

CYNTHIA APARECIDA DE CASTRO

**LESÃO ATEROSCLERÓTICA, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E
HISTOPATOLOGIA DE CAMUNDONGOS APOE -/- ALIMENTADOS COM
AÇAI (*EUTERPE EDULIS MARTIUS*) E SUBMETIDOS AO TREINAMENTO
FÍSICO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C3551
2011

Castro, Cynthia Aparecida de, 1984-
Lesão aterosclerótica, capacidade antioxidante e
histopatologia de camundongos apoe -/- alimentados com açaí
(*Euterpe Edulis* Martius) e submetidos ao treinamento físico /
Cynthia Aparecida de Castro. – Viçosa, MG, 2011.
xiv, 68f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Maria do Carmo Gouveia Peluzio.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Exercícios físicos. 2. Açaí. 3. Aterosclerose.

I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 613.71

CYNTHIA APARECIDA DE CASTRO

**LESÃO ATEROSCLERÓTICA, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E
HISTOPATOLOGIA DE CAMUNDONGOS APOE -/- ALIMENTADOS COM
AÇAÍ (*EUTERPE EDULIS MARTIUS*) E SUBMETIDOS AO TREINAMENTO
FÍSICO**

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

APROVADA: 17 de março de 2011.



Prof. Maria Lucia Pedrosa



Prof. Antônio José Natali
(Coorientador)



Prof. Maria do Carmo Gouveia Peluzio
(Orientadora)

*Dedico esta dissertação aos meus pais José de Castro e Lizete,
aos meus sobrinhos Lucas e Clarice, em fim a toda minha
maravilhosa família.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo apoio espiritual, saúde, sabedoria e presença constante em minha vida.

A Universidade Federal de Viçosa pela excelência em ensino.

Aos departamentos de Educação Física, Nutrição, Biologia pelo apoio estrutural para que o trabalho fosse concretizado.

Aos meus pais José e Lizete pelo amor, conselhos e ensinamentos de persistência, humildade, paciência e tolerância.

Aos meus irmãos Márcio e Carlos e suas famílias pela compreensão, carinho e refugio.

À minha orientadora Prof^a. Maria do Carmo Gouveia Peluzio, pelos ensinamentos, orientação, paciência e alegria de vida.

Ao professor Natali pelo apoio e principalmente pelo exemplo de dignidade e conduta profissional.

Ao professor João Paulo pela parceria científica estabelecida.

Ao Professor Sergio pela disponibilidade e auxílio as análises.

Ao grupo do Laboratório de Bioquímica Nutricional, pessoas maravilhosas, Damiana, Carol, Tati Fiche, Sandra, Alexandre, Regiane, Toninho, que participaram diariamente deste trabalho.

A amiga e parceira Luciana pelos momentos de alegria e busca de novos conhecimentos e técnicas.

Aos iluminados amigos do Biotério de Experimentação Animal da Educação Física sem citar nomes, porque são muitos: “todos são maravilhosos”.

Aos meus grandes amigos Karina, Ana Lu, Ariana, Thiago, Paulo, Erivelton e em especial Rodrigo. Muito obrigada pelo carinho excepcional, paciência, companheirismo, incentivo, suporte científico em todos estes anos de convivência.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e contribuição científica ao avaliarem este trabalho.

À FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudos.

E a todos, que de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho. OBRIGADA!!!

BIOGRAFIA

Cynthia Aparecida Castro, filha de José Pereira de Castro e Lizete Maria da Silva Castro, nasceu em Lagoa Grande, estado de Minas Gerais, em 17 de março de 1984.

Em março de 2004, ingressou no curso de Educação Física da Universidade Federal de Viçosa, obtendo seu título de graduação em julho de 2008.

Em março de 2009, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Educação Física, do Departamento de Educação Física - Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Aspectos Biodinâmicos do Movimento Humano, submetendo-se à defesa de dissertação, requisito indispensável para obtenção do título de *Magister Scientiae*, em março de 2011.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	ix
RESUMO	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Aterosclerose.....	4
2.2. Estresse oxidativo e Defesas Antioxidantes.....	7
2.3. Antocianinas e Doenças Cardiovasculares.....	9
2.4. <i>Euterpe edulis</i> Martius (Açaí da Mata Atlântica).....	12
2.5. Exercício Físico e Aterosclerose.....	13
2.6. Camundongos knockout para Apolipoproteína E.....	15
2.7. Considerações finais.....	17
2.8. Referências	18
3. OBJETIVOS	25
3.1. Objetivo Geral	25
3.2. Objetivos Específicos.....	25
4. ARTIGO I.....	26
4.1. Introdução	27
4.2. Materiais e Métodos.....	28
4.3. Resultados	34
4.4. Discussão.....	40
4.5. Referências	45
5. ARTIGO II.....	51
5.1. Introdução	52
5.2. Materiais e Métodos.....	53
5.2.1. Dietas	53
5.2.2. Animais	54
5.2.3. Protocolo de exercício/corrída em esteira.....	55
5.2.4. Eutanásia e coleta de tecidos	55
5.2.5. Análise histopatológica.....	55
5.2.6. Análise estatística.....	56
5.3. Resultados	56

5.3.1. Consumo alimentar e evolução ponderal	56
5.3.2. Histopatologia de fígado	58
5.3.3. Histopatologia do rim.	60
5.4. Discussão	61
5.5. Conclusão	62
5.6. Referências	63
6. CONCLUSÃO GERAL	67
7. ANEXO	68
7.1. Anexo 1	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura básica da aglicona antocianidina (fonte: Yi *et al.*, 2010).

Figura 2 - Desenho experimental até 32 semanas.

Figura 3 - Consumo alimentar diário dos grupos experimentais.

Figura 4 - Evolução da massa corporal durante as 12 semanas de experimento.

Figura 5 - Atividade da citrato-sintase em músculo esquelético (sóleo) de ratos treinados e não-treinados.

Figura 6 - Área lesionada total (cm²) das aortas.

Figura 7 - Atividade da enzima SOD (U.mg⁻¹ de proteína) no fígado.

Figura 8 - Evolução da massa corporal durante as 12 semanas de experimento.

Figura 9 - Consumo alimentar diário dos grupos experimentais.

Figura 10 - Efeito da atividade física e do *E. oleraceae* sobre a área histológica de gotículas de gordura (%) no fígado de camundongos knockout Apo E.

Figura 11 - Fotomicrografia representativas no tecido hepático de camundongos ApoE -/-.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das dietas experimentais (g/kg dieta).

Tabela 2. Resultados da prospecção fitoquímica preliminar da polpa de açaí liofilizada.

Tabela 3. Valores de colesterol total, triglicerídeos e HDL dos grupos experimentais.

Tabela 4. Área total da aorta e percentual de área lesionada

Tabela 5. Atividade da enzima catalase (U/mg^{-1} de proteína) no fígado.

Tabela 6. Composição das Dietas experimentais (g/kg dieta).

Tabela 7. Porcentagem de estruturas no fígado.

Tabela 8. Valores do número e área dos glomérulos nos grupos experimentais.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ApoE = apolipoproteína E

C- = grupo com animais C57BL6 com dieta AIN93 e não-treinados

C+ = grupo com animais ApoE-/- com dieta AIN93 e não-treinados

CAT = Catalase

CETP = proteína de transferência do colesterol esterificado

CRP= proteína C reativa

CS = Citrato-sintase (CS)

CT = Colesterol total

ENOs = espécies reativas de nitrogênio

ERNs = espécies reativas de hidrogênio

EROS = espécies reativas de oxigênio

FGFb = fator básico de crescimento de fibroblastos humanos

G1 = grupo com animais ApoE-/- com dieta AIN93 mais açaí e não-treinados

G2 = grupo com animais ApoE-/- com dieta AIN93 mais açaí e treinados

G3 = grupo com animais ApoE-/- com dieta AIN93 mais açaí e treinados

GL = gotícula lipídica

GSH-Px = glutathiona peroxidase

H₂O₂ = peróxido de hidrogênio

HDL= lipoproteína de alta densidade

IDL = lipoproteína de densidade intermediária

IL-6 = interleucina 6

LCAT = enzima hepática lecitina colesterol aciltransferase

LDL = lipoproteína de baixa densidade

LDLox = lipoproteína de baixa densidade oxidada

LDLr =receptor de lipoproteína de baixa densidade

MCP1 = proteína quimiotática para monócitos

M-CSF = fator estimulante de colônias de monócitos

MM-LDL-OX = LDL minimamente oxidada

NF- κ B = fator nuclear kappa B

NO = óxido nítrico

O₂⁻ = ânion superóxido

OH[·] = radical hidroxil

ONO₂[·] = peroxinitrito

PESB = Parque Estadual da Serra do Brigadeiro

SOD = Superóxido dismutase

T1 = grupo com animais ApoE -/- que sofreram eutanasia antes do início dos tratamentos

T2 = grupo com animais C57BL6 que sofreram eutanasia antes do início dos tratamentos

TBARS = ácido tiobarbitúrico

TG = triglicerídeos

TIMP-1 = inibidor do tecido de metaloproteínas 1

VC = veia centrolobular

VEGF = fator de crescimento endotelial humano

VLDL = lipoproteína de muito baixa densidade

RESUMO

CASTRO, Cynthia Aparecida de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2011. **Lesão aterosclerótica, capacidade antioxidante e histopatologia de camundongos apoe -/- alimentados com açaí (*Euterpe edulis* Martius) e submetidos ao treinamento físico.** Orientadora: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Co-orientadores: Antonio José Natali e João Paulo Viana Leite.

A doença arterial aterosclerótica é a maior causa de morte no mundo. A prática de exercício físico e o consumo de alimentos ricos em antioxidantes estão associados a um decréscimo na incidência de eventos cardiovasculares. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de uma dieta a base dos frutos de açaí (*Euterpe edulis*) associada ao treinamento físico, no processo de aterosclerose, na capacidade antioxidante do fígado e na histopatologia do fígado e rim em camundongos adultos *C57BL/6 knockout* para o gene da Apolipoproteína E (apoE-/-). Foram utilizados 28 camundongos (ApoE-/-) e 10 camundongos *C57Bl/6*, com 21 semanas de idade, submetidos a 12 semanas de corrida em esteira (atingindo ao final 60 minutos/sessão/dia, 5 dias/semana e velocidade de 15m/min) e dieta com 2% de açaí. Antes de iniciar o tratamento alguns animais de ambas as linhagens (T1 - 4 camundongos ApoE - / - e T2 - 5 *C57Bl/6*) sofreram eutanásia para avaliação do nível inicial da lesão aterosclerótica. Após este procedimento o restante dos animais foram divididos em 5 grupos: C- Controle negativo – animais *C57Bl/6*, sem 2% de açaí, não-treinado (n=4); C+ Controle positivo – animais ApoE -/- sem 2% de açaí, não-treinado (n=4); G1 animais ApoE -/- com 2% de açaí, não-treinado (n=6); G2 animais ApoE -/- com 2% de açaí, treinados (n=6); G3 animais ApoE -/- sem 2% de açaí, treinados (n=6). Os frutos do açaí foram obtidos no entorno do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB), localizada na região da zona da mata do estado de Minas Gerais. A colheita, pós-colheita e despulpamento dos frutos foram realizados conforme orientações da Embrapa para os frutos do *Euterpe oleracea*, açaí da Amazônia. Após todas as fases, a polpa do fruto do *Euterpe. edulis* foi embalada e liofilizada para utilização na dieta. Na polpa liofilizada foram determinadas também a composição centesimal e uma triagem fitoquímica para as principais classes de metabólitos secundários: flavonóides, cumarinas, taninos, antraquinonas, óleos essenciais, triterpenos/esteróides, saponinas e alcalóides. O peso e o consumo alimentar dos camundongos foram monitorados semanalmente. Ao final do tratamento os animais sofreram

eutanásia, o sangue foi coletado por punção na aorta abdominal e imediatamente centrifugado para obtenção do soro. A artéria aorta foi removida, desde a porção torácica até a abdominal, para análise de lesões ateroscleróticas. O fígado, rins, coração e aorta foram removidos e lavados em solução fisiológica e em seguida, conservados em paraformaldeído 10% para posteriores análises histopatológicas. Um fragmento do fígado foi congelado em nitrogênio líquido e mantido a -80°C até a análise de atividade enzimática da catalase e superóxido dismutase. O fruto liofilizado apresentou 8,45 % de umidade, 5,28% proteína, 49,35% de lipídeos e 42,86% de carboidratos. A triagem fitoquímica do extrato de *E. edulis* foi positiva para a classe de metabólitos como os flavonóides, polifenóis e saponinas, e negativo para alcalóides, esteróides/triterpenos, cumarinas e antraquinonas. Não houve diferença estatística entre os grupos para peso corporal, consumo de dieta e peso do fígado. Considerando o perfil lipídico plasmático, não houve diferença entre os grupos quanto aos valores de colesterol total, triglicerídeos e HDL em relação ao grupo controle positivo (C+). A porcentagem de área lesionada foi menor apenas no grupo G3, comparado com o C+ ($p < 0,05$). A atividade da catalase não foi diferente entre os grupos, mas foi observada menor atividade da SOD nos dois grupos que fizeram atividade física em comparação ao C+ ($p < 0,05$). Os grupos treinados apresentaram menor porcentagem de esteatose no fígado em relação ao C+. No rim, os tratamentos não provocaram alterações no número e área dos glomérulos. Este trabalho sugere que a quantidade de açaí proposta na dieta dos animais não alterou positivamente o processo de aterosclerose neste modelo animal. No entanto, o programa de corrida em esteira foi capaz de provocar redução na área das lesões ateroscleróticas e na atividade da SOD, reduzindo também a deposição de gordura no tecido hepático.

ABSTRACT

CASTRO, Cynthia Aparecida de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, march, 2011. **Atherosclerotic lesions, histopathology and antioxidant capacity of mice ApoE $-/-$ fed with açai (*Euterpe edulis Martius*) and submitted to physical training.** Advisor: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Co-Advisors: José Antonio Natali and João Paulo Viana Leite.

Atherosclerotic arterial disease is the leading cause of death worldwide. The practice of physical exercise and consumption of foods rich in antioxidants are associated with a decrease in the incidence of cardiovascular events. The purpose of this study was to evaluate the effects of a diet based on the açai fruit (*Euterpe edulis*) associated with physical exercise on the process of atherosclerosis, on the antioxidant capacity of the liver, and on the liver and kidney histopathology of adult mice C57BL/6 knockout for the Apolipoprotein E gene (apoE $-/-$). Twenty eight mice (ApoE $-/-$) and 10 C57BL/6 with 21 weeks of age were used and submitted to 12 weeks of moderate exercise (treadmill running reaching 60 minutes/session/day during 5 days/week and speed of 15m/min) and diet with 2% açai. Before starting the treatment some animals of both strains (T1 - 4 mice ApoE $-/-$ and T2 - 5 C57BL / 6) were sacrificed to assess the initial level of atherosclerotic lesions. After this procedure the remaining animals were divided into five groups: C-Negative control – animals C57BL/6 without 2% açai, untrained (n = 4); C + Positive control - animals ApoE $-/-$ without 2% açai, non-trained (n = 4); G1 animals ApoE $-/-$, 2% of açai, untrained (n = 6); G2 animals ApoE $-/-$, 2% of açai trained (n = 6) and G3 animals ApoE $-/-$, 2% without açai, trained (n = 6). The açai fruit were obtained in the vicinity of the Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB), located in the Zona da Mata of Minas Gerais. Harvesting, post-harvest selection of fruit and pulping were performed according to guidelines from Embrapa for *Euterpe oleracea* fruit, Amazon Açai. After these stages, the pulp of the fruit of *Euterpe edulis* was packed and freeze-dried for use in the diet. The freeze-dried pulp was used to determine its chemical composition and to proceed a phytochemical screening to identify the main classes of secondary metabolites such as flavonoids, coumarins, tannins, anthraquinones, essential oils, triterpenes/steroids, saponins and alkaloids. The weight and food intake of the mice were evaluated weekly. At the end of treatment the animals were euthanized, blood was collected by puncturing the abdominal aorta and

immediately centrifuged to obtain the serum. The aorta was removed from the chest to the abdominal portion for the analysis of atherosclerotic lesions. The liver, kidneys, heart and aorta were removed and washed in saline solution, then preserved in 10% paraformaldehyde for further histopathological examinations. A fragment of the liver was frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C until analysis of the catalase and superoxide dismutase enzymatic activities. The dried fruit had 8.45% moisture, 5.28% protein, 49.35% fat and 42.86% carbohydrates. The phytochemical screening of the extract of *E. edulis* was positive for the class of metabolites such as flavonoids, polyphenols and saponins, and negative for alkaloids, steroids / triterpenes, coumarins and anthraquinones. There were no statistical differences between the groups for the body and liver weights and for the food intake. Considering the plasma lipid profile, there were no differences between groups in relation to total cholesterol, triglycerides and HDL compared to positive control group (C+). The percentage of injured area was lower only in G3 compared with C + ($p < 0.05$). The catalase activity was not different between groups, but it was observed a lower SOD activity in both physical activity groups ($p < 0.05$). The trained groups showed a lower percentage of steatosis than C+ group. In the kidney the treatments did not significantly change the number and area of the glomeruli. This study suggests that the quantity of açaí fruit added in the animal's diet did not altered positively the atherosclerotic process in this animal model. However, the treadmill running program was able to promote reductions in the area of atherosclerotic lesions and in SOD activity, also altering fat deposition in liver tissue.

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são as principais causas de morbidade e mortalidade no mundo ocidental, sendo suas principais manifestações decorrentes dos eventos clínicos da aterosclerose, como o infarto, as embolias e os acidentes vasculares cerebrais (Ishigaki *et al.*, 2008).

A aterosclerose é causada por uma inflamação progressiva na parede dos vasos sanguíneos, resultando do acúmulo de lipoproteínas e turbulências hemodinâmicas. Recentemente ela deixou de ser vista apenas como uma patologia decorrente do metabolismo lipídico inadequado, sendo caracterizada como uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial e acomete principalmente, a camada íntima de artérias de médio e grande calibre (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007).

Para o estudo desta doença, têm ocorrido vários avanços com o uso de camundongos geneticamente modificados. Alguns destes animais possuem o gene deletado da apolipoproteína E (ApoE) ou o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLr), desenvolvendo-se, desta forma, lesões ateroscleróticas espontaneamente em muitos locais nas artérias. Em ambos os casos, o desenvolvimento da lesão é acelerado quando os animais são conduzidos a uma dieta com alto teor de gordura saturada (Jackson *et al.*, 2007).

O estresse oxidativo ocupa um local de destaque nas pesquisas com aterosclerose, visto que a modificação oxidativa da lipoproteína de baixa densidade (LDL) é a hipótese mais referendada em ser responsável para o início e a progressão do processo aterosclerótico (Rosenson, 2004). A fim de contrapor a este quadro o organismo humano utiliza-se de mecanismos de defesa antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos, os quais atuam intracelular e extracelularmente para manter o equilíbrio redox das células (Ribeiro *et al.*, 2008).

Muitas condutas como: mudanças no estilo de vida do paciente; medicamentos como antihipertensivos, anticoagulantes, drogas para baixar o colesterol, cirurgia ou angioplastia, são usados para complementar o tratamento da aterosclerose (Toomey *et al.*, 2003). No entanto, em alguns

casos, estes tipos de tratamentos não têm sido efetivos na cura e, até mesmo na prevenção de patologia relacionadas ao sistema cardiovascular.

A prática de exercícios físicos semanais para o condicionamento cardiovascular (Lakka *et al.*, 2001; Maeda *et al.*, 2003; Das, 2004;) e a utilização de dietas com elevado conteúdo de frutas e vegetais (Riboli e Norat, 2003) tem sido usados para prevenir ou reverter a formação de placas ateromatosas nas artérias.

Vários estudos têm sido desenvolvidos para a comprovação dos efeitos benéficos da atividade física aeróbia na redução e prevenção de doenças coronarianas (Meilhac *et al.*, 2001; Cal e Figueiredo, 2002; Maeda *et al.*, 2003). Mesmo quando realizados com baixa frequência, ou seja, 2 a 3 vezes por semana, numa intensidade moderada (40% a 60% do VO₂max), a atividade física tem sido eficaz (Willians *et al.*, 2003).

Cal e Figueiredo (2002) prescreveram caminhadas de 30 minutos por dia para um grupo de indivíduos e verificaram uma redução no risco da ocorrência de doenças cardiovasculares em até 18%. Em um estudo feito com mulheres que pedalarão em um ciclo ergômetro durante 3 meses, 5 vezes por semana, durante 30 minutos a uma intensidade de 80% da frequência cardíaca máxima, também foi verificado efeitos benéficos no sistema cardiovascular (Maeda *et al.*, 2003).

Resultados semelhantes aos anteriores foram constatados em estudos com animais, por exemplo, Napoli *et al.*, (2004), submeteram camundongos *knockout* para o receptor LDL, a 60 minutos de natação, duas vezes ao dia, 5 dias por semana, e verificaram que o exercício protegeu contra os efeitos do excesso de colesterol e outros fatores envolvidos no desenvolvimento da aterosclerose.

Considerando o consumo de alimentos, vários estudos epidemiológicos têm demonstrado a associação inversa entre a utilização de frutas e verduras e o risco de doenças cardiovasculares (Bazzano *et al.*, 2002). Estes alimentos, dentre outras substâncias, como minerais, vitaminas e fibras, contém compostos fenólicos que podem atuar como antioxidantes. Alguns exemplos destes compostos fenólicos são as isoflavonas e os ácidos fenólicos, as catequinas do chá, os ácidos clorogênicos do café, as antocianinas no vinho, os ácidos carnósico e rosmarínico no alecrim e em outras especiarias, dentre outros (Miranda & Mancini-Filho, 1997).

Os frutos de *Euterpe Edulis* Martius também conhecido popularmente como açaí da palmeira juçara ou Açaí da Mata Atlântica, é um exemplo de fruto rico em flavonóides com as antocianinas (Brito *et al.* 2007) Estes frutos apresentam coloração roxa intensa, devido, principalmente, à presença destes pigmentos antociânicos que apresentam uma potente atividade antioxidante.

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que as antocianinas poderiam atenuar o estresse oxidativo envolvido no processo aterosclerótico. Sendo que vários mecanismos podem estar envolvidos nesse processo, como a capacidade das antocianinas em inibir a oxidação do LDL (Chang *et al.*, 2006) e reduzir a injúria oxidativa das células endoteliais vasculares (Yi *et al.* 2010).

Por outro lado, sabe-se que são poucos os estudos que investigaram a relação entre a prática regular de exercícios físicos e o consumo de alimentos ricos em antioxidantes. Ristow *et al.*(2009), avaliaram os efeitos de uma combinação de vitamina C (1000 mg/dia) e vitamina E (400 UI/dia) sobre a sensibilidade à insulina em homens jovens saudáveis pré-treinados ou não, antes e depois de quatro semanas de exercícios físicos. Os resultados mostraram que a suplementação com antioxidantes poderia excluir os efeitos do exercício físico para a promoção da saúde, como também impedir a indução de reguladores moleculares que controlariam a sensibilidade à insulina nos humanos.

Napoli *et al.* (2006), trabalharam com exercício físico moderado e o tratamento com antioxidantes (vitamina C e E) e L-arginina em camundongos knockout para o receptor de LDL, e encontraram que o tratamento combinado reduziu significativamente as lesões ateroscleróticas e diminuiu a ruptura espontânea da placa, prolongando a sobrevivência dos animais em relação as intervenções isoladas.

Diante do exposto, o presente estudo busca auxiliar o esclarecimento da atuação da prática de exercício físico e do uso de um alimento rico em compostos antioxidantes (açaí) na evolução de lesões ateroscleróticas em modelo animal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aterosclerose

Durante os últimos trinta anos houve um declínio razoável da mortalidade por causas cardiovasculares em países desenvolvidos, enquanto a elevação relativamente rápida tem ocorrido em países em desenvolvimento, como no Brasil (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007).

O desenvolvimento destas doenças cardiovasculares é influenciado por diferentes fatores relacionados com a fisiologia, genética, condições ambientais e estresse (Mancini-Filho, 2008). Dentre os fatores de risco estão o hábito de fumar, a pressão sanguínea elevada, a obesidade, o diabetes e também as dislipidemias. Estes se associam de alguma forma, ao estilo de vida e aos hábitos alimentares (Bruckner, 1992) e contribuem para o acúmulo de placas gordurosas na íntima das artérias, resultando na redução do fluxo sanguíneo, caracterizando, assim, o quadro patológico da aterosclerose (Gurr, 1992).

Os estudos desta patologia investigam a hipótese oxidativa há tempos como precursora do processo aterosclerótico. Essa hipótese afirma que a modificação oxidativa da lipoproteína de baixa densidade (LDL) é a característica fundamental para o desenvolvimento da aterosclerose. Assim, de acordo com essa hipótese, a LDL em seu estado nativo não apresenta propriedades aterogênicas, sendo necessária a modificação oxidativa dessa lipoproteína para que ela se torne altamente lesiva ao endotélio vascular (Witztum e Steinberg, 2001).

A disfunção endotelial é considerada o fator inicial na aterogênese e caracteriza-se por uma resposta inflamatória da parede vascular à injúria. Um conjunto de reações celulares e moleculares a diversos agressores, dentre eles o ataque dos radicais livres, a elevação das partículas de LDL no plasma e a presença de LDL oxidada (LDL_{ox}) na parede arterial são responsáveis pelo comprometimento do endotélio (Kovanen e Pentikainen, 2003; Siqueira *et al.*, 2006).

A oxidação da LDL ocorre em pequena proporção ainda na circulação sendo continuada após a entrada da LDL na íntima das artérias, em ambiente pró-oxidante (Kovanen e Pentikainen, 2003). As partículas responsáveis por esta oxidação da LDL são os radicais livres que podem ser as espécies reativas de oxigênio (EROs) e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs). As

EROs incluem o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxil (OH^\cdot) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os representantes principais das ERNs são o óxido nítrico (NO^\cdot) e o peroxinitrito (ONO_2^\cdot) (Singh e Jialal, 2006).

As partículas de LDL difundem-se passivamente através das células endoteliais por transporte vesicular, o qual não requer receptores. Após, elas aderem à parede do vaso por interações entre a apoproteína B, presente na sua estrutura, e os proteoglicanos da matriz subendotelial (Lusis, 2000).

Retidas na íntima, a LDL sofre modificações oxidativas, que parecem ocorrer em dois estágios. O primeiro, antes que os monócitos sejam ativados, resulta na oxidação dos lipídios da LDL, com pequena alteração na apoproteína B, resultando na LDL minimamente oxidada (MM-LDL-OX). A MM-LDL-OX estimula as células endoteliais a produzirem moléculas aterogênicas e pró-inflamatórias, como a proteína quimiotática para monócitos 1 (MCP-1), que promove a quimiotaxia de monócitos e linfócitos T para o espaço subendotelial; moléculas de adesão e o fator estimulante de colônias de monócitos (M-CSF), que ativa a diferenciação de monócitos em macrófagos (Ross, 1999). O segundo estágio de oxidação da LDL, formando a LDL oxidada, ocorre quando monócitos são recrutados para a lesão e convertidos em macrófagos, contribuindo com sua enorme capacidade oxidativa. Nesta fase, os lipídios da LDL são adicionalmente oxidados e a parte protéica também é modificada, impedindo o reconhecimento da lipoproteína pelo receptor de LDL, tornando-a reconhecível apenas pelos receptores *scavengers* (removedores) presentes nos macrófagos e células musculares lisas (Brown e Goldstein, 1990).

Dentro dos macrófagos, a LDLox é degradada, o colesterol livre é esterificado, conferindo às células o aspecto de espuma. O resultado é o grande acúmulo de colesterol e a formação de células espumosas, originando a primeira lesão da aterosclerose: a estria gordurosa (Steinberg, 1997).

Posteriormente, as células musculares lisas começam a migrar da camada média da parede arterial para a íntima ou espaço subendotelial, se proliferam e secretam colágeno, dando origem à lesão intermediária. Nesta fase, o espessamento da íntima provoca o remodelamento, ou seja, uma dilatação da artéria compensatória ao estreitamento do lúmen. Mais uma vez, sob o estímulo da LDLox, entre outros, as células do sistema imune local liberam enzimas, citocinas e fatores de crescimento que podem induzir necrose focal. Ciclos repetidos de acúmulo e ativação de células mononucleares,

migração e proliferação das células musculares lisas com produção de colágeno, levam ao aumento progressivo da lesão, até que se estruture uma capa fibrosa ao redor de um núcleo lipídico e de tecido necrótico, a chamada lesão avançada. (Ross, 1999).

As lesões avançadas estáveis são mais resistentes à ruptura e se caracterizam por células musculares lisas envoltas de densa matriz de colágeno, com baixo conteúdo de células inflamatórias e de lipídios no centro necrótico. Por outro lado, as regiões onde as lesões apresentam volumoso centro necrótico e um grande infiltrado de células espumosas, capa fibrosa frágil e fina, com pouca quantidade de colágeno, são mais susceptíveis à ruptura, caracterizando lesões instáveis (Lee e Libby, 1997).

A ruptura da capa fibrosa expõe material lipídico altamente trombogênico, levando à formação de um trombo sobrejacente. Este processo, também conhecido por aterotrombose, é um dos principais determinantes das manifestações clínicas da aterosclerose (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007).

Como visto, a LDLox participa de todas as etapas do processo de aterosclerose, desde a disfunção endotelial até a promoção da vulnerabilidade das placas ateroscleróticas (Siqueira *et al.*, 2006). Além dos seus efeitos biológicos citados, produtos derivados da LDLox são citotóxicos, podendo promover a apoptose celular. Em adição, a LDLox também contribui para o processo inflamatório na aterosclerose por inibir a produção de óxido nítrico, que é um vasodilatador, e por estimular a produção de citocinas, como a interleucina-1, e aumentar a agregação plaquetária (Singh e Jialal, 2006).

Dentre os mecanismos regulatórios da resposta inflamatória, a via do fator nuclear kappa B (NF- κ B) representa uma via crucial no controle da transcrição de vários genes pró-inflamatórios, cujo envolvimento na patogênese da aterosclerose tem sido documentado, como citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, proteínas de fase aguda, reguladores da apoptose e da proliferação celular (Whinter *et al.*, 2005). A indução à inflamação promovida pela LDLox parece ser decorrente da ativação dessa via pelos seus fosfolipídios oxidados, como a lisolecitina e o ácido lisofosfatídico (Kavanen e Pentikainen, 2003).

A LDLox são também imunogênicas, anticorpos a determinados epitopos (determinantes antigênicos) de LDLox são encontrado no plasma e em lesões

associadas a imuno-complexos. Assim, há tanto uma resposta humoral como imunogênica mediada por células, típico de um processo inflamatório (Witzum, 1994 – citado por Batlouni, 1997).

2.2. Estresse oxidativo e Defesas Antioxidantes

O estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio entre moléculas oxidantes, como os radicais livres, e antioxidantes, em favor dos oxidantes. Nessa situação, os oxidantes podem provocar danos em estruturas celulares, como os ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (Scandalios, 2005).

Radical livre é uma espécie química que tem elétrons desemparelhados, sendo por isso instável e com grande capacidade de reatividade. Outras espécies químicas podem-se formar a partir dos radicais livres, que embora, não tenham elétrons desemparelhados, possuem similar instabilidade estrutural dos radicais livres. Assim, para designar as espécies reativas na forma de radical livre e não radical são utilizados os termos espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ENOs) (Ribeiro *et al.*, 2008).

As espécies reativas são formadas a partir de inúmeras reações no organismo, como parte de seu metabolismo normal. Como exemplos há a formação de íons superóxidos por células de defesa imunológica e a partir do oxigênio molecular (O_2) por meio da respiração mitocondrial, assim como a formação de óxido nítrico como mecanismo de vasodilatação vascular (Madamanchi *et al.*, 2005). Porém condições patológicas como a inflamação e fontes exógenas, como o cigarro, poluentes do ar, radiação, medicamentos e dieta podem aumentar a produção das espécies reativas (Scandalios, 2005).

A ocorrência de um estresse oxidativo moderado, frequentemente é acompanhada do aumento das defesas antioxidantes enzimáticas, mas a produção de uma grande quantidade de radicais livres pode causar danos e morte celular (Anderson, 1996). Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças, incluindo, a aterosclerose.

Os radicais livres, principalmente as substâncias reativas de oxigênio (EROs), parecem ser uma das principais causas da disfunção endotelial que precede e promove a aterogênese. As EROs podem lesar membranas celulares e o núcleo. Interagem com mediadores vasomotores, inativando seus

efeitos vasodilatadores. E, principalmente, são capazes de oxidar os lipídios da LDL, elemento chave na aterosclerose (Aviram *et al.*, 2000).

O organismo humano possui mecanismos de defesa antioxidante, os quais atuam intracelular e extracelularmente e mantêm o equilíbrio redox da célula, assegurando que o aumento das EROs seja transitório. Existem dois mecanismos antioxidantes: o enzimático e o não enzimático, os quais agem cooperativamente para manter o equilíbrio dos radicais livres no organismo (Ribeiro *et al.*, 2008).

O mecanismo de defesa enzimático é a primeira linha de defesa do organismo contra os danos oxidativos. O sistema é constituído por um conjunto de enzimas, tais como a superóxido desmutase, glutathione peroxidases, glutathione reductase, catalase, tioredoxinas, peroxiredoxinas e inúmeras outras redutases (Ribeiro *et al.*, 2008). Já o mecanismo não-enzimático é constituído por um grande número de compostos de baixo peso molecular, ingeridos pela dieta (nutrientes e não-nutrientes) ou sintetizados no organismo, como as vitaminas A, C e E, o peptídeo glutathione e os flavonóides (Singh e Jialal, 2006; Ribeiro *et al.*, 2008).

Basicamente há produção de 3 enzimas atuantes no processo antioxidante. São elas a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX).

A SOD converte radical superóxido em peróxido de hidrogênio, e níveis elevados desta enzima relaciona-se com aumento da função endotelial em condições de hipercolesterolemia e prevenção da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) decorrentes de hiperglicemia (Faraci e Didon, 2004) sendo importante, portanto na prevenção e tratamento da doença aterosclerótica.

A CAT reduz peróxido de hidrogênio à água, catalisando esta reação com taxas extremamente elevada (Cohen *et al.*, 1996), possuindo importante papel na proteção do organismo quando o mesmo encontra-se sob elevado estresse oxidativo.

A GPX, assim como a CAT, reduz peróxido de hidrogênio a água além de reduzir peróxidos lipídicos à álcoois lipídicos. Baixas concentrações de GPX levam a detoxificação ineficiente dos peróxidos lipídicos e de hidrogênio, podendo favorecer a formação de radicais peroxila e hidroxila, respectivamente (Wassmann *et al.*, 2004), fato que contribui para aterogênese.

2.3. Antocianinas e Doenças Cardiovasculares

Os antioxidantes, entre eles os flavonóides como as antocianinas presentes na dieta, têm mostrado apresentar propriedades bioativas que podem potencialmente, estar envolvidas na prevenção da aterosclerose por inibirem a oxidação da LDL, diminuindo sua aterogenicidade e, conseqüentemente, o risco de doença arterial coronariana (Chang *et al.*, 2006; Xia *et al.*, 2009; Beltrán-Debón *et al.*, 2010).

As antocianinas pertencem ao grupo de metabólitos secundários vegetais conhecidos como flavonóides. Sua molécula é formada por uma aglicona denominada antocianidina, que pode estar ligada covalentemente a um grupo de açúcar ou cadeia de açúcares, apresentando freqüentemente substituições acilas, sendo mais comuns os derivados dos ácidos hidroxicinâmicos: ácido *p*-cumarínico, ácido cafeíco e ácido ferúlico.

Entre os açúcares encontrados com maior freqüência ligados covalentemente às antocianidinas estão a glicose, galactose, raminose, arabinose e xilose (Zuanazzi, 2002; Leite, 2008).

Quimicamente, as antocianinas são glicosídeos polihidroxilados e polimetoxilados derivados do cátion 2-fenilbenzopirílio ou cátion flavílio, conforme apresentado na Figura 1.

As antocianinas são pigmentos hidrossolúveis, responsáveis pela cor vermelha de flores, frutos e plantas. Sua cor vermelha pode variar desde a tonalidade alaranjada, passando pelo azul até o roxo (Guedes, 2004).

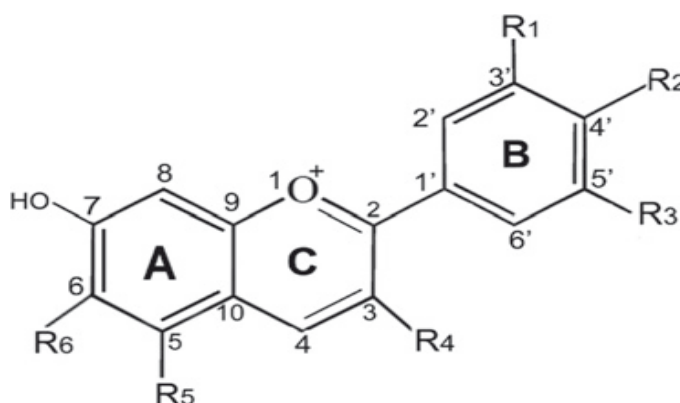


Figura 1- Estrutura básica da aglicona antocianidina (fonte: Yi *et al.*, 2010).

As antocianinas apresentam uma potente atividade antioxidante, sendo essa determinada por sua deficiência de elétrons, o que as tornam altamente

reativas com as espécies reativas de oxigênio (EROs). A deficiência de elétrons também as tornam sensíveis as alterações de pH e temperatura, porém mesmo com essa instabilidade, as antocianinas são consideradas um dos compostos naturais com maior capacidade antioxidante (Galvano *et al.*, 2004).

Os efeitos biológicos antioxidantes das antocianinas dependem da sua estrutura química, tais como grau de glicosilação e números de grupos hidroxilas (Kong *et al.*, 2003). O número de hidroxilas (-OH) total, a presença de hidroxilas nas posições C3' e C4' no anel B e no C3 do anel C parecem ser os principais requisitos estruturais para as antocianinas inibirem a injúria oxidativa das células endoteliais e a atividade intracelular de radicais livre. E a presença de metilações nas posições (C3', C4' e C3) reduzem esses efeitos. Comparando as substituições por diferentes açúcares, as antocianinas que possuem os monossacarídeos glicose e galactose apresentam benefícios antioxidantes superiores com relação as que contêm dissacarídeos (Yi *et al.* 2010).

Ling (2008) investigou o efeito da suplementação de antocianina nos níveis séricos de lipídeos, da proteína de transferência do colesterol esterificado no plasma (CETP), da enzima hepática lecitina colesterol aciltransferase (LCAT) e na capacidade de efluxo do colesterol do soro em 60 indivíduos (40-65 anos) com dislipidemia. Parte dos indivíduos recebeu cápsulas com antocianina (80mg x 4/dia) e o restante consumiu placebo por 12 semanas. A suplementação com antocianina diminuiu significativamente os níveis de LDL (13,63%, p 0,037) e aumentou as concentrações de HDL (12,42%, p 0,024). A massa e a atividade da CETP no plasma diminuíram significativamente em 14,34% e 5,13%, respectivamente; não havendo mudança significativa nos níveis séricos de LCAT no grupo que recebeu as cápsulas de antocianina. O efluxo de colesterol do soro aumentou em 12,09% (p 0,040) após o consumo de antocianina, comparado com o grupo que recebeu placebo. Não houve diferença significativa nas concentrações séricas de colesterol total, triglicerídeos, glicose, apoproteína AI e apoproteína B e ácidos graxos livres entre os grupos.

A angiogênese pode estar envolvida no processo de formação de placas de gordura na aterosclerose. Assim, o efeito da antocianina (240mg/dia) da espécie *Aromia melanocarpa* foi avaliado em marcadores pró e

antiangiogênicos em indivíduos hipercolesterolêmicos, por um mês (Kowalczyk *et al.*, 2006). Após 30 dias de administração de antocianina houve um decréscimo significativo no fator de crescimento endotelial humano (VEGF) e no fator básico de crescimento de fibroblastos humanos (FGFb) e um aumento nas concentrações do inibidor do tecido de metaloproteínas 1 (TIMP-1). Estes dados sugerem que as antocianinas podem favorecer o aumento de fatores antiangiogênicos, e assim, diminuir o risco da aterosclerose.

O aumento da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), que ocorre, por exemplo, na hipercolesterolemia, contribui para a progressão da aterosclerose por modificação oxidativa da LDL e por promover um aumento da disfunção endotelial em resposta a inflamação vascular. Neste sentido, Kopff *et al.* (2006) avaliaram a influência de 240mg/dia de antocianina no balanço oxidativo-antioxidativo em pacientes com hipercolesterolemia. Após 30 dias de administração de antocianina foram analisadas nas células vermelhas do sangue as substâncias reativas produzidas e quantificadas pela reação com ácido tiobarbitúrico (TBARS) e também avaliadas a atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. No plasma foram avaliadas as concentrações de vitaminas E e C. Não houve mudanças nas concentrações de TBARS, enquanto a atividade das enzimas antioxidantes e as concentrações das vitaminas E e C tiveram um aumento significativo, indicando que as antocianinas podem ter um papel protetor no processo de aterosclerose.

Silva *et al.* (2000) avaliaram a ação da antocianina na dose de 40 e 80mg em ratos Wistar com hiperlipidemia induzida por Triton e obtiveram como resultado uma diminuição significativa de 31,6% ($p < 0,05$) nos níveis séricos de colesterol total com o uso da antocianina misturada à dieta dos animais.

Oliveira *et al.* (2002) estudaram o efeito da biochanina A isolada e em associação com os corantes naturais antocianina e carmim sobre o metabolismo lipídico de ratos Wistar com hiperlipidemia induzida por Triton. Todas as substâncias foram testadas na dose de 5mg/Kg de peso corporal. O tratamento com antocianina reduziu significativamente ($p < 0,05$) os níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos em 42,93% e 37,12%, respectivamente, comparado ao grupo de animais hiperlipidêmicos. Os melhores resultados foram alcançados com a associação biochanina A e antocianina, a qual reduziu em 64,85% e 76,10% os níveis de colesterol total e

triglicerídeos, respectivamente, indicando um efeito sinérgico destes flavonóides.

A associação de rutina e antocianina, administradas em duas doses intercaladas, cada uma com 5mg de cada flavonóide/Kg de peso corporal, em ratos Wistar hiperlipidêmicos mostrou uma redução significativa de 72,91% do colesterol hepático (Oliveira *et al.*, 2000).

Estes dados sugerem que o consumo de frutas e vegetais com altos teores de antocianinas pode melhorar o perfil lipídico de homens e animais com dislipidemia, e conseqüentemente, reduzir o risco de desenvolvimento da aterosclerose.

2.4. ***Euterpe edulis* Martius (Açaí da Mata Atlântica)**

A No Brasil, várias palmeiras produzem palmito comestível. Entre elas, a espécie mais conhecida e apreciada é a *Euterpe edulis* Martius, da família Arecaceae, comumente chamada de palmeira juçara ou jicara, pertencente ao mesmo gênero botânico do açazeiro da Amazônia (*Euterpe oleracea* Martius). É encontrada principalmente em áreas remanescentes de Mata Atlântica do Brasil, inclusive no estado de Minas Gerais (Lin, 1988).

A *E. edulis* é uma das espécies mais explorados na Mata Atlântica (Reis, 1996). A exploração ilegal e acelerada do seu palmito contribui para a degradação do meio ambiente e tornou-se um fator de preocupação para a preservação da espécie, uma vez que não há rebrota após o corte para a extração do palmito (Ferri e Cavalcanti, 1997).

Outro produto interessante e pouco estudado do *E. edulis*. pode ser obtido do seu fruto. O fruto desse palmito, também conhecido popularmente como açaí da Mata Atlântica, pode ser consumido de diversas formas, como suco de fruta, sorvete, açaí na tigela, sobremesas, shakes, em preparações salgadas, etc. Para a coleta deste fruto, ao contrário do palmito, não é necessário o corte da palmeira, porém também é interessante que seja realizado um programa de manejo sustentável para sua exploração.

Brito *et al.* (2007) analisaram o conteúdo de antocianina de alguns frutos tropicais, como a acerola (*Malpighia emarginata*), juçara (*Euterpe edulis*), jambolão (*Syzygium cumini*) e guajiru (*Chrysobalanus icaco*). A maior quantidade de antocianina foi encontrada na juçara (290mg de antocianina/100g de peso fresco), seguido pelo guajiru (104mg de

antocianina/100g de peso fresco), jambolão (79mg de antocianina/100g de peso fresco), clone de acerola II47/1 (48mg de antocianina/100g de peso fresco) e acerola roxinha (23mg de antocianina/100g de peso fresco). Neste trabalho também foram analisados os tipos de antocianinas mais significativos da juçara, encontrando a cianidina-3-glicosídeo (1358mg/100g de peso seco) e a cianidina-3-rutinosídeo (1565mg/100g de peso seco).

Similar aos resultados da juçara, os frutos de *E. oleraceae* também apresentaram a cianidina-3-glicosídeo e a cianidina-3-rutinosídeo como as antocianinas presentes em maior quantidade (Lichtenthaler *et al.*, 2005; Schauss *et al.*, 2006; Rosso *et al.* (2008) embora, (Pozo-Insfran *et al.* 2004) tenham encontrado a cianidina-3-glicosídeo e a perlagoidina-3-glicosídeo como as antocianinas majoritárias nessa espécie.

O conhecimento fitoquímico, nutricional e ação no organismo dos frutos da juçara, é ainda muito limitado, sendo estes pontos importantes para a determinação do potencial nutricional e biológico deste fruto e da sua possibilidade de ser considerado um alimento antioxidante.

2.5. Exercício Físico e Aterosclerose

O processo oxidativo envolvendo a LDL é uma das hipóteses mais aceitas para o início da aterogênese, dessa forma é necessário a compreensão dos efeitos do exercício físico neste mecanismo.

Grande parte do oxigênio consumido pelos indivíduos é utilizado no processo de respiração celular na mitocôndria para produção de energia em forma de ATP (adenosina trifosfato). Porém, estima-se que para cada 25 moléculas de oxigênio consumidas durante a respiração normal, um radical livre é produzido (Chance *et al.*, 1979). Alguns estudos demonstraram que existe relação entre o aumento do consumo de oxigênio durante o exercício e a produção de radicais livres (Todoro *et al.*, 2010).

Em um estudo em que 10 homens saudáveis e bem condicionados, exercitaram aerobicamente numa intensidade leve (caminhada 55% da frequência cardíaca de reserva), sem exaustão, durante seis horas e por dois dias consecutivos demonstrou-se que houve diminuição da concentração plasmática da LDL oxidada (Vuorimaa *et al.*, 2005), demonstrando que o exercício físico de intensidade leve e longa duração poderá suprimir as cargas

de estresse oxidativo de maneira aguda, podendo também se relacionar inversamente com o processo aterogênico.

Meilhac *et al.*, (2001), em seu estudo com camundongos *Knockout* para o receptor LDL, que faziam esteira 5 vezes por semana, 30 minutos por dia a uma velocidade de 15 m/minuto, verificou resultados semelhantes ao estudo com humanos, onde foi atenuado o processo aterogênico nas artérias. Da mesma maneira, estudos em indivíduos com doença coronariana têm mostrado que o treinamento aeróbio junto com dieta específica para o tratamento desta doença e outras alterações dos fatores de risco ajudam na prevenção da progressão da placa ou reduzem a gravidade da aterosclerose nas coronárias (Lakka *et al.*, 2001; Matsudo *et al.*, 2006).

Em estudos com animais, Shimada *et al.* (2007) demonstraram que a atividade física aeróbica (natação), diminuiu a severidade da lesão aterosclerótica em camundongos *knockout* para apo E submetidos à uma dieta hiperlipídica. Além disso, Napoli *et al.* (2006) realizaram experimento com camundongos deficientes para o receptor de LDL e verificaram que a atividade física aeróbica progressiva (natação) além de atenuar a lesão aterosclerótica, aumentou o tempo de vida dos animais submetidos à dieta hiperlipídica. Ramachadran *et al.* (2005), demonstraram que o exercício aeróbico de moderada intensidade (corrida forçada em esteira, 5 vezes por semana, 30 minutos por dia à 15 m/min) reduziu a lesão aterosclerótica quando comparado ao grupo controle (sem exercício), em camundongos *knockout* para o receptor de LDL, previamente acometidos com aterosclerose demonstrando, assim, a possibilidade do exercício não somente prevenir a aterosclerose como também reduzi-la.

Por outro lado, estudos demonstraram que o exercício físico não diminuiu a evolução do processo aterosclerótico. Wilians *et al.* (2003) mostraram que 34 meses de exercício aeróbico em macacos não impediu a progressão da lesão aterosclerótica, apesar de melhoria na função cardíaca, tais como diminuição da frequência cardíaca de repouso, melhora do volume de ejeção mensurado por ecocardiografia e na dilatação dos vasos em resposta a fenilefrina em relação aos animais que não se exercitaram.

Dessa maneira, o exercício aeróbico parece atuar na prevenção e tratamento da lesão aterosclerótica, provocando adaptações benéficas no sistema de defesa antioxidante. A intensidade da atividade física mais testada

tanto em humanos quanto em animais é a moderada, havendo, porém algumas evidências que exercícios aeróbicos de intensidade alta, de maneira aguda, aumentam a chance de eventos cardiovasculares. Assim, o efeito crônico dessas atividades sob os danos celulares induzidos pelas ROS não está claro, sendo necessários mais estudos, para melhor elucidar o papel do exercício físico aeróbico na aterosclerose.

2.6. Camundongos knockout para Apolipoproteína E

Devido às grandes dificuldades em estudar os mecanismos patogênicos da aterosclerose em humanos, torna-se fundamental a presença de um modelo experimental bem caracterizado para esta patologia. Os camundongos são naturalmente resistentes ao desenvolvimento da aterosclerose. Estes animais transportam a maior parte do colesterol em HDL e possuem baixos níveis de colesterol em VLDL e LDL (Plump *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1992; Breslow, 1996; Hofker *et al.*, 1998; Neuzil *et al.*, 1998). Apesar desta diferença, camundongos e seres humanos possuem, com poucas exceções, o mesmo conjunto de genes que controlam o metabolismo de lipoproteínas (Hofker *et al.*, 1998).

O gene da apoproteína E (Apo E) é um dos principais genes determinantes dos níveis de lípidios no plasma de seres humanos e camundongos (Hofker *et al.*, 1998). A Apo E, uma glicoproteína rica em arginina com 34 Kda e 299 aminoácidos, é componente estrutural da superfície de QM, QMr, VLDL, IDL e HDL (Marinetti, 1990; Plump *et al.*, 1992; Van Ree *et al.*, 1994). Apo E é sintetizada no fígado, cérebro, intestino, tecidos periféricos e em outras células, inclusive macrófagos (Zhang *et al.*, 1992; Mazzone, 1996). A sua função é servir como ligante das lipoproteínas nos receptores de Apo E (receptores de remanescentes) do fígado ou nos receptores B/E do fígado e tecidos periféricos (Marinetti, 1990; Alvarez-Leite, 1995).

Em seres humanos existem 3 alelos para Apo-E: E2, E3 e E4. A forma mais comum de dislipidemia do tipo III, doença que cursa com elevação moderada da colesterolemia e da trigliceridemia, é causada pela homozigose para o alelo E2 e está associada ao acúmulo de remanescentes de quilomicrons e VLDL no plasma. Os pacientes apresentam com frequência: xantelasma, xantomias tubero-eruptivos e doença coronariana aterosclerótica (Van Ree *et al.*, 1994; Quintão e Nakandakare, 1997).

Os camundongos modificados geneticamente são gerados por modulação gênica, onde ocorre a deleção de um alelo específico responsável por codificar uma proteína com alto grau de especificidade. Esses animais são comumente referidos pelo termo coloquial de *Knockout*, sendo simbolizados por *-/-*. Os camundongos mais utilizados para o estudo da aterosclerose são gerados pela modulação genética da apoE e do LDLr, ambos fundamentais para o metabolismo lipídico (Daugherty, 2002). A deficiência de Apo E resulta em níveis de colesterol elevados devido à remoção defeituosa das lipoproteínas remanescentes. Logo, o acúmulo de remanescentes de QM e VLDL no plasma constitui o estímulo aterogênico nestes animais (Breslow, 1996).

Os animais deficientes em Apo E possuem colesterol plasmático cerca de cinco vezes mais alto do que os normais e desenvolvem estrias gordurosas na aorta proximal aos três meses de idade (Zhang *et al.*, 1992). As lesões são exarcebadas pelo consumo de "dietas ocidentais" ou aterogênicas, ricas em gorduras e colesterol (Breslow, 1996).

Segundo Neuzil *et al.* (1998) existe uma semelhança surpreendente na composição lipídica de VLDL extraída do plasma de camundongos deficientes em Apo E e aquela extraída de placas humanas avançadas. Este fato reforça a validade do modelo deficiente em Apo E para o estudo experimental da aterosclerose.

Quando os camundongos deficientes em Apo E são alimentados com dieta comercial ou dieta aterogênica podemos observar diferenças no desenvolvimento da lesão aterosclerótica. Analisando detalhes da gênese das lesões, incluindo a natureza das células envolvidas, a seqüência de eventos celulares e a anatomia dos diferentes tipos de lesão, nota-se que o desenvolvimento da lesão nestes animais inicia-se preferencialmente na raiz da aorta e na curvatura menor do arco aórtico, continuando nos ramos da artéria braquiocefálica, carótida comum direita, ramos da artéria mesentérica superior e renal, artéria pulmonar e principais ramos da aorta abdominal (Nakashima *et al.*, 1994)

Nos animais alimentados com dieta comercial as lesões aparecem como nódulos amarelados com 10 semanas (células espumosas), porém, com 8 semanas a adesão de células mononucleares e a formação esporádica de células espumosas pode ser notada. A placa fibrosa aparece com 20 semanas

de vida e em alguns casos com até 30 semanas de vida ainda predominam as células espumosas.

Nos animais alimentados com dieta aterogênica as células espumosas aparecem com 8 semanas de idade e com 15 semanas a lesão já progrediu para placa fibrosa. Com 20 a 40 semanas a lesão avançada pode ser observada com um grande centro necrótico e grande quantidade de tecido fibroso (Nakashima *et al.*, 1994; Reddick *et al.*, 1994).

Dessa forma os camundongos deficientes em Apo E contêm o espectro inteiro de lesões similares às observadas durante a aterogênese humana, tornando-se um modelo importante para o estudo dos vários fatores que controlam ou influenciam o desenvolvimento da placa aterosclerótica, além das facilidades para manejo devido ao tamanho pequeno do animal, uso de dieta normal e curto período de reprodução.

2.7. Considerações finais

De maneira geral, dentre as inúmeras intervenções empregadas para a doença aterosclerótica, a alimentação e a prática de exercício físico despontam como uma importante ferramenta na prevenção, manutenção, e/ou recuperação desta doença.

O uso de alimentos ricos em flavonóides, que apresentam um grande potencial antioxidante é freqüente. A questão a ser levantada é o pouco número de estudos com o uso do açaí da Mata Atlântica como fonte destes compostos antioxidantes. Já em relação ao exercício físico a questão é a indicação da intensidade e duração do esforço. Ainda não há consenso qual intensidade levaria a melhores resultados no processo aterosclerótico. Menores ainda são os relatos de estudos que usam a conjunção destes dois fatores no processo aterosclerótico.

Portanto, a expansão dos conhecimentos sobre os diferentes fatores relacionados à aterosclerose é necessária. E saber qual a relação existente entre a prática de exercício físico regular e o consumo destes alimentos com potencial antioxidante torna-se indispensável, tanto em humanos quanto em modelos animais, para melhor elucidar o papel destes na aterosclerose.

2.8. Referências

- ALVAREZ-LEITE, J.I. Lipoproteínas e transporte de lipídeos no organismo. In: Vieira, E.C.; Figueiredo, E.A. Alvarez-Leite, J.I.; Gomes, M.V. *Química fisiológica*. 2ª ed., São Paulo: Atheneu, p.17-31, 1995.
- ANDERSON, D. Antioxidant defenses against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 350, n.1, p.103-108, 1996.
- AVIRAM, L.; DORNFELD, L.; ROSENBLAT, M.; VOLKOVA, N.; KAPLAN, M.; COLEMAN, R. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and plaquet aggregation: studies in human and in atherosclerotic apolipoprotein E- deficient mice. *Am J Clin Nutr.*,v. 71, n. 5, p. 1062-1076, 2000.
- AVIRAM, M.; KENT, U. M.; HOLLENBERG, P. F. Microsomal cytochromes P450 catalyze the oxidation of low density lipoprotein. *Atherosclerosis*, v. 143, n. 2, p. 253-260, 1999.
- BATLOUNI, M. Hipótese oxidativa da aterosclerose e emprego de antioxidantes na doença arterial coronária. *Arq. Bras. Cardiol.*, v.68, nº 1, p. 55-63, 1997.
- BAZZANO, L.A.; HE, J.; OGDEN, L.G.; LORIA, C.M.; VAPPUTURI, S.; MYERS, L.; WHELTON, P.K. Fruit and vegetable and risk or cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition examination survey epidemiologic follow-up study. *American Journal Clinical Nutrition*, v.76, p. 93-99, 2002.
- BELTRAN-DEBÓN, R.; ALONSO-VILLAVERDE, C.; ARAGONÉS, G.; RODRIGUEZ-MEDINA, I.; RULL, A.; MICOL, V.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNANDEZ-GUTIERREZ, A.; CAMPS, J.; JOVEN, J. The aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* calices modulates the production of monocyte chemo attractant protein-1 in humans. *Phytomedicine*, v.17, p.186–191, 2010.
- BOBBIO, F.O.; DRUZIAN, J.I.; ABRÃO, P.A.; FADELLI, S.; BOBBIO, P.A. Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 20, p. 388-390, 2000.
- BRESLOW, J. L. Mouse models of atherosclerosis. *Science*. v. 272, p. 685-688, 1996.
- BRITO, E.S.; ARAUJO, M.C.P.; ALVES, R.E.; CARKEET, C.; CLEVIDENCE, B.A.; NOVOTNY, J.A. Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits: Acerola, Jambolão, Jussara, and Guajiru. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 55, n. 23, 2007.
- BROWN MS, GOLDSTEIN JL - Scavenging for receptors. *Nature*; v.343, p. 508-09, 1990.
- BRUCKNER, G. Fatty acids and cardiovascular disease. In: *Fatty acids in foods and their health implications*. Chow, C., K: Marcel Dekker, 590p, 1992.

CAL, R. G. R.; FIGUEIREDO, L. F. Poli de. Tipo e intensidade de exercício em relação a doença coronariana. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v. 48 n. 4, p. 275-96, 2002.

CHANG, Y.C.; HUANG, K.X.; HUANG, A.C.; HO, Y.C.; WANG, C.J. Hibiscus anthocyanins-rich extract inhibited LDL oxidation and oxLDL-mediated macrophages apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*, v. 44, p. 1015–1023, 2006.

CHANGE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiology Review*. v. 59, p. 527–605, 1979.

COHEN G, KIM M, OGWU V. A modified catalase assay suitable for a plate reader and for analysis of brain cell cultures. *J Neurosci Methods*. v.67, p. 53-56, 1996.

DAS, U. N. Anti-Inflammatory Nature of Exercise. *Nutrition*, v. 20, p. 323–326, 2004.

DAUGHERTY, A. Mouse models of atherosclerosis. *American Journal of the Medical Sciences*, v. 323, p.3-10, 2002.

FARACI FM, DIDON SP. Vascular Protection: superoxide dismutase isoforms in vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. v. 24, p.1367-1373, 2004.

FERRI, C. P.; CAVALCANTE, A. S. L. Pupunha para palmito. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária e Abastecimento*. Rio Branco, p.30, 1997.

GALVANO, F.; FAUCI, L.L.; LAZZARINO, G.; FOGLIANO, V.; RITIENIA, A.; CIAPPELLANO, S.; BATTISTINI, N.C.; TAVAZZI, B.; GALVANO, G. Cyanidins: metabolism and biological properties. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.15, p. 2–11, 2004.

GUEDES, M.C. Antocianinas: pigmento natural ou remédio? Editorial da *Revista Científica do Instituto Manchester Paulista de Ensino Superior (IMAPES)*, Sorocaba, São Paulo, Brasil, p. 71-73, 2004.

GUUR. M.I. Role of fats in food and nutrition. *Elsevier Applied Science*, p. 207p, 1992.

HASSAN, W.; FAWZY, M. Moving? With Coronary Artery Disease: Just Keep on Fitness and Quality of Life in Older Women Exercise Training Improves Overall Physical. *Chest Journal*, v. 126, p. 1009 – 1010, 2004.

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

ISHIGAKI, Y.; KATAGIRI, H.; GAO, J.; YAMADA, T.; IMAI, J.; UNO, K.; HASEGAWA, Y.; KANEKO, K.; OGIHARA, T.; ISHIHARA, H.; SATO, Y.; TAKIKAWA, K.; NISHIMICHI, N.; MATSUDA, H.; SAWAMURA, T.; OKA, Y. Impact of plasma oxidized low-density lipoprotein removal on atherosclerosis. *Circulation*, v. 118, n. 1, p. 75-83, 2008.

JACKSON, C. L.; BENNETT, M. R.; BIESSEN, E.A.L.; JOHNSON, J. L.; ROB KRAMS, R. Assessment of Unstable Atherosclerosis in Mice. *American Heart Association*, v. 27, n. 4, p. 714-720, 2007.

JORGE, P. A. Endotélio, lípidos e aterosclerose. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 68, nº2, p. 129-134, 1997.

KONG, J., CHIA, L., GOH, N., CHIA, T., BROUILLARD, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, v. 64, p. 923–933, 2003.

KOPFF, A.; KOWALCZYK, E.; KOPFF, M.; BLASZCZYK, J. The effect of anthocyanins on oxidative-antioxidative balance hipercholesterolaemic patients. *XIV International Symposium on Atherosclerosis*, Rome, Italy, June, 18-22, 2006.

KOVANEN, P.T.; PENTIKAINEN, M.O. Circulating lipoproteins as proinflammatory and anti-inflammatory particles in atherogenesis. *Curr Opin Lipidol*, v. 14, p. 411-419, 2003.

KOWALCZYK, E.; KOPFF, A.; BLASZCZYK, J. The influence of anthocyanins on the selected pro and antiangiogenic factors in hipercholesterolemia. *XIV International Symposium on Atherosclerosis*, Rome, Italy, June, p. 18-22, 2006.

LAKKA, T. A.; LAUKKANEN, J.A.; RAURAMAA, R.; SALONEN, R.; LAKKA, H.-M.; KAPLAN, G. A.; SALONEN, J. T. Cardiorespiratory Fitness and the Progression of Carotid Atherosclerosis in Middle-Aged Men. *Annals of Internal Medicine*. v.134, n. 1, 2001.

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

LEITE, J.P.V. Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas. *São Paulo: Atheneu*, 2008. 328p.

LICHTENTHALER, R.; RODRIGUES, R. B.; MAIA, J. G.; PAPAGIANNOPOULOS, M.; FABRICIUS, H.; Marx, F. Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) fruits. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, v. 56, p. 53–64, 2005.

LIN, S.S. Efeito no tamanho e maturidade sobre a viabilidade, germinação e vigor do fruto de Palmiteiro. *Revista Brasileira de Sementes*, vol. 8, n. 1, p. 57-66, 1988.

LING, W. Anthocyanin supplementation improved serum ldl-c, hdl-c levels and enhanced capacity of cellular cholesterol efflux to serum in dyslipidemic subjects. *Journal of Clinical Lipidology*, v. 2, n. 5S, 2008.

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

MADAMANCHI, N.R.; VENDROV, A.; RUNGE, M.S. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, v.25, n.29-38, 2005.

MAEDA, S.; TANABE, T.; MIYAUCHI, T.; OTSUKI, T.; SUGAWARA, J.; IEMITSU, M.; KUNO, S.; AJISAKA, R.; YAMAGUCHI, I.; MATSUDA, M.

Aerobic exercise training reduces plasma endothelin-1 concentration in older women. *J Appl Physiol*, v. 95 p. 336–341, 2003.

MANCINI-FILHO, J. Alimentos funcionais nas doenças cardiovasculares. In: *Alimentos funcionais*. Viçosa: COSTA, N.M.B.; ROSA, C.O.B (Ed.), p. 202, 2006.

MARINETTI, G. V. Disorders of lipid metabolism: dislipoproteinemias. In: *Disorders of Lipid Metabolism*. Plenum Press, New York, p. 75-120, 1990.

MATSUDO, S. M. Atividade física na promoção da saúde e qualidade de vida no envelhecimento. *Rev. bras. Educ. Fís. Esp.*, v.20, p.135-37, 2006.

MAZZONE, T. Apolipoprotein E secretion by macrophages: its potential physiological functions. *Curr. Opin. Lip.* v.7, p. 303-307, 1996.

MEILHAC, O.; RAMACHANDRAN, S.; CHIANG, K.; SANTANAM, N.; PARTHASARATHY, S. Role of Arterial Wall Antioxidant Defense in Beneficial Effects of Exercise on Atherosclerosis in Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 21, p. 1681 – 1688, 2001.

MIRANDA, M.S.; MANCINI-FILHO, J. Conseqüências dos radicais livres em alimentos. *Laes & Haes*, v.104, p. 110-117, 1997.

NAPOLI C, WILLIAMS-IGNARRO S, DE NIGRIS F, LERMAN OL, D'ARMIENTO FP, CRIMI F, et al. Physical training and metabolic supplementation reduce spontaneous atherosclerotic plaque rupture and prolong survival in hypercholesterolemic mice. *PNAS*. v.103, n. 27, p.10479–10484, 2006.

NAPOLI, C. WILLIAMS-IGNARRO S.; NIGRIS, F.; LERMAN, L.O.; ROSSI, L.; GUARINO, C.; MANSUETO, G.; DI TUORO, F.; PIGNALOSA, O.; DE ROSA, G.; SICA, V.; IGNARRO, L. J. Long-term combined beneficial effects of physical training and metabolic treatment on atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *PNAS*, v. 101, p. 8797 – 8802, 2004.

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

NICKLAS, B. J. AMBROSIUS, W.; MESSIER S. P.; MILLER, G. D.; PENNINX, B.W.J.H.; LOESER, R.F.; PALLA, S.; BLEECKER, E.; PAHOR, M. Diet-induced weight loss, exercise, and chronic inflammation in older, obese adults: a randomized controlled clinical trial. *Am J Clin Nutr*, v. 79, p. 544 – 551, 2004.

OLIVEIRA, T.T.; PEREIRA, W.L.; PINTO, A.S.; SANTOS, C.A. Efeito regulatório de flavonóides e de carmin em níveis de lipídeos em ratos Wistar. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.54, n.1, Belo Horizonte, 2002.

OLIVEIRA, T.T.; RICARDO, K.F.S.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; STRINGUETA, P.C.; OLIVEIRA, M.G.A. Efeito de flavonóides com ácido nicotínico e corantes naturais no controle do colesterol hepático de ratos. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, v.21, n.1, p.69-80, 2000.

PLUMP, A.S. SMITH, J. D.; HAYEK, T.; AALTO-SETÄLÄ, K.; WALSH, A.; VERSTUYFT, J. G.; RUBIN, E. M.; BRESLOW, J. L. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*, v. 71, p. 343-353, 1992.

POZO-INSFRAN, D. D.; BRENES, C. H.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and pigment stability of acai (*Euterpe oleracea Mart.*). *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 1539-1545, 2004.

QUINTÃO, E.; NAKANDAKARE, E. R. *Manual de Referência em Dislipidemias*. Novartis, São Paulo, p. 106, 1997.

RAMACHANDRAN S, PENUMETCHA M, MERCHANT NK, SANTANAM N, RONG R, PARTHASARATHY S. Exercise reduces preexisting atherosclerotic lesions in LDL receptor knockout mice. *Atherosclerosis*. v.178, p. 33–38. 2005.

RAURAMAA, R.; HALONEN, P.; VÄISÄNEN, S. B.; LAKKA, T. A.; SCHMIDT-TRUCKSÄSS, A; BERG, A.; PENTTILÄ, I. M.; RANKINEN, T.; BOUCHARD, C. Effects of Aerobic Physical Exercise on Inflammation and Atherosclerosis in Men: The DNASCO Study. *Ann Intern Me*, v. 140, p. 1007-1014, 2004.

REDDICK, R. L.; ZHANG, S. H.; MAEDA, N. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler Thromb Vasc. Biol.*, v.14, p. 141-147, 1994.

REIS, M. S. Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmito (*Euterpe edulis Martius*). Doutorado. Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/Universidade de São Paulo, Piracicaba, p. 210, 1996.

RIBEIRO, S.M.R.; QUEIROZ, M.E.L.R.; PELUZIO, M.C.G.; COSTA, N.M.B.; MATTA, S.L.P.; QUEIROZ, J.H. Antioxidantes na dieta. Em: Costa, N.M.B e Peluzio, M.C.G. *Nutrição Básica e Metabolismo*. Viçosa: UFV, p.235 -260, 2008.

RIBOLI, E.; NORAT, T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *The American Journal Clinical of Nutrition*. v. 78, p. 559S-569S, 2003.

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

ROSS, R. Atherosclerosis – na inflammatory disease. *N Engl J Med*, v. 340, p. 115-126, 1999.

ROSSO, V.V.; HILLEBRAND, S.; MONTILLAB, E.C.; BOBBIO, F.O.; WINTERHALTER, P.; MERCADANTE, A. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata DC.*) and açai (*Euterpe oleracea Mart.*) by

HPLC–PDA–MS/MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 21, p. 291-299, 2008.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SCHAUSS, A. G.; WU, X.; PRIOR, R. L.; OU, B.; PATEL, D.; HUANG, D.; KABABICK, J. P. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Açaí). *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 8598-8603, 2006.

SHIMADA KBM, CHIHARU KISHIMOTO MD, TAKA-AKI OKABE BM, MIKI HATTORI BM, TOSHINORI MURAYAMA MD, MASAYUKI YOKODE MD, et al. Exercise Training Reduces Severity of Atherosclerosis in Apolipoprotein E Knockout Mice via Nitric Oxide. *Circ J.* 2007; 71: 1147–1151.

SILVA, R.C.; VALENTE, S.T.X.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; COSTA, N.B.M. Efeitos de corantes naturais nos níveis séricos de colesterol-HDL em ratos hiperlipidêmicos. *Revista Brasileira de Análise Clínica*, v.32, n.3, p.201-204, 2000.

SINGH, U.; JIALAL, I. Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology*, v. 13, p. 129-142, 2006.

SIQUEIRA, A.F.A.; ABDALLA, D.S.P.; FERREIRA, S.R.G. LDL: da síndrome metabólica à instabilidade da placa aterosclerótica. *Arq. Bras. Endocrinol Metabol.*, v. 50, nº 2, p. 334-343, 2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemia e Prevenção da Aterosclerose. *Arq. Bras. Cardiol.*, v.88, suppl.1, São Paulo, 2007.

STEINBERG, D. A critical look at the evidence for the oxidation of LDL in atherogenesis. *Atherosclerosis*. v. 131, suppl, p. S5-S7, 1997.

TEODORO, B. G.; NATALI, J.N.; FERNANDES, S.A.T.; PELUZIO, M.C.G. A Influência da Intensidade do Exercício Físico Aeróbio no Processo Aterosclerótico. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* – v. 16, n. 5, p. 382-387, 2010

TOOMEY, S.; ROCHET, H.; FITZGERALD, D.; BELTON, O. Regression of pre-established atherosclerosis in apoE -/- mouse by conjugated linoleic acid. *Biochemical Society Transactions*, v. 31, p. 1075-1079, 2003.

VAN REE, J.H.; VAN DENBROEK, W.J.; DAHLMANS, V.E.; GROOT, P.H.; VIDGEON-HART, M.; FRANTS, R.R.; WIERINGA, B.; HAVEKES, L.M.; HOFKER, M.H. Diet induced hipercholesterolemia and atherosclerosis in heterozigous apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*, v.111,p. 25-37, 1994.

- VUORIMAA, T.; AHOTUPA, M.; IRJALA, K.; VASANKARI, T. Acute Prolonged Exercise Reduces Moderately Oxidized LDL in Healthy Men. *Int J Sports Med.*, v.26, p. 420–425, 2005.
- VUORIMAA, T.; AHOTUPA, M.; IRJALA, K.; VASANKARI, T. Acute Prolonged Exercise Reduces Moderately Oxidized LDL in Healthy Men. *Int J Sports Med.*, v. 26, p. 420–425, 2005.
- WARBURTON, D. E. R.; NICOL, C.W.; BREDIN, S.S.D. Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ*, v. 14, p. 801 – 809, 2006.
- WASSMANN, S.; WASSMANN, K.; NICKENING, G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension*. v.44, p.381-386, 2004.
- WILLIAMS JK, KAPLAN JA, SUPARTO IH, FOX JL, MANUCK, SB. Effects of Exercise on Cardiovascular Outcomes in Monkeys With Risk Factors for Coronary Heart Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23: 864-871.
- WILLIAMS, J.K.; KAPLAN, J.A.; SUPARTO, I.H.; FOX, J.L.; MANUCK, S.B. Effects of Exercise on Cardiovascular Outcomes in Monkeys With Risk Factors for Coronary Heart Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. v. 23; p. 864-871, 2003.
- WINTHER, M.P.J; KANTERS, E.; KRAAL, G; HOFKER, M.H. Nuclear Factor κ B Signaling in Atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v. 25, p. 904-914, 2005.
- WITZTUM, S.; STEINBERG, D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends in Cardiovascular Medicine*, vol. 11, n. 3, p.93-102, 2001.
- XIA, M.; LING, W.; ZHU, H.; MA, J.; WANG, Q.; HOU, M.; TANG, T.; GUO, H.; LIU, C.; YE, Q. Anthocyanin attenuates CD40-mediated endothelial cell activation and apoptosis by inhibiting CD40-induced MAPK activation. *Atherosclerosis*, v. 202, p. 41–47, 2009.
- YI, L.; CHEN, C.; JIN, X.; MI, M.; CHANG, H.; LING, W.; ZHANG, T. Structural requirements of anthocyanins in relation to inhibition of endothelial injury induced by oxidized low-density lipoprotein and correlation with radical scavenging activity. *FEBS Letters*, v. 584, p. 583-590, 2010.
- ZHANG, S.H.; REDDICK, R.L.; PIEDRAHITA, J.A.; MAEDA, N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*, v. 258, p. 468-471, 1992.
- ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. In: Farmacognosia – da planta ao medicamento. Simões, C.M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da Universidade/UFRGS e da UFSC, 4ª edição, p. 499-526, 2002.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da dieta com Açaí da Mata Atlântica (*Euterpe edulis* Martius) e do treinamento físico no processo da aterosclerose em camundongos adultos *knockout* para o gene da Apolipoproteína E.

3.2. Objetivos Específicos

- Identificar a presença de placas ateroscleróticas na raiz e curvatura da aorta;
- Verificar se 2% de açaí na dieta é capaz de alterar as lesões ateroscleróticas;
- Verificar os efeitos do treinamento físico na lesão aterosclerótica;
- Avaliar os efeitos da associação da dieta com açaí e o treinamento físico no quadro aterosclerótico;
- Avaliar o potencial antioxidante do açaí e do treinamento físico sobre o fígado dos animais;
- Analisar a histopatologia do fígado e rim dos animais tratados.

4. ARTIGO I

O exercício físico regular diminui a progressão da placa aterosclerótica e melhora o potencial antioxidante em animais ApoE^{-/-} submetidos a dieta com açaí.

RESUMO

Objetivo: avaliar se o açaí e a prática de exercícios físicos podem influenciar o processo aterosclerótico em camundongos. **Métodos:** 28 camundongos (ApoE^{-/-}) e 10 camundongos C57Bl/6, com 21 semanas de idade, foram submetidos a 12 semanas de corrida em esteira (60 min/sessão/dia, 5 dias/semana e velocidade de 15m/min, com 0% de inclinação) e dieta com 2% de Açaí. Antes de iniciar o tratamento dois grupos controle T1 (n= 4 ApoE^{-/-}) e T2 (n=5 C57Bl/6) sofreram eutanásia para avaliar o nível inicial da lesão. Os demais animais foram divididos em 5 grupos: C- Controle negativo – animais C57Bl/6, sem 2% de açaí, não-treinado (n=4); C+ Controle positivo – animais ApoE^{-/-} sem 2% de açaí, não-treinado (n=4); G1 animais ApoE^{-/-} com 2% de açaí, não-treinado (n=6); G2 animais ApoE^{-/-} com 2% de açaí, treinados (n=6); G3 animais ApoE^{-/-} sem 2% de açaí, treinados (n=6). Ao final do experimento os animais sofreram eutanásia, foram coletadas a aorta, o sangue e o fígado. **Resultados:** Não houve diferença estatística entre os grupos para peso corporal, consumo das dietas, peso do fígado e também colesterol total, triglicerídeos e HDL. A área total da aorta não diferiu entre os grupos (C- 0,53±0,11cm²; C+ 0,41±0,07 cm²; G1 0,39±0,12 cm²; G2 0,39±0,09 cm²; G3 0,48±0,03 cm²). No entanto, a porcentagem da área lesionada apresentou diferença apenas entre o C+ (5,97±1,22%) e o G3 (2,51±1,16%). A atividade da SOD no fígado em G3 apresentou menor valor em relação ao controle C+.

Conclusão: Apenas a atividade física foi capaz de reduzir a área das lesões ateroscleróticas e melhorar o potencial antioxidante no fígado dos animais ApoE^{-/-}.

Palavras-chave: aterosclerose, estresse oxidativo, açaí, exercício físico.

4.1. Introdução

A aterosclerose inicia-se por um processo de inflamação progressiva na parede dos vasos sanguíneos, resultando no acúmulo de lipoproteínas e turbulências hemodinâmicas neste local. Devido a uma ativação endotelial, ocorre um recrutamento de leucócitos e com isso inicia-se um centro de desenvolvimento e progressão das placas aterogênicas, podendo levar a complicações clínicas (Petrovan *et al.*, 2007).

Conduas como mudanças no estilo de vida do paciente, medicamentos antihipertensivos, aspirina, drogas para baixar o colesterol, cirurgia ou angioplastia, são usados no tratamento da aterosclerose (Toomey *et al.*, 2003). No entanto, em alguns casos, estes tipos de tratamentos não têm sido efetivos na cura e, até mesmo na prevenção de patologias relacionadas ao sistema cardiovascular.

A prática de exercícios físicos (Lakka *et al.*, 2001; Maeda *et al.*, 2003; Das, 2004) e o uso de dietas com elevado conteúdo de frutas e vegetais (Riboli e Norat, 2003) tem sido usados para prevenir ou reverter a formação de placas ateromatosas nas artérias.

Para a comprovação dos efeitos benéficos da atividade física aeróbia na redução e prevenção de doenças coronarianas (Meilhac *et al.*, 2001; Cal e Figueiredo, 2002; Maeda *et al.*, 2003) algumas propostas são evidenciadas, mesmo quando realizados com baixa frequência, ou seja, 2 a 3 vezes por semana, numa intensidