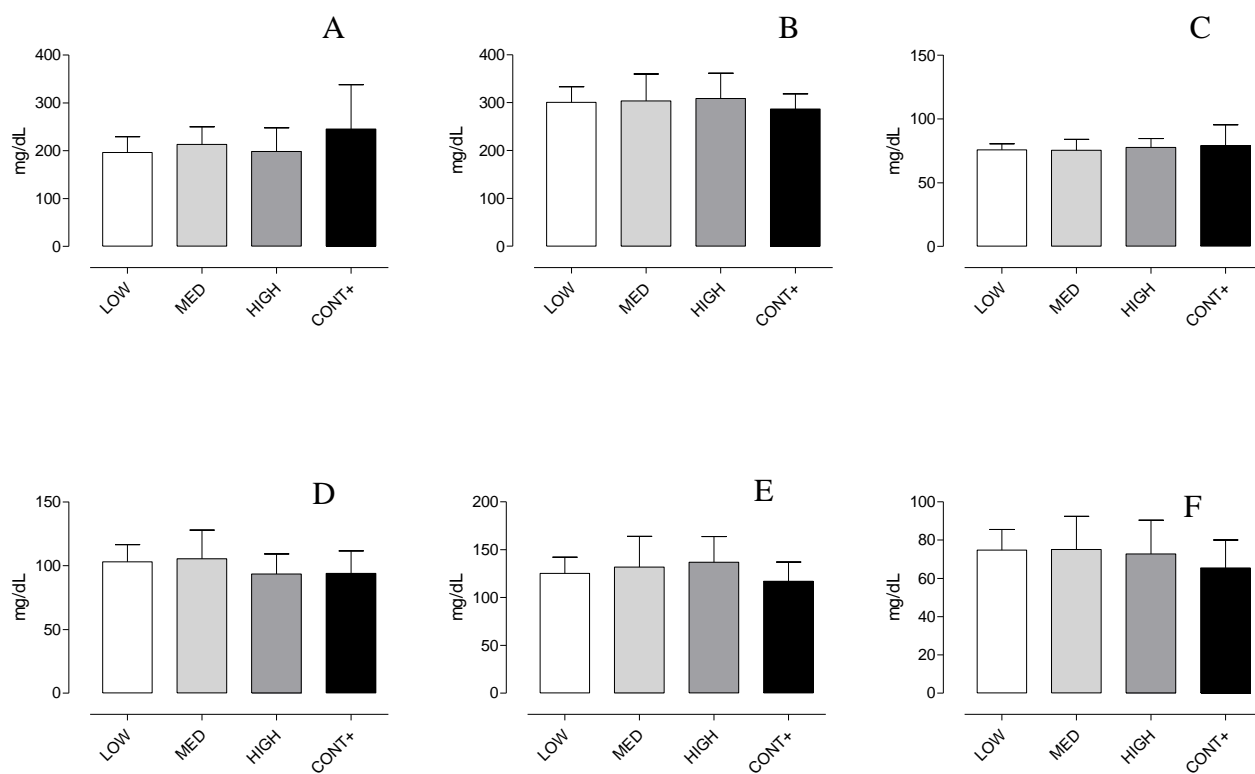


**Figura 15:** Peso relativo do fígado (A), tecido adiposo abdominal (B), tecido adiposo retro-epididimal(C) e tecido adiposo retro-peritoneal(D) dos animais (n=8-10/ grupo). Valores expressos como média  $\pm$  DP. \*P<0.05.

O consumo de uma dieta hiperlipídica não alterou o tamanho relativo dos tecidos analisados entre os grupos LOW, MED e HIGH. Entretanto, o efeito da indução da diabetes tipo I foi evidenciado no maior tamanho relativo de todos os tecidos analisados, em função do menor ganho de peso desses animais durante o período experimental.

## 7.8 Parâmetros bioquímicos determinados no plasma

Os valores encontrados para glicose, colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicerídeos de acordo com os 4 grupos experimentais, encontram-se na **Figura 16**.

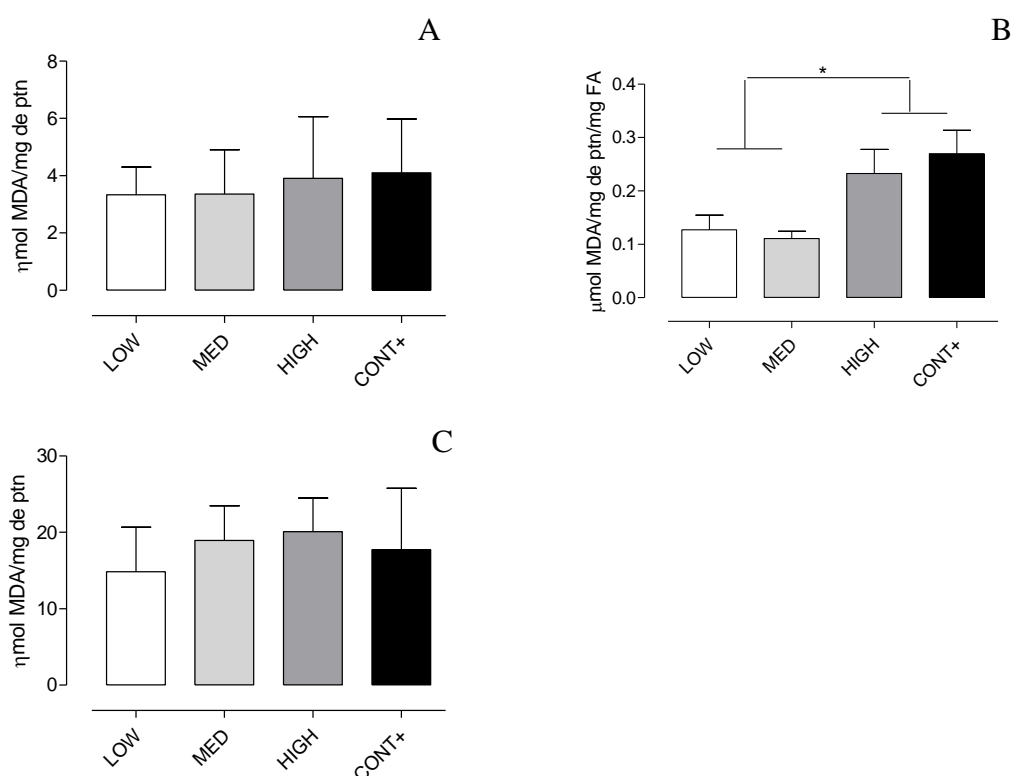


**Figura 16:** Concentração de glicose sanguínea dos animais (A), colesterol total (B), HDL (C), LDL (D), VLDL (E) e triglicerídeos (F) em mg/dL expressas como média  $\pm$  DP.

Não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum dos parâmetros analisados.

## 7.9 Determinação de MDA em homogenato de tecido hepático e plasma

A **Figura 17** apresenta as concentrações de MDA determinadas nas amostras de homogenato de tecido hepático (Fig.17A) e em plasma (Fig.17B)



**Figura 17:** Concentração de MDA no fígado em nmol MDA/mg de proteína (fig. A), no fígado em μmol MDA/mg de proteína/ácidos graxos (FA) (fig. B) e no plasma em nmol MDA/mg de proteína (fig. C) expressa como média ± DP.

Apesar de os valores de MDA não apresentarem diferença significativa entre os grupos, observou-se uma tendência de aumento de concentração de MDA conforme o aumento do nível de oxidação do óleo ingerido.

Quando analisado a concentração de MDA dividido pela quantidade de ácidos graxos precursor dele presentes no tecido hepático foi possível verificar diferença estatística entre os grupos HIGH e CONT+ como os grupos LOW e MED como demonstra a figura 17B.

### 7.10 Perfil de ácidos graxos

Em relação à concentração de ácidos graxos no fígado pode-se observar que a quantidade total apresentada pelos grupos HIGH e CONT<sup>+</sup> foi menor do que a quantidade apresentada pelos grupos LOW e MED (**Tabela 8**).

**Tabela 8:** Composição de ácidos graxos do tecido hepático (mg de ácidos graxos/g de tecido).

Ácidos Graxos	LOW	MED	HIGH	CONT <sup>+</sup>
C16:0	16,28 ± 3,59	19,97 ± 6,82	13,79 ± 2,15	13,40 ± 2,51
C16:1	0,28 ± 0,40	0,49 ± 0,70	0,07 ± 0,20	0,06 ± 0,17
C18:0	8,91 ± 2,62	11,41 ± 1,16	9,00 ± 1,21	8,96 ± 1,16
C18:1 n9 c	12,60 ± 6,37 <sup>a</sup>	15,82 ± 11,94 <sup>b</sup>	8,51 ± 2,88 <sup>c</sup>	8,60 ± 3,42 <sup>c</sup>
C18:1 n9 t	0,26 ± 0,42	0,29 ± 0,59	ND	ND
C18:2 n6 c	9,50 ± 3,86 <sup>a</sup>	11,42 ± 5,20 <sup>a</sup>	7,43 ± 2,59 <sup>b</sup>	6,23 ± 2,33 <sup>b</sup>
C18:3 n3	7,13 ± 4,34 <sup>a</sup>	7,30 ± 5,28 <sup>a</sup>	4,45 ± 2,36 <sup>b</sup>	4,50 ± 2,31 <sup>b</sup>
C20:4 n6	1,70 ± 0,61	2,15 ± 0,47	1,45 ± 0,52	1,18 ± 0,50
C20:5 n3	1,10 ± 0,79	1,30 ± 0,95	0,52 ± 0,64	0,64 ± 0,52
C22:6 n3	2,60 ± 1,16	2,99 ± 0,95	2,19 ± 0,54	1,78 ± 0,79
Total	60,34 ± 20,99 <sup>a</sup>	73,15 ± 32,04 <sup>a</sup>	47,40 ± 11,71 <sup>b</sup>	45,34 ± 12,3 <sup>b</sup>
SAFA	25,18 ± 5,81	31,38 ± 7,66	22,79 ± 3,25	22,36 ± 3,59
MUFA	13,14 ± 6,77 <sup>a</sup>	16,60 ± 13,13 <sup>b</sup>	8,57 ± 3,04 <sup>c</sup>	8,66 ± 3,47 <sup>c</sup>
PUFA	22,02 ± 10,02 <sup>a</sup>	25,17 ± 11,93 <sup>a</sup>	16,04 ± 6,06 <sup>b</sup>	14,33 ± 6,05 <sup>b</sup>

Valores são expressos como média ± DP, valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

(ND) Não detectado na amostra

Além da menor quantidade total de ácidos graxos hepáticos, foi possível observar uma quantidade reduzida do ácido linoleico (LNA, C18:2 n6), ácido oléico (C18:1 n9) e ácido alfa-linolênico (ALA, C18:3 n3) com consequente menor quantidade de MUFA e PUFA nos grupos HIGH e CONT<sup>+</sup> em relação ao grupos LOW e MED. Não sendo observada qualquer diferença no perfil de ácidos graxos do plasma (**Tabela 9**) e do tecido adiposo (**Tabela 10**).



**Tabela 9:** Composição de ácido graxos do plasma (mg de ácidos graxos/ mL de plasma)

Ácidos Graxos <sup>1</sup>	LOW	MED	HIGH	CONT+
C16:0	0,96 ± 0,20	1,03 ± 0,40	1,17 ± 0,31	0,99 ± 0,16
C16:1	0,03 ± 0,02	0,02 ± 0,03	0,01 ± 0,02	0,14 ± 0,25
C18:0	0,75 ± 0,19	0,82 ± 0,30	0,91 ± 0,25	0,76 ± 0,09
C18:1 n9 c	0,87 ± 0,27	0,81 ± 0,36	0,96 ± 0,37	0,81 ± 0,24
C18:2 n6 c	1,25 ± 0,60	1,52 ± 0,53	1,58 ± 0,30	1,05 ± 0,49
C18:3 n6	0,06 ± 0,07	0,07 ± 0,14	0,06 ± 0,20	ND
C18:3 n3	0,65 ± 0,47	0,49 ± 0,54	0,48 ± 0,60	0,33 ± 0,11
C18:4 n3	0,12 ± 0,14	0,09 ± 0,19	0,08 ± 0,26	0,02 ± 0,04
C20:4 n6	0,31 ± 0,08	0,36 ± 0,21	0,35 ± 0,11	0,26 ± 0,04
C20:5 n3	0,25 ± 0,11	0,24 ± 0,17	0,25 ± 0,09	0,26 ± 0,05
Total	5,25 ± 1,41	5,46 ± 2,21	5,84 ± 1,60	4,61 ± 0,51
SAFA	1,71 ± 0,39	1,85 ± 0,68	2,07 ± 0,55	1,75 ± 0,22
MUFA	0,90 ± 0,26	0,83 ± 0,38	0,97 ± 0,37	0,94 ± 0,48
PUFA	2,64 ± 0,82	2,78 ± 1,27	2,80 ± 1,00	1,92 ± 0,37

<sup>1</sup>Valores são expressos como média ± DP

(ND) Não detectado na amostra

**Tabela 10:** Composição de ácidos graxos do tecido adiposo total (g/ 100g de tecido).

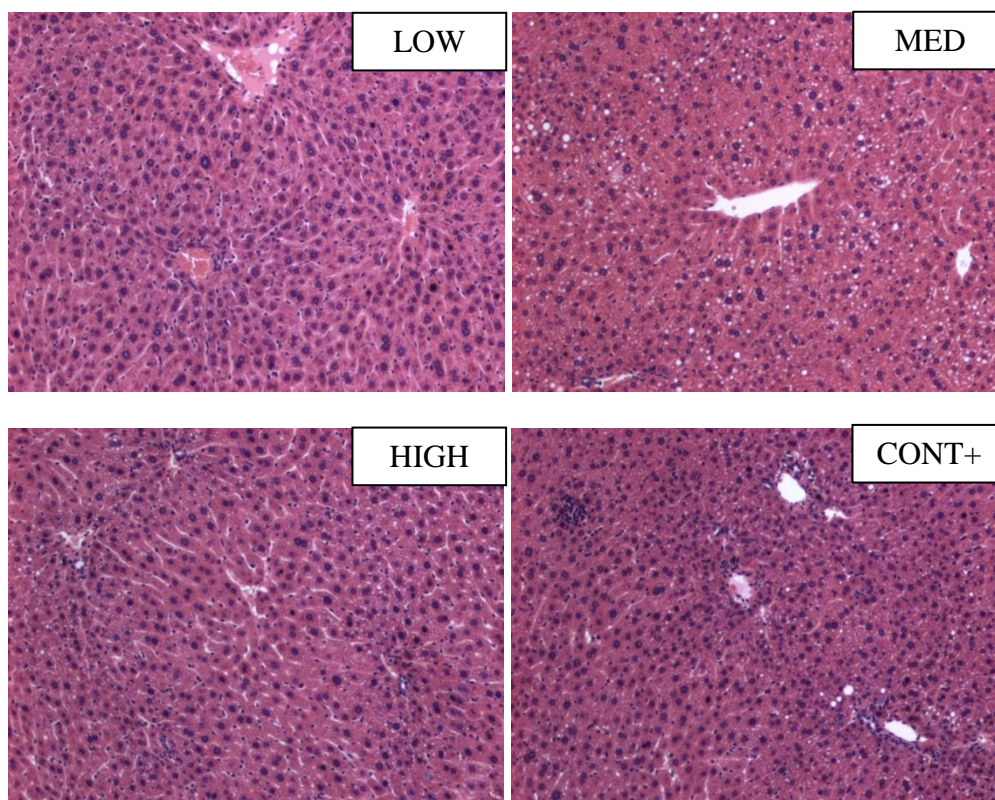
Ácidos Graxos <sup>1</sup>	LOW	MED	HIGH	CONT+
C14:0	0,45 ± 0,08	0,45 ± 0,04	0,43 ± 0,08	0,45 ± 0,06
C16:0	14,83 ± 2,41	14,93 ± 1,60	13,99 ± 1,40	15,81 ± 2,24
C16:1 n7	0,64 ± 1,86	0,46 ± 0,14	0,45 ± 0,14	0,32 ± 0,25
C16:1 n9	2,85 ± 0,67	3,02 ± 0,50	2,89 ± 0,52	2,50 ± 0,49
C17:0	0,0 ± 0,02	0,02 ± 0,04	0,02 ± 0,05	0,0 ± 0,02
C17:1 n7	0,03 ± 0,06	0,04 ± 0,07	0,04 ± 0,07	0,0 ± 0,03
C18:0	4,78 ± 1,32	4,49 ± 1,14	4,33 ± 1,13	5,86 ± 1,64
C18:1 n9 c	42,05 ± 1,97	41,75 ± 2,55	42,55 ± 1,94	43,20 ± 2,19
C18:1 n9 t	1,59 ± 0,16	1,57 ± 0,11	1,63 ± 0,13	1,47 ± 0,47
C18:2 n6 c	17,44 ± 1,19	17,36 ± 0,92	18,79 ± 0,93	14,73 ± 1,23
C18:3 n3	15,15 ± 2,19	15,72 ± 2,18	14,59 ± 11,37	15,64 ± 1,79
C20:1 n7	0,19 ± 0,19	0,21 ± 0,19	0,29 ± 0,20	0,10 ± 0,17
C20:4 n6	ND	0,0 ± 0,02	0,0 ± 0,02	ND
Total	100	100	100	100
SAFA	20,06 ± 3,27	19,88 ± 2,54	18,77 ± 2,29	22,03 ± 3,68
MUFA	47,35 ± 2,77	47,03 ± 2,50	47,83 ± 1,97	47,60 ± 2,51
PUFA	32,59 ± 2,60	33,09 ± 2,57	33,38 ± 1,76	30,37 ± 2,65

Valores são expressos como média ± DP

(ND) Não detectado na amostra

### 7.11 Determinação de esteatose hepática

A **Figura 18** apresenta uma fração do tecido hepático, com pouco processo de balonização, inflamação lobular e acúmulo de gordura. A análise histológica do fígado dos animais apresentou um escore de NAS  $\leq 2$ , sendo diagnosticado como esteatose simples. Não foi observada diferença entre os grupos.



**Figura 18:** Fração dos fígados dos animais corados com HE para análise de esteatose. Todos os grupos apresentaram um quadro de esteatose simples, com pouco processo de balonização e inflamação lobular. Valores de probabilidade observados entre os 4 grupos para balonização ( $p=0,546$ ); esteatose ( $p=0,247$ ); inflamação lobular ( $p=0,039$ ) e índice de NAS ( $p=0,135$ ).

### 7.12 Atividade de enzimas antioxidantes no fígado

A atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutational peroxidase (GPx), glutational redutase (GR) e catalase não foi alterada pelo nível de oxidação dos óleos (**Tabela 11**).

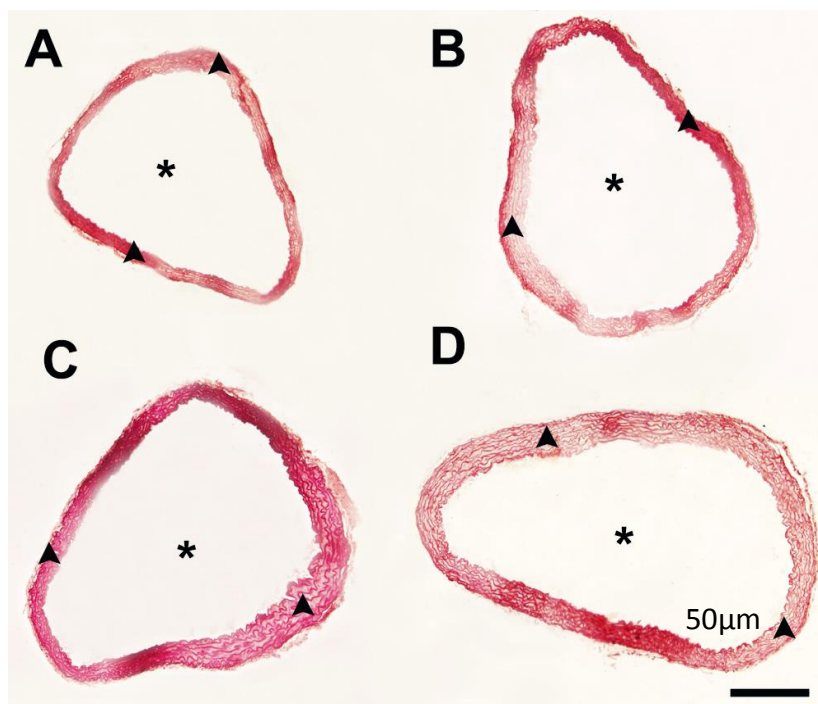
**Tabela 11:** Atividade das enzimas antioxidantes no fígado

Atividade (U/mg ptn) <sup>1</sup>	Grupos				
	LOW	MED	HIGH	CONT+	P
SOD	3,82 ± 2,45	4,83 ± 3,01	5,02 ± 3,18	5,35 ± 2,7	0,490
GPx	6,11 ± 4,63	9,91 ± 3,9	9,74 ± 6,05	8,48 ± 5,3	0,569
GR	0,093 ± 0,016	0,095 ± 0,013	0,093 ± 0,012	0,092 ± 0,027	0,969
Catalase	11,85 ± 5,33	12,76 ± 6,93	8,64 ± 3,53	7,84 ± 4,40	0,201

<sup>1</sup>Valores são expressos como média ± DP

### 7.13 Estudo Estereológico da Aorta

A **Figura 19** representa uma fração das aortas analisadas, sendo os valores quantitativos apresentados na **Tabela 12**. Baseado nesses dados foi possível observar que o grupo HIGH apresentou maior volume de parede e maior volume de lúmen que os demais grupos.



**Figura 19:** Imagem representativa das aortas dos animais, grupo CONT+(A), LOW (B), MED (C) e HIGH (D). \* identifica o lúmen e ▲ a parede vascular, na escala de 50μm.

**Tabela 12:** Estimativas estereológicas do volume da aorta dos camundongos.

<i>Grupos</i>	<i>CONT +</i>	<i>LOW</i>	<i>MED</i>	<i>HIGH</i>
<b>Volume da Parede</b> (mm <sup>3</sup> )	0,506 (0,18) <sup>c</sup>	0,587 (0,14) <sup>bc</sup>	0,687 (0,08) <sup>b</sup>	1,070 (0,07) <sup>a</sup>
<b>Volume do Lúmen</b> (mm <sup>3</sup> )	0,580 (0,15) <sup>b</sup>	0,667(0,16) <sup>b</sup>	0,829 (0,16) <sup>b</sup>	1,216 (0,22) <sup>a</sup>
<b>Volume da Aorta ascendente</b> (mm <sup>3</sup> )	1,085 (0,16) <sup>c</sup>	1,254(0,12) <sup>bc</sup>	1,516 (0,12) <sup>b</sup>	2,287 (0,15) <sup>a</sup>

Os valores de cada parâmetro são expressos pela média do grupo, seguida do seu coeficiente de variação (CV). As médias assinaladas com uma mesma letra não diferem estatisticamente ( $p < 0,005$ ).

## 8. Discussão

### Por que o óleo de linhaça foi selecionado para a produção das dietas?

A susceptibilidade de um óleo à oxidação aumenta de acordo com o aumento das insaturações dos ácidos graxos que o compõem (Gray, 1978). Portanto, a presença da dupla ligação entre os carbonos na cadeia do ácido graxo favorece a abstração do hidrogênio metilênico pelas espécies reativas, em função da menor energia necessária à ruptura das ligações  $\pi$  comparada às ligações  $\sigma$  (Frankel, 2005). Observa-se que a proporção de ácidos graxos poli-insaturados no óleo de linhaça é 11,1% maior que no óleo de soja, e 17,3% maior que no óleo de milho. Além disso, o índice de peroxidabilidade do óleo de linhaça é 41% e 56% maior que o IP dos óleos de soja e de milho, respectivamente. Considerando-se a necessidade de desenvolver um óleo com três níveis de oxidação, optou-se assim pela utilização do óleo de linhaça para a elaboração das rações, em função de sua maior susceptibilidade oxidativa.

O óleo de linhaça utilizado neste estudo não apresentava em sua rotulagem adição de antioxidantes. Por essa razão, foi mantido sob refrigeração (4°C) até o momento da indução da oxidação. Desta forma, o óleo no início do experimento (T0) apresentava concentração de hidroperóxidos (LOOH) de  $2,47 \pm 0,02$  meq/kg; malonaldeído (TBARS) de  $3,72 \pm 0,04$  mg/L e hexanal não detectável. Como esperado, os níveis dos marcadores oxidativos iniciais observados no óleo de linhaça foram superiores àqueles encontrados no óleo de soja, adquirido e analisado no mesmo período para efeito comparativo:  $0,07 \pm 0,03$  meq/kg de LOOH e  $0,7 \pm 0,2$  mg/L de malonaldeído (TBARS). Embora superior, o valor de peróxido (LOOH) observado no óleo de linhaça estava dentro do limite estabelecido pela legislação para consumo humano (10 meq/kg) (Anvisa, 2005). Considerando-se que o malonaldeído é formado apenas da oxidação de ácidos graxos com mais de duas duplas ligações (Frankel, 2005), também é esperado que a concentração de TBARS alcance valores maiores no óleo de linhaça que no óleo de soja. Assim sendo, estabeleceu-se o óleo de linhaça mantido sob refrigeração, como o nível de oxidação “baixo” descrito no modelo experimental.

## Por que foram utilizados níveis moderados de oxidação?

A reação oxidativa segue o modelo de “Arrhenious”, no qual a velocidade da reação eleva-se com a elevação da temperatura (Tan *et al.*, 2001). Porém, apesar da temperatura elevada (100°C), os tubos contendo o óleo estavam fechados, impedindo assim a passagem de oxigênio. Assim, a reação oxidativa limitou-se a difusibilidade do oxigênio presente no tubo cônico (50mL) do *headspace* para o interior da amostra. A limitação da concentração de oxigênio pode ter contribuído para manter a concentração dos marcadores baixa mesmo após as 10 horas de aquecimento, visto que em teste realizado para efeito comparativo, o óleo de linhaça quando submetido a aquecimento na mesma temperatura do óleo utilizado no estudo, mas com o tubo aberto apresentou concentração de hidroperóxidos de  $8,30 \pm 0,36$  meq/kg e  $56,15 \pm 0,96$  mg/L de TBARS. É importante ressaltar que neste estudo, os níveis de oxidação moderada e elevada não poderiam alcançar valores muito altos, uma vez que o odor desagradável característico dos produtos voláteis secundários poderia inibir o consumo da ração pelos animais durante o ensaio biológico (Kimura *et al.*, 2004). Não há informação na literatura científica sobre quais seriam os níveis máximos de marcadores químicos oxidativos encontrados no óleo, capazes de causar inibição significativa de consumo por roedores, ou mesmo se a inibição observada em humanos reporta-se também em animais de experimentação.

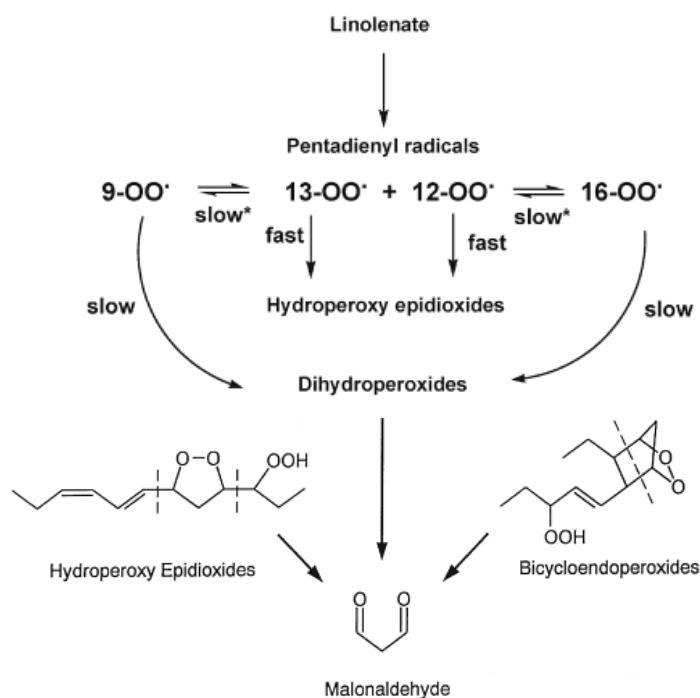
Awada *et al.* (2012) suplementou camundongos com ácidos graxos omega 3 oxidados a um nível maior (5,8μM equivalente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/g de óleo que representa 11,6meq/kg) ao valor alcançado em nosso estudo com a dieta HIGH (4,7meq/kg). Os autores observaram aumento do estresse oxidativo e inflamação no intestino delgado dos animais em comparação com o grupo suplementado com óleo não oxidado. Entretanto, como no estudo conduzido por Awada *et al.* (2012) a suplementação foi realizada via intragástrica, não foi possível usar esse parâmetro para estimar a ingestão oral. Portanto, optou-se em limitar a oxidação do óleo em níveis estatisticamente diferentes, porém não abusivos, utilizando-se a elevação da temperatura num sistema fechado, inibindo a excessiva formação de produtos secundários.

**Por que em termos de produtos secundários, observou-se maior variação na concentração de MDA que na concentração de hexanal?**

A oxidação do ácido alfa-linolênico (ALA, C18:3 n3), conduz a formação de 4 isoformas de hidroperóxidos:

- 9-hidroéroxí-trans-10, cis-12, cis-15-octadecatrienoato (9-OOH)
  - 13-hidroperóxi-cis-9, trans-11, cis-15-octadecatrienoato (13-OOH)
  - 12-hidroperóxi-cis-9,trans-13, cis-15- octadecatrienoato (12-OOH)
  - 16-hidroperóxi-cis-9, cis-12, trans-14- octadecatrienoato (16-OOH)
- (Frankel, 2014).

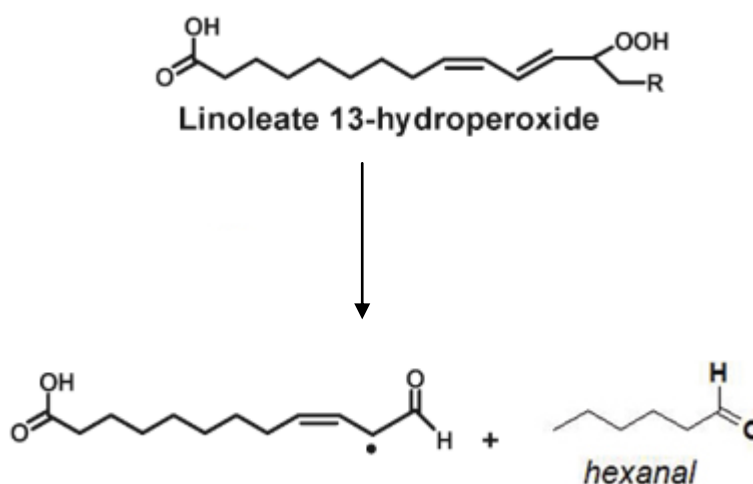
Esses hidroperóxidos sofrem decomposição gerando hidroperoxi-epidioxidos, biciclo-endoperóxidos e dihidroperóxidos, que são os precursores do MDA (**Figura 20.**)(Frankel, 2005).



**Figura 20:** Formação de peróxidos e MDA a partir do ácido linolênico. Adaptado de Frankel (2005).

O MDA é um dos principais produtos da peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados, podendo também ser formado pelo metabolismo fisiológico. Sua formação ocorre em ácidos graxos poli-insaturados contendo mais que duas duplas ligações. Tem sua concentração elevada em diversas patologias como câncer, pré-eclampsia, diabetes e doenças cardiovasculares. Além disso, o MDA é altamente mutagênico e considerado também como marcador de estresse oxidativo (Del Rio, Stewart e Pellegrini, 2005).

O hexanal por sua vez é um produto volátil da oxidação lipídica, relacionado principalmente a alterações nas características sensoriais dos alimentos. Sua produção ocorre principalmente a partir do ácido linoleico (LNA, C18:2 n6) (Frankel, 2014). Dentre os hidroperóxidos formados, o 13-OOH é o principal precursor de hexanal (Figura 21).



**Figura 21:** Formação do hexanal a partir do 13OOH do ácido linoleico. Adaptado de Frankel (2005)

Considerando-se a maior proporção de ALA (44,44%) que LNA (19,28%) na amostra de óleo, assim como a maior susceptibilidade do ALA que o LNA a oxidação, é razoável que as concentrações de MDA tenham se elevado de forma mais expressiva que as concentrações de hexanal.



## **Por que não foi observada diferença entre os grupos em relação ao perfil de glicemia e lipoproteínas?**

Apesar da indução de diabetes tipo I no grupo CONT+ e da redução do tecido adiposo desses animais, não foi observada diferença na concentração de glicose nos animais alocados nesse grupo (280,4mg/dL) em relação aos demais (196mg/dL no grupo LOW, 213mg/dL no grupo MED e 198mg/dL no grupo HIGH). Van den Bergh *et al.* (2007) observaram que camundongos C57BL/6 “knockout” para receptor de LDL apresentavam glicemia de jejum média de 82,88mg/dL quando tratados com ração controle, representando cerca da metade dos valores encontrados no presente estudo. Portanto a própria dieta “high fat” foi responsável pelo aumento da glicemia em todos os grupos, independente da oxidação do óleo ou da estreptozotocina. A literatura reporta que camundongos “knockout” para receptor de LDL são mais susceptíveis à diabetes em relação a camundongos “knockout” para ApoE sob dieta hiperlipídica (Schreyer *et al.*, 2002).

A dieta rica em gordura pode causar o aumento de glicose, pois com o aumento da ingestão desse nutriente ocorre o aumento de tecido adiposo, sendo capaz de liberar substâncias envolvidas no desenvolvimento da resistência insulínica, aumentando assim a quantidade de glicose na corrente sanguínea (Kahn, Hull e Utzschneider, 2006).

Quanto aos valores encontrados para colesterol e frações, observou-se um quadro representativo de dislipidemia quando comparado à camundongos de mesma idade (24 semanas) alimentados com ração convencional. A concentração de colesterol total que estes animais apresentaram foi em média de 213mg/dL (Van den Bergh *et al.*, 2007) ao passo que os animais tratados com as rações “high fat” apresentaram concentração média de 301,1 (LOW), 303,3 (MED), 308,6 (HIGH) e 286,8mg/dL no grupo CONT<sup>+</sup>. Além disso, a concentração de triglicerídeos dos animais tratados com a dieta “high fat” do nosso estudo foi de 74,80 (LOW), 75,13 (MED) e 72,78mg/dL (HIGH), sendo superior à encontrada nos animais LDLr<sup>(-/-)</sup> alimentados com dieta convencional (65,00mg/dL) (Van den Bergh *et al.*, 2007). A concentração elevada de LDL (média de 98,97mg/dL) confirma a ausência de receptor para LDL, alterando o perfil característico dos roedores “wild type”, que sobre efeito de dieta convencional

apresentam concentrações de LDL de 10,8mg/dL (Bordone *et al.*, 2007). Portanto, não foram observadas diferenças no perfil lipoproteico e na esteatose hepática entre os grupos em função de todos serem LDLr<sup>(-/-)</sup> e terem sido suplementados com uma dieta “high fat”.

Na realidade, alguns estudos têm demonstrado uma redução na absorção de lipídios e colesterol após a ingestão de ácidos graxos oxidados (Chao *et al.*, 2001; Sülzle, Hirche e Eder, 2004; Ringseis, Muschick e Eder, 2007; Kämmerer, Ringseis e Eder, 2011). Entretanto, diferente do nosso estudo, as pesquisas que observaram efeito hipolipidêmico após o consumo de lipídios oxidados utilizaram doses muito mais elevadas por intubação gástrica, ou via oral utilizando óleo após o procedimento de fritura. (Chao *et al.*, 2001; Sülzle, Hirche e Eder, 2004; Ringseis, Muschick e Eder, 2007; Kämmerer, Ringseis e Eder, 2011).

Alguns estudos ainda demonstram que os produtos da oxidação lipídica, como os hidroperóxidos e aldeídos são absorvidos pelos enterócitos, transportados pelos quilomícrons e metabolizados no fígado. Os aldeídos podem ser conjugados com a glutathione (GSH) e excretados pela via renal, o que diminui a concentração da GSH, aumentando assim a condição oxidante do meio (Staprans *et al.* 2000; Staprans *et al.*, 1994; Staprans *et al.*, 1996). Os aldeídos produzidos na oxidação lipídica que não reagirem com a GSH, são incorporadas às VLDL. As partículas de VLDL convertem-se em LDL, nesse caso já contendo aldeídos como o HNE, HHE e MDA em sua composição. Esses aldeídos podem reagir com a lisina da Apo B, modificando sua estrutura, e gerando LDL modificada (mLDL) (Brown e Goldstein, 1983; Staprans *et al.*, 1996). A mLDL não é reconhecida pelos receptores de LDL, mas se liga à receptores “scavengers” presentes nos macrófagos, sendo então fagocitada, contribuindo assim para o processo aterosclerótico (Itabe, 2012; Iwata e Nagai, 2012; Levitan, Volkov e Subbaiah, 2010).

Desta forma, o consumo de lipídios oxidados na dosagem aplicada neste estudo, poderia promover estresse oxidativo, mas não hiperlipidemia, o que justifica a ausência de diferença nesse parâmetro entre os 4 grupos.

## **Por que o perfil de ácidos graxos do grupo HIGH foi semelhante ao grupo CONT+?**

Apesar do perfil de ácidos graxos entre os grupos HIGH e CONT+ serem semelhantes, mecanismos fisiológicos diferentes contribuíram para essa condição.

Estudos utilizando óleo oxidado por meio de fritura evidenciaram que os produtos dessa oxidação, especialmente hidróxidos e hidroperóxidos, acionam receptores ativados por proliferador de peroxissoma do tipo alfa (PPAR- $\alpha$ ) em fígado de ratos (Chao *et al.*, 2001; Sülzle, Hirche e Eder, 2004; Ringseis, Muschick e Eder, 2007; Kämmerer, Ringseis e Eder, 2011). Os PPAR- $\alpha$  são receptores nucleares ligados a regulação de funções fisiológicas como a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, cetogênese e gliconeogênese. No fígado, sua função está relacionada à proteção contra esteatose hepática, por favorecer a  $\beta$ -oxidação (Peyrou *et al.*, 2012). Dessa forma, supõe-se que os animais que consumiram a ração com nível de oxidação elevado apresentaram maior ativação de receptores PPAR- $\alpha$ , contribuindo para a diminuição da concentração de ácidos graxos no fígado (Chao *et al.*, 2001; Koch *et al.*, 2007; Fei *et al.*, 2011).

Com relação ao grupo CONT+, a menor quantidade de ácidos graxos se deve a necessidade de um aumento de ácidos graxos livres na circulação como fonte de energia, uma vez que os animais diabéticos são caracterizados por uma baixa captação de glicose pelas células (Hawkins *et al.*, 2003; Jung *et al.*, 2006).

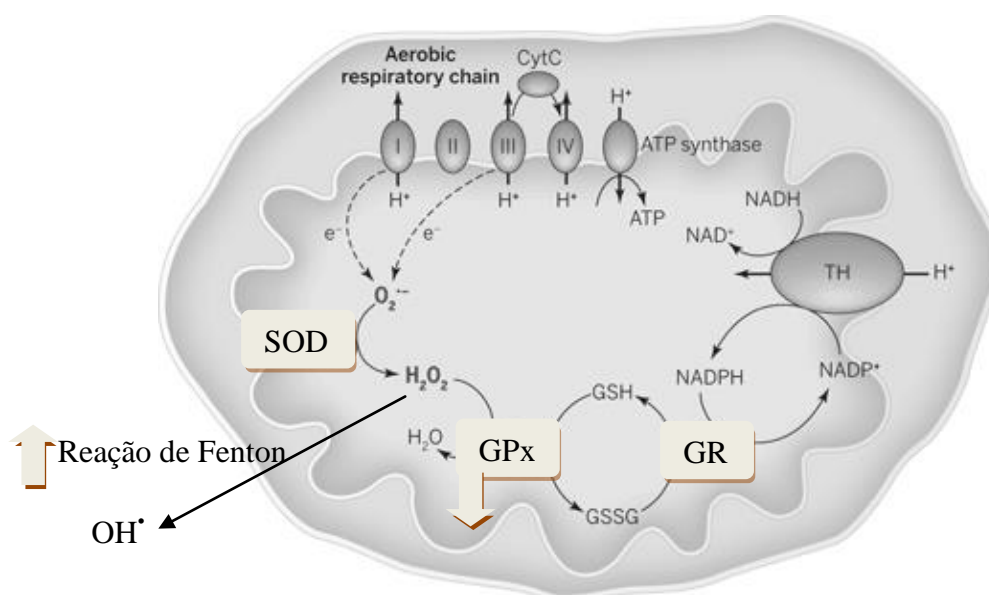
## **O consumo de óleo de linhaça oxidada alterou biomarcadores de estresse oxidativo?**

Exceto em relação à concentração de MDA determinada no fígado, não foram observadas alterações nos outros biomarcadores avaliados em nosso modelo. Algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar este resultado. Em primeiro lugar, o óleo de linhaça foi submetido a um baixo nível de oxidação (4,69 meq LOOH/kg), considerando 10,00 meq LOOH/kg como limite legal de óleos para consumo humano (ANVISA, 2005). Staprans *et al.* (1993) suplementaram ratos Sprague-Dawley por via intragástrica com óleo de milho oxidado, proporcionalmente contendo cerca de três vezes mais peróxidos que o óleo de linhaça utilizado em nosso estudo. Os autores

relataram um aumento de peróxidos e TBARS no soro em comparação com um grupo alimentado com uma dieta isenta de lipídios e de sacarose. Khan- Merchant *et al.* (2002) observaram um aumento da área de lesão aórtica em mais de 100% em comundongos LDL<sup>(-/-)</sup> alimentados por sonda com 5,6 mg de LNA oxidado, associado a uma dieta rica em gordura, enquanto que o valor estimado em nosso estudo foi apenas 2,9 mg de LNA + ALA oxidados. O baixo nível de oxidação selecionado em nosso modelo visou mimetizar os valores reais encontrados em alimentos que são considerados seguros para consumo humano e também para evitar a rejeição de dieta pelos animais, devido ao forte odor característico dos produtos secundários da oxidação dos PUFA (Dobarganes e Marquez-Ruiz, 2003), uma vez que optamos pela suplementação oral em lugar da via intragástrica. Estudos tem demonstrado que embora os peróxidos lipídicos sejam altamente tóxicos para roedores, seus efeitos tendem a ser menos graves após administração oral, devido à sua reduzida absorção através dos enterócitos (Grootveld *et al.*, 1998). Deste modo, o baixo nível da oxidação do óleo associado a uma absorção reduzida dos seus produtos de oxidação pode ter contribuído para a ausência de alterações significativas nos valores de MDA plasmáticos e atividade das enzimas antioxidantes.

Nossa segunda hipótese refere-se ao tipo de marcador oxidativo selecionado em diferentes estudos. Em geral, os aldeídos de cadeia curta gerados a partir de peroxidação lipídica, podem ser classificados em 2-alcanais (ex: acroleína), 4-hidroxi-2-alcenais (ex: 4-hidroxi-2-nonenal, 4-hidroxi-2-nonenal), e cetoaldeídos (ex: MDA). Enquanto HNE é o principal aldeído produzido durante a oxidação dos ácidos graxos Omega 6, e HHE é característico da oxidação de ácidos graxos Omega 3, MDA é o aldeído mais abundante capaz de formar ligação com resíduos de lisina na apo B (Uchida, 2003; Adibhatla e Hatcher, 2010). Por esta razão, o MDA foi o biomarcador selecionado em nosso estudo. No entanto, 4-HHE, propanol, F3-Isoprostanos, F4-Neuroprostanos e os seus isômeros são produtos mais específicos da oxidação dos ácidos graxos Omega 3 (Esterbauer *et al.*, 1992, Frankel, 2005; Negre-Salvayre *et al.*, 2008). O principal ácido graxo poli-insaturado presente no óleo de linhaça é ácido graxo Omega 3  $\alpha$ -linolênico (ALA), representando cerca de 44% do total. Portanto, a quantificação de 4-HHE, propanol e F3-Isoprotanos, poderia ser aplicada para complementar a análise de MDA em futuras pesquisas.

A terceira hipótese é que na dieta oferecida aos quatro grupos, a concentração de ferro e sal foi aumentada enquanto de selênio foi reduzida, com o objetivo de promover uma maior resposta em termos de estresse oxidativo, e também para mimetizar as dietas ocidentais. Vários experimentos sugerem que hemoglobina oxidada e sobrecarga de ferro aumentam a peroxidação lipídica no fígado (Adibhatla e Hatcher, 2010; Vinchi *et al.*, 2014; Ibrahim *et al.*, 1997). Além do ferro, selênio é co-fator para a atividade da GPx (Fairweather-Tait *et al.*, 2011). Assim, essas alterações podem ter contribuído para o aumento do estresse oxidativo independente da presença de lipídios oxidados (**Figura 22**).



**Figura 22:** Esquema do sistema das enzimas antioxidantes. Adaptado de Kregel e Törnroth-Horsefield (2015).

Finalmente, Yin *et al.* (2007) relataram que os mesmos produtos de oxidação gerados *in vitro* por ação das ROS podem ser detectados *in vivo*. Embora a taxa de conversão seja baixa, parte de ALA é convertido em EPA e DHA, durante o metabolismo. Os mesmos autores relataram que J3-IsoPs derivados do EPA ativam o fator de transcrição Nrf2, que induz a expressão genes citoprotetores, promovendo a desintoxicação das ROS (Gao *et al.*, 2007; Oikawa *et al.*, 2012; Adibhatla e Hatcher, 2010; Flora, 2011). Na verdade, não há consenso sobre a ação pró ou anti-aterogênica dos produtos da oxidação não-enzimática dos ácidos graxos Omega 3 obtidos tanto a partir da dieta como aqueles produzidos endógenamente. Resultados de investigações

mais recentes têm proposto que alguns produtos formados a partir da oxidação dos ácidos graxos Omega 3 apresentam propriedades biológicas, incluindo efeitos anti-arrítmicos anti-inflamatórios e anti-oxidantes (Roy *et al.*, 2015). Assim, sugerimos que uma condição de estresse oxidativo mais pronunciada poderia ser obtida substituindo ácidos graxos Omega 3 por Omega 6 em nosso modelo.

É importante ressaltar que mesmo observando-se um aumento de outros biomarcadores de estresse oxidativo após a ingestão de ácidos graxos oxidados, independentemente do tipo de ácidos graxos precursores, Omega 6 ou Omega 3, esse fato não representa necessariamente um risco aterogênico. Esta questão já tinha sido levantada em um estudo anterior conduzido em nosso grupo, envolvendo o consumo de óleo de peixe e estresse oxidativo em humanos (Carrepeiro *et al.*, 2011). Por exemplo, Penumetcha *et al.* (2012) alimentou camundongos LDLr<sup>(-/-)</sup> com uma dieta rica em ácidos graxos Omega 6 e observaram um aumento do estresse oxidativo, determinado pela concentração de 8-iso-PG F22, mas negativamente associada à lesão aórtica, sugerindo uma resposta adaptativa, aumentando a defesa antioxidante.

### **O consumo de óleo de linhaça oxidado alterou a morfologia da aorta dos animais?**

As grandes artérias, como a aorta torácica e a carótida comum, sofrem um alargamento quando há uma elevada pressão sanguínea no local. Esse alargamento ocorre devido ao rompimento das fibras de elastina de suporte. Além disso, em indivíduos hipertensos o aumento da pressão arterial está relacionado ao aumento do alargamento do lúmen nessas áreas (Laurent e Boutouyrie, 2015). Em contraste, nas artérias radiais, ocorre uma hipertrofia das camadas íntima e média sem alteração do tamanho do lúmen, pois o crescimento dessas camadas ocorre para fora e não para dentro, como o apresentado nos animais avaliados. A hipertrofia observada da parede vascular pode ser relacionada ao remodelamento da artéria ligado à aterosclerose, que por ação das metaloproteinases ativadas pelas NOXs, estimulam a migração do músculo liso vascular, formando a camada neo-íntima (Wang *et al.*, 2015). Entretanto, mais estudos são necessários para esclarecer o papel do consumo de óleo de linhaça oxidado nesse resultado clínico.

## 9. Conclusões

O consumo crônico de óleo de linhaça contendo ácidos graxos parcialmente oxidados pode promover o estresse oxidativo em camundongos LDLr<sup>(-/-)</sup>, através do aumento das concentração de MDA hepático. Considerando-se a nova tendência para substituir ácidos graxos saturados ou poli-insaturados Omega 6 (pró-inflamatórios) por ácidos graxos anti-inflamatórios Omega 3 (Van Diepen *et al.*, 2013), o nosso estudo evidencia a importância de que a estabilidade de óleos ricos em ácidos graxos Omega 3 seja mantida durante as etapas de processamento e armazenamento. Além disso, a dieta aplicada ao grupo HIGH representa uma alternativa interessante em termos de modelo animal em futuras pesquisas que envolvam antioxidantes sob o contexto da aterosclerose.

## 10. Referências:

- Anvisa. **Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005 REGULAMENTO TÉCNICO PARA ÓLEOS VEGETAIS, GORDURAS VEGETAIS E CREME VEGETAL**. Sanitária, A.-A. N. d. V. Diário Oficial da União; Poder Executivo. RDC 270 2005
- Adibhatla, R. M.; Hatcher, J. F. Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. **Antioxidants & redox signaling**, v. 12, n. 1, p. 125-169, 2010. ISSN 1523-0864.
- Awada, M. et al. Dietary oxidized n-3 PUFA induce oxidative stress and inflammation: role of intestinal absorption of 4-HHE and reactivity in intestinal cells. **J Lipid Res**, v. 53, n. 10, p. 2069-80, Oct 2012. ISSN 0022-2275.
- Bhattacharyya, A. et al. Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 2, p. 329-354, 2014. .
- Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J Biochem Physiol**, v. 37, n. 8, p. 911-7, Aug 1959.
- Blokhina, O.; Virolainen, E.; Fagerstedt, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Ann Bot**, v. 91 Spec No, p. 179-94, Jan 2003. ISSN 0305-7364. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12509339> >.
- Bonaventura, J.; Schroeder, W. A.; Fang, S. Human erythrocyte catalase: an improved method of isolation and a reevaluation of reported properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 150, n. 2, p. 606-617, 1972. ISSN 0003-9861.
- Bordone, L. et al. SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. **Aging cell**, v. 6, n. 6, p. 759-767, 2007. ISSN 1474-9726.
- Botelho, P. B. et al. Effect of echium oil combined with phytosterols on biomarkers of atherosclerosis in LDLr-knockout mice: Echium oil is a potential alternative to marine oils for use in functional foods. **European Journal of Lipid Science and Technology**, 2015. ISSN 1438-9312.
- Botelho, P. B. et al.. Effect of Echium oil compared with marine oils on lipid profile and inhibition of hepatic steatosis in LDLr knockout mice. **Lipids Health Dis**, v. 12, p. 38, 2013. ISSN 1476-511X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23510369> >.
- Botsoglou, N. A. et al. The effects of dietary oregano essential oil and  $\alpha$ -tocopheryl acetate on lipid oxidation in raw and cooked turkey during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 65, n. 3, p. 1193-1200, 11// 2003. ISSN 0309-1740. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174003000299> >.
- Brown, M. S.; Goldstein, J. L. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. **Annu Rev Biochem**, v. 52, p. 223-61, 1983. ISSN 0066-4154
- Carrepeiro, M. M. et al. Effect of n-3 fatty acids and statins on oxidative stress in statin-treated hypercholesterolemic and normocholesterolemic women. **Atherosclerosis**, v. 217, n. 1, p. 171-178, 2011. ISSN 0021-9150.



Chaiyasit, W. et al. Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 47, n. 3, p. 299-317, 2007. ISSN 1040-8398 (Print)

Chakraborty, M. et al. Myeloid cell-specific serine palmitoyltransferase subunit 2 haploinsufficiency reduces murine atherosclerosis. **J Clin Invest**, v. 123, n. 5, p. 2332, May 2013. ISSN 1558-8238.

Chao, P.-M. et al. Oxidized frying oil up-regulates hepatic acyl-CoA oxidase and cytochrome P450 4 A1 genes in rats and activates PPAR $\alpha$ . **The Journal of nutrition**, v. 131, n. 12, p. 3166-3174, 2001. ISSN 0022-3166.

Chaudhry, Z. Z. et al. Streptozotocin is equally diabetogenic whether administered to fed or fasted mice. **Lab Anim**, v. 47, n. 4, p. 257-65, Oct 2013. ISSN 1758-1117. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23760565> >.

Chew, P. et al. Antiatherosclerotic and renoprotective effects of ebselen in the diabetic apolipoprotein E/GPx1-double knockout mouse. **Diabetes**, v. 59, n. 12, p. 3198-207, Dec 2010. ISSN 1939-327X.

Chiang, Y.-F. et al. Dietary oxidised frying oil causes oxidative damage of pancreatic islets and impairment of insulin secretion, effects associated with vitamin E deficiency. **British Journal of Nutrition**, v. 105, n. 09, p. 1311-1319, 2011. ISSN 1475-2662.

CODEX Alimentarius,. **Norma Geral para Aditivos Alimentares (GSFA)–CAC/STAN 192-1995 (última revisão)**.

Cogswell, M. E. et al. Vital Signs: Sodium Intake Among US School-Aged Children—2009–2010. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 63, n. 36, p. 789-797, 2014. ISSN 0149-2195.

Cooper, C. E. et al. Exercise, free radicals and oxidative stress. **Biochemical society transactions**, v. 30, n. 2, p. 280-284, 2002. ISSN 0300-5127.

Coulter, T. P.; Tom, P. C. **Food: the chemistry of its components**. Royal Society of Chemistry Cambridge, UK, 2002.

Couzin-Frankel, J. Massive Trials to Test Inflammation Hypothesis. **Science**, v. 337, n. 6099, p. 1158-1158, 2012. ISSN 0036-8075.

Daniels, S. R.; Greer, F. R.; Nutrition, C. o. Lipid screening and cardiovascular health in childhood. **Pediatrics**, v. 122, n. 1, p. 198-208, Jul 2008. ISSN 1098-4275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18596007> >.

de Godoy, M. F. et al. Cardiovascular mortality and its relation to socioeconomic levels among inhabitants of Sao Jose do Rio Preto, Sao Paulo state, Brazil. **Arq Bras Cardiol**, v. 88, n. 2, p. 200-6, Feb 2007. ISSN 0066-782x.

Deeds, M. C. et al. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. **Lab Anim**, v. 45, n. 3, p. 131-40, Jul 2011. ISSN 1758-1117. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21478271> >.

Del Rio, D.; Stewart, A. J.; Pellegrini, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 15, n. 4, p. 316-328, 8// 2005. ISSN 0939-4753.

Dobarganes, C.; Márquez -Ruiz, G. Oxidized fats in foods. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 6, n. 2, p. 157-163, 2003. ISSN 1363-1950.

Erenel, G.; Erbaş, D.; Arıcıoğlu, A. Free radicals and antioxidant systems. **Mater Med Pol**, v. 25, n. 1, p. 37-43, 1993 Jan-Mar 1993. ISSN 0025-5246.

Ewing, J. F.; Janero, D. R. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. In: (Ed.). **Anal Biochem**. United States, v.232, 1995. p.243-8. ISBN 0003-2697

Fairweather-Tait, S. J. et al. Selenium in human health and disease. **Antioxidants & redox signaling**, v. 14, n. 7, p. 1337-1383, 2011. ISSN 1523-0864.

Fei, J. et al. Atherogenic  $\omega$ -6 Lipids Modulate PPAR-EGR-1 Crosstalk in Vascular Cells. **PPAR research**, v. 2011, 2011. ISSN 1687-4757.

Fischer, J. G. et al. Moderate iron overload enhances lipid peroxidation in livers of rats, but does not affect NF-kappaB activation induced by the peroxisome proliferator, Wy-14,643. **J Nutr**, v. 132, n. 9, p. 2525-31, Sep 2002. ISSN 0022-3166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12221204> >.

Flohe, L.; Gunzler, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 114-21, 1984. ISSN 0076-6879

Flora, S. J. S. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 2, p. 257-281, 2011. ISSN 0891-5849.

Frankel, E. N. **Lipid oxidation**. The Oily Press, 2005. ISBN 0953194981.

Frankel, E.N.. **Lipid oxidation**. Elsevier, 2014. ISBN 085709792X.

Frankel, E. N.; Meyer, A. S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 13, p. 1925-1941, 2000. ISSN 1097-0010.

Gao, L. et al. Novel n-3 fatty acid oxidation products activate Nrf2 by destabilizing the association between Keap1 and Cullin3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 4, p. 2529-2537, 2007. ISSN 0021-9258.

García-Llatas, G. et al. A headspace solid-phase microextraction method of use in monitoring hexanal and pentane during storage: Application to liquid infant foods and powdered infant formulas. **Food chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1078-1086, 2007. ISSN 0308-8146.

Garrel, C.; Fowler, P. A.; Al-Gubory, K. H. Developmental changes in antioxidant enzymatic defences against oxidative stress in sheep placentomes. **Journal of Endocrinology**, v. 205, n. 1, p. 107-116, 2010. ISSN 0022-0795.

Granger, D. N.; Kubes, P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. **J Leukoc Biol**, v. 55, n. 5, p. 662-75, May 1994. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8182345> >.

Gray, J. I. Measurement of lipid oxidation: A review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 55, n. 6, p. 539-546, 1978/06/01 1978. ISSN 0003-021X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF02668066> >.

Grootveld, M. et al. In vivo absorption, metabolism, and urinary excretion of alpha, beta-unsaturated aldehydes in experimental animals. Relevance to the development of cardiovascular diseases by the dietary ingestion of thermally stressed polyunsaturated-rich culinary oils. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 6, p. 1210, 1998.

Haddy, N. et al. IL-6, TNF-alpha and atherosclerosis risk indicators in a healthy family population: the STANISLAS cohort. **Atherosclerosis**, v. 170, n. 2, p. 277-83, Oct 2003. ISSN 0021-9150. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14612208> >.

Hansson, G. K.; Robertson, A. K.; Söderberg-Nauclér, C. Inflammation and atherosclerosis. **Annu Rev Pathol**, v. 1, p. 297-329, 2006. ISSN 1553-4006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18039117> >.

Hasty, A. H. et al. Effects of vitamin E on oxidative stress and atherosclerosis in an obese hyperlipidemic mouse model. **J Nutr Biochem**, v. 18, n. 2, p. 127-33, Feb 2007. ISSN 0955-2863. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16781857> >.

Hatley, M. E. et al. Increased production of 12/15 lipoxygenase eicosanoids accelerates monocyte/endothelial interactions in diabetic db/db mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 28, p. 25369-25375, 2003. ISSN 0021-9258.

Hawkins, M. et al. Contribution of elevated free fatty acid levels to the lack of glucose effectiveness in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 52, n. 11, p. 2748-2758, 2003. ISSN 0012-1797.

Hermans, N. et al. Study of potential systemic oxidative stress animal models for the evaluation of antioxidant activity: status of lipid peroxidation and fat-soluble antioxidants. **J Pharm Pharmacol**, v. 59, n. 1, p. 131-6, Jan 2007. ISSN 0022-3573. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17227630> >.

Heshmati, A.; Mishra, G.; Koupil, I. Childhood and adulthood socio-economic position and hypertensive disorders in pregnancy: the Uppsala Birth Cohort Multigenerational Study. **J Epidemiol Community Health**, May 2013. ISSN 1470-2738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23729327> >.

Holbrook, J. T. et al. Sodium and potassium intake and balance in adults consuming self-selected diets. **Am J Clin Nutr**, v. 40, n. 4, p. 786-93, Oct 1984. ISSN 0002-9165

Hong, Y.-L. et al. Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. **Clinical biochemistry**, v. 33, n. 8, p. 619-625, 2000. ISSN 0009-9120.

Houston, M. C. et al. Nonpharmacologic treatment of dyslipidemia. **Prog Cardiovasc Dis**, v. 52, n. 2, p. 61-94, 2009 Sep-Oct 2009. ISSN 1532-8643. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19732602> >.

Hsu, H.-C.; Lee, Y.-T.; Chen, M.-F. Effects of fish oil and vitamin E on the antioxidant defense system in diet-induced hypercholesterolemic rabbits. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 66, n. 2, p. 99-108, 2001. ISSN 1098-8823.

Huang, X. Iron overload and its association with cancer risk in humans: evidence for iron as a carcinogenic metal. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 533, n. 1, p. 153-171, 2003. ISSN 0027-5107.

Hubbard, A. K.; Rothlein, R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. **Free Radic Biol Med**, v. 28, n. 9, p. 1379-86, May 2000. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10924857> >.

Ibrahim, W. et al. Oxidative stress and antioxidant status in mouse liver: effects of dietary lipid, vitamin E and iron. **The Journal of nutrition**, v. 127, n. 7, p. 1401-1406, 1997. ISSN 0022-3166.

Ishibashi, S. et al. The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 10, p. 4431-5, May 1994. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8183926> >.

Itabe, H. Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of in vivo oxidative stress: from atherosclerosis to periodontitis. **J Clin Biochem Nutr**, v. 51, n. 1, p. 1-8, Jul 2012. ISSN 1880-5086. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22798705> >.

Iwata, H.; Nagai, R. Novel immune signals and atherosclerosis. **Curr Atheroscler Rep**, v. 14, n. 5, p. 484-90, Oct 2012. ISSN 1534-6242. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22864646> >.

Jang, S. S. et al. Melatonin reduces X-ray radiation-induced lung injury in mice by modulating oxidative stress and cytokine expression. **Int J Radiat Biol**, v. 89, n. 2, p. 97-105, Feb 2013. ISSN 1362-3095. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23046278> >.

Jordão, R. E.; Bernardi, J. L. D.; Barros Filho, A. d. A. Prevalência de anemia ferropriva no Brasil: uma revisão sistemática. **Rev Paul Pediatr**, v. 27, n. 1, p. 90-8, 2009.

Jung, U. J. et al. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 38, n. 7, p. 1134-1145, 2006. ISSN 1357-2725.

Kabat, G. C. et al. A cohort study of dietary iron and heme iron intake and risk of colorectal cancer in women. **Br J Cancer**, v. 97, n. 1, p. 118-122, 06/05/online 2007. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6603837> >.

Kahn, S. E.; Hull, R. L.; Utzschneider, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 840-846, 12/14/print 2006. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature05482> >.

Khan-Merchant, N. et al. Oxidized fatty acids promote atherosclerosis only in the presence of dietary cholesterol in low-density lipoprotein receptor knockout mice. **The Journal of nutrition**, v. 132, n. 11, p. 3256-3262, 2002. ISSN 0022-3166.

Keaney, J. F., Jr.; Vita, J. A. Atherosclerosis, oxidative stress, and antioxidant protection in endothelium-derived relaxing factor action. **Prog Cardiovasc Dis**, v. 38, n. 2, p. 129-54, Sep-Oct 1995. ISSN 0033-0620 (Print)

Kennedy, A. et al. Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. **The Journal of nutrition**, v. 139, n. 1, p. 1-4, 2009. ISSN 0022-3166.

Kimura, F. et al. Bottle choice tests for oxidized oil in rats. **Physiology & behavior**, v. 82, n. 5, p. 877-881, 2004. ISSN 0031-9384.

Kleiner, D. E. et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1313-21, Jun 2005. ISSN 0270-9139

Kobayashi, K. et al. The db/db mouse, a model for diabetic dyslipidemia: molecular characterization and effects of Western diet feeding. **Metabolism**, v. 49, n. 1, p. 22-31, 2000. ISSN 0026-0495.

Koch, A. et al. Thermally oxidized oil increases the expression of insulin-induced genes and inhibits activation of sterol regulatory element-binding protein-2 in rat liver. **The Journal of nutrition**, v. 137, n. 9, p. 2018-2023, 2007. ISSN 0022-3166.

Koelsch, C. M.; Downes, T. W.; Labuza, T. P. Hexanal formation via lipid oxidation as a function of oxygen concentration: measurement and kinetics. **Journal of food science**, v. 56, n. 3, p. 816-820, 1991. ISSN 1750-3841.

Koletsky, S. Obese spontaneously hypertensive rats—a model for study of atherosclerosis. **Experimental and molecular pathology**, v. 19, n. 1, p. 53-60, 1973. ISSN 0014-4800.

Krengel, U.; Tornroth-Horsefield, S. Coping with oxidative stress. **Science**, v. 347, n. 6218, p. 125-126, 2015. ISSN 0036-8075.

Kuiper, H. C. et al. Mercapturic acid conjugates of 4-hydroxy-2-nonenal and 4-oxo-2-nonenal metabolites are in vivo markers of oxidative stress. **J Biol Chem**, v. 283, n. 25, p. 17131-8, Jun 20 2008. ISSN 0021-9258 (Print)

Kunitomo, M. et al. Biochemical evidence of atherosclerosis progression mediated by increased oxidative stress in apolipoprotein E-deficient spontaneously hyperlipidemic mice exposed to chronic cigarette smoke. **J Pharmacol Sci**, v. 110, n. 3, p. 354-61, Jul 2009. ISSN 1347-8613.

Kämmerer, I.; Ringseis, R.; Eder, K. Feeding a thermally oxidised fat inhibits atherosclerotic plaque formation in the aortic root of LDL receptor-deficient mice. **British Journal of Nutrition**, v. 105, n. 2, p. 190, 2011. ISSN 0007-1145.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970. ISSN 0028-0836.

Laher, I. et al. Short-term exercise worsens cardiac oxidative stress and fibrosis in 8-month-old db/db mice by depleting cardiac glutathione. **Free Radic Res**, v. 47, n. 1, p. 44-54, Jan 2013. ISSN 1029-2470.

Laurent, S.; Boutouyrie, P. The Structural Factor of Hypertension Large and Small Artery Alterations. **Circulation research**, v. 116, n. 6, p. 1007-1021, 2015. ISSN 0009-7330.

Leino, M. et al. Associations of education with cardiovascular risk factors in young adults: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. **Int J Epidemiol**, v. 28, n. 4, p. 667-75, Aug 1999. ISSN 0300-5771

Leong, X.-F.; Ng, C.-Y.; Jaarin, K. Animal Models in Cardiovascular Research: Hypertension and Atherosclerosis. **BioMed Research International**, 2015. ISSN 2314-6133.

Levitan, I.; Volkov, S.; Subbaiah, P. V. Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology. **Antioxidants & redox signaling**, v. 13, n. 1, p. 39-75, 2010. ISSN 1523-0864.

Li, S. et al. Defective phagocytosis of apoptotic cells by macrophages in atherosclerotic lesions of ob/ob mice and reversal by a fish oil diet. **Circulation research**, v. 105, n. 11, p. 1072-1082, 2009. ISSN 0009-7330.

Libby, P.; Ridker, P. M.; Hansson, G. K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 317-25, May 2011. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21593864> >.

Lim, C. S.; Vaziri, N. D. The effects of iron dextran on the oxidative stress in cardiovascular tissues of rats with chronic renal failure. **Kidney Int**, v. 65, n. 5, p. 1802-1809, 05/print 2004. ISSN 0085-2538.

Lin, C.-c.; Yin, M.-c. Effects of cysteine-containing compounds on biosynthesis of triacylglycerol and cholesterol and anti-oxidative protection in liver from mice consuming a high-fat diet. **British Journal of Nutrition**, v. 99, n. 01, p. 37-43, 2008. ISSN 1475-2662.

Lou-Bonafonte, J. M. et al. Efficacy of bioactive compounds from extra virgin olive oil to modulate atherosclerosis development. **Mol Nutr Food Res**, v. 56, n. 7, p. 1043-57, Jul 2012. ISSN 1613-4133.

Lönn, M. E.; Dennis, J. M.; Stocker, R. Actions of "antioxidants" in the protection against atherosclerosis. **Free Radic Biol Med**, v. 53, n. 4, p. 863-84, Aug 2012. ISSN 1873-4596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22664312> >.

Machlin, L. J.; Bendich, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **FASEB J**, v. 1, n. 6, p. 441-5, Dec 1987. ISSN 0892-6638.

MacMicking, J.; Xie, Q. W.; Nathan, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu Rev Immunol**, v. 15, p. 323-50, 1997.

Majkova, Z. et al. Omega-3 fatty acid oxidation products prevent vascular endothelial cell activation by coplanar polychlorinated biphenyls. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 251, n. 1, p. 41-9, Feb 15 2011. ISSN 0041-008x.

Malta, D. C.; Morais Neto, O. L. d.; Silva Junior, J. B. d. Apresentação do plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis no Brasil, 2011 a 2022. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 4, p. 425-438, 2011. ISSN 1679-4974.

Mathers, C. D.; Loncar, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. **PLoS medicine**, v. 3, n. 11, p. e442, 2006. ISSN 1549-1676.

McDonald, R. E.; Hultin, H. O. Some characteristics of the enzymic lipid peroxidation system in the microsomal fraction of flounder skeletal muscle. **Journal of Food Science**, v. 52, n. 1, p. 15-21, 1987. ISSN 1750-3841.

Melov, S. Animal models of oxidative stress, aging, and therapeutic antioxidant interventions. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 34, n. 11, p. 1395-400, Nov 2002. ISSN 1357-2725.

Moghadasian, M. H. Experimental atherosclerosis: A historical overview. **Life Sciences**, v. 70, n. 8, p. 855-865, 1/11/ 2002. ISSN 0024-3205.

Mojibian, M. et al. Implanted islets in the anterior chamber of the eye are prone to autoimmune attack in a mouse model of diabetes. **Diabetologia**, Aug 11 2013. ISSN 0012-186x.

Monteiro, C. A.; Mondini, L.; Costa, R. B. [Changes in composition and appropriate nutrition of family diet in the metropolitan areas of Brazil (1988-1996)]. **Rev Saude Publica**, v. 34, n. 3, p. 251-8, Jun 2000. ISSN 0034-8910.

Nakamura, I. et al. Detection of early stage atherosclerotic plaques using PET and CT fusion imaging targeting P-selectin in low density lipoprotein receptor-deficient mice. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 433, n. 1, p. 47-51, Mar 2013. ISSN 1090-2104.

Negre-Salvayre, A. et al. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. **British journal of pharmacology**, v. 153, n. 1, p. 6-20, 2008. ISSN 1476-5381.

Nomura, T.; Yamaoka, K. Low-dose gamma-ray irradiation reduces oxidative damage induced by CCl<sub>4</sub> in mouse liver. **Free Radic Biol Med**, v. 27, n. 11-12, p. 1324-33, Dec 1999. ISSN 0891-5849. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10641727> >.

Oikawa, D. et al. A transgenic mouse model for monitoring oxidative stress. **Sci Rep**, v. 2, p. 229, 2012. ISSN 2045-2322.

**OMS. A COMPREHENSIVE GLOBAL MONITORING FRAMEWORK, INCLUDING INDICATORS, AND A SET OF VOLUNTARY GLOBAL TARGETS FOR THE PREVENTION AND CONTROL OF NONCOMMUNICABLE DISEASES 2012.**

Ozkanlar, S.; Akcay, F. Antioxidant vitamins in atherosclerosis--animal experiments and clinical studies. **Adv Clin Exp Med**, v. 21, n. 1, p. 115-23, 2012 Jan-Feb 2012. ISSN 1899-5276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23214308> >.

PAHO/WHO. 2014. Disponível em: < <http://www.paho.org/hq/> >.

Park, H. J. et al. Green tea extract attenuates hepatic steatosis by decreasing adipose lipogenesis and enhancing hepatic antioxidant defenses in ob/ob mice. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 22, n. 4, p. 393-400, 2011. ISSN 0955-2863.

Penumetcha, M. et al. Pretreatment with n-6 PUFA protects against subsequent high fat diet induced atherosclerosis—Potential role of oxidative stress-induced antioxidant defense. **Atherosclerosis**, v. 220, n. 1, p. 53-58, 2012. ISSN 0021-9150.

Peterson, R. G. et al. Zucker diabetic fatty rat as a model for non-insulin-dependent diabetes mellitus. **ILAR Journal**, v. 32, n. 3, p. 16-19, 1990. ISSN 1084-2020.

Peyrou, M. et al. PPARs in liver diseases and cancer: epigenetic regulation by microRNAs. **PPAR research**, v. 2012, 2012. ISSN 1687-4757.

Pouliot, M. et al. Expression and activity of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in agonist-activated human neutrophils. **FASEB J**, v. 12, n. 12, p. 1109-23, Sep 1998.

Praticò, D. Lipid Peroxidation in Mouse Models of Atherosclerosis. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 11, n. 3–4, p. 112-116, 4// 2001. ISSN 1050-1738.

Ramirez-Tortosa, C. et al. Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats. **Free Radic Biol Med**, v. 31, n. 9, p. 1033-7, Nov 2001. ISSN 0891-5849.

Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). **Lancet**, v. 344, n. 8934, p. 1383-9, Nov 1994. ISSN 0140-6736.

Ratheesh, M. et al. Inhibitory effect of *Ruta graveolens* L. on oxidative damage, inflammation and aortic pathology in hypercholesteromic rats. **Exp Toxicol Pathol**, v. 63, n. 3, p. 285-90, Mar 2011. ISSN 1618-1433.

Rayman, M. P. The importance of selenium to human health. **The lancet**, v. 356, n. 9225, p. 233-241, 2000. ISSN 0140-6736.



Rezvan, A. et al. Animal, in vitro, and ex vivo models of flow-dependent atherosclerosis: role of oxidative stress. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, n. 5, p. 1433-48, Sep 2011. ISSN 1557-7716.

Riccioni, G. et al. Carotenoids and vitamins C and E in the prevention of cardiovascular disease. **Int J Vitam Nutr Res**, v. 82, n. 1, p. 15-26, Feb 2012. ISSN 0300-9831.

Rice-Evans, C.; Burdon, R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. **Prog Lipid Res**, v. 32, n. 1, p. 71-110, 1993. ISSN 0163-7827.

Richardson, M. et al. Respiratory infection in lipid-fed rabbits enhances sudanophilia and the expression of VCAM-1. **Am J Pathol**, v. 151, n. 4, p. 1009-17, Oct 1997. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9327734> >.

Ringseis, R.; Muschick, A.; Eder, K. Dietary oxidized fat prevents ethanol-induced triacylglycerol accumulation and increases expression of PPAR $\alpha$  target genes in rat liver. **The Journal of nutrition**, v. 137, n. 1, p. 77-83, 2007. ISSN 0022-3166.

Rocha, V. Z.; Libby, P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. **Nat Rev Cardiol**, v. 6, n. 6, p. 399-409, Jun 2009. ISSN 1759-5010.

Roy, J. et al. Non-enzymatic cyclic oxygenated metabolites of omega-3 polyunsaturated fatty acid: Bioactive drugs? **Biochimie**, 2015. ISSN 0300-9084.

Russell, J. C.; Proctor, S. D. Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. **Cardiovasc Pathol**, v. 15, n. 6, p. 318-30, 2006 Nov-Dec 2006. ISSN 1054-8807.

Sakata, N. et al. Animal models of diabetes mellitus for islet transplantation. **Exp Diabetes Res**, v. 2012, p. 256707, 2012. ISSN 1687-5303.

Sato, K. et al. Dietary cholesterol oxidation products accelerate plaque destabilization and rupture associated with monocyte infiltration/activation via the MCP-1-CCR2 pathway in mouse brachiocephalic arteries: therapeutic effects of ezetimibe. **J Atheroscler Thromb**, v. 19, n. 11, p. 986-98, Nov 2012. ISSN 1880-3873.

Schreyer, S. A. et al. LDL receptor but not apolipoprotein E deficiency increases diet-induced obesity and diabetes in mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 282, n. 1, p. E207-E214, 2002. ISSN 0193-1849.

Sener, G. et al. Chronic nicotine toxicity is prevented by aqueous garlic extract. **Plant Foods Hum Nutr**, v. 60, n. 2, p. 77-86, Jun 2005. ISSN 0921-9668.

Sentman, M. L. et al. Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase. **J Biol Chem**, v. 281, n. 11, p. 6904-9, Mar 2006. ISSN 0021-9258.

Shantha, N. C.; Decker, E. A. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. **J AOAC Int**, v. 77, n. 2, p. 421-4, Mar-Apr 1994. ISSN 1060-3271

Sherwood, E. R.; Toliver-Kinsky, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v. 18, n. 3, p. 385-405, Sep 2004. ISSN 1521-6896.

Shirai, N.; Suzuki, H.; Wada, S. Direct methylation from mouse plasma and from liver and brain homogenates. **Analytical biochemistry**, v. 343, n. 1, p. 48-53, 2005. ISSN 0003-2697.

Spiteller, G. The relation of lipid peroxidation processes with atherogenesis: a new theory on atherogenesis. **Mol Nutr Food Res**, v. 49, n. 11, p. 999-1013, Nov 2005. ISSN 1613-4125. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16270286> >.

Staprans, I. et al. The role of dietary oxidized cholesterol and oxidized fatty acids in the development of atherosclerosis. **Mol Nutr Food Res**, v. 49, n. 11, p. 1075-82, Nov 2005. ISSN 1613-4125

Staprans, I. et al.. Oxidized lipids in the diet are incorporated by the liver into very low density lipoprotein in rats. **Journal of lipid research**, v. 37, n. 2, p. 420-430, 1996. ISSN 0022-2275.

Staprans, I. et al. Oxidized cholesterol in the diet accelerates the development of atherosclerosis in LDL receptor–and apolipoprotein E–deficient mice. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 20, n. 3, p. 708-714, 2000. ISSN 1079-5642.

Staprans, I. et al. Oxidized lipids in the diet are a source of oxidized lipid in chylomicrons of human serum. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 14, n. 12, p. 1900-1905, 1994. ISSN 1079-5642.

Stocker, R.; Keaney, J. F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiol Rev**, v. 84, n. 4, p. 1381-478, Oct 2004. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15383655> >.

Surra, J. C. et al. In comparison with palm oil, dietary nut supplementation delays the progression of atherosclerotic lesions in female apoE-deficient mice. **Br J Nutr**, v. 109, n. 2, p. 202-9, Jan 2013. ISSN 1475-2662. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23302442> >.

Swanson, C. A. Iron intake and regulation: implications for iron deficiency and iron overload. **Alcohol**, v. 30, n. 2, p. 99-102, 6// 2003. ISSN 0741-8329. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0741832903001034> >.

Sülzle, A.; Hirche, F.; Eder, K. Thermally oxidized dietary fat upregulates the expression of target genes of PPAR $\alpha$  in rat liver. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 6, p. 1375-1383, 2004. ISSN 0022-3166.

Tallman, D. L.; Taylor, C. G. Effects of dietary fat and zinc on adiposity, serum leptin and adipose fatty acid composition in C57BL/6J mice. **J Nutr Biochem**, v. 14, n. 1, p. 17-23, Jan 2003. ISSN 0955-2863

Tan, C. P. et al. Application of Arrhenius kinetics to evaluate oxidative stability in vegetable oils by isothermal differential scanning calorimetry. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, n. 11, p. 1133-1138, 2001. ISSN 0003-021X.

Torres, L. L. et al. Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 26, n. 1, p. 59-68, 2011. ISSN 1387-2877.

Uchida, K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. **Progress in lipid research**, v. 42, n. 4, p. 318-343, 2003. ISSN 0163-7827.

Umemoto, T. et al. Inhibition of intestinal cholesterol absorption decreases atherosclerosis but not adipose tissue inflammation. **J Lipid Res**, v. 53, n. 11, p. 2380-9, Nov 2012. ISSN 0022-2275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22956784> >.

USDA. National Nutrient Database for Standard Reference. 2004 Disponível em: < <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods> >.

Van den Bergh, A. et al. Dyslipidaemia in type II diabetic mice does not aggravate contractile impairment but increases ventricular stiffness. **Cardiovascular research**, 2007. ISSN 0008-6363.

Vinchi, F. et al. Atherogenesis and iron: from epidemiology to cellular level. **Frontiers in pharmacology**, v. 5, 2014.

Wang, M. et al. Matrix Metalloproteinases Promote Arterial Remodeling in Aging, Hypertension, and Atherosclerosis. **Hypertension**, v. 65, n. 4, p. 698-703, 2015. ISSN 0194-911X.

Wang, Y.; Krishna, S.; Golledge, J. The calcium chloride-induced rodent model of abdominal aortic aneurysm. **Atherosclerosis**, v. 226, n. 1, p. 29-39, Jan 2013. ISSN 1879-1484. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23044097> >.

Webster, J. L.; Dunford, E. K.; Neal, B. C. A systematic survey of the sodium contents of processed foods. **Am J Clin Nutr**, v. 91, n. 2, p. 413-20, Feb 2010. ISSN 0002-9165.

Wierzbicki, A. S.; Poston, R.; Ferro, A. The lipid and non-lipid effects of statins. **Pharmacol Ther**, v. 99, n. 1, p. 95-112, Jul 2003. ISSN 0163-7258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12804701> >.

World Health, O. **Guideline: Sodium intake for adults and children**. World Health Organization, 2012. ISBN 9241504838.

Xiangdong, L. et al. Animal models for the atherosclerosis research: a review. **Protein Cell**, v. 2, n. 3, p. 189-201, Mar 2011. ISSN 1674-800x.

Yang, J. et al. Hepatoprotective effects of apple polyphenols on CCl<sub>4</sub>-induced acute liver damage in mice. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 10, p. 6525-6531, 2010. ISSN 0021-8561.

Ye, P.; Cheah, I. K.; Halliwell, B. High fat diets and pathology in the guinea pig. Atherosclerosis or liver damage? **Biochim Biophys Acta**, v. 1832, n. 2, p. 355-64, Feb 2013. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23195951> >.

Yu, C. L. et al. Interleukin-13 increases prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) production by normal human polymorphonuclear neutrophils by enhancing cyclooxygenase 2 (COX-2) gene expression. **Inflamm Res**, v. 47, n. 4, p. 167-73, Apr 1998. ISSN 1023-3830. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9628259> >.

Zaina, S.; Lund, G. Epigenetics: a tool to understand diet-related cardiovascular risk? **J Nutrigenet Nutrigenomics**, v. 4, n. 5, p. 261-74, 2011. ISSN 1661-6758. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22353663> >.

Zeng, T. et al. The anti-fatty liver effects of garlic oil on acute ethanol-exposed mice. **Chemico-biological interactions**, v. 176, n. 2, p. 234-242, 2008. ISSN 0009-2797.

Zhang, Y. et al. Mice deficient in both Mn superoxide dismutase and glutathione peroxidase-1 have increased oxidative damage and a greater incidence of pathology but no reduction in longevity. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 64, n. 12, p. 1212-20, Dec 2009. ISSN 1758-535X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19776219> >.

## Anexo 1



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 21.2014-P429

### CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, **CERTIFICA** que o Projeto de Pesquisa "**Avaliação do consumo de lipídios oxidados na indução do estresse oxidativo associado à aterosclerose em modelo animal**" (Protocolo CEUA/FCF/429), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Marina Sayuri Nogueira**, sob orientação do(a) **Profa. Dra. Inar Alves de Castro**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO em reunião de **14 de março de 2014**. Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento deste Projeto de Pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 18 de março de 2014.

**Prof. Dr. Jolison de Oliveira Martins**  
Coordenador da CEUA/FCF/USP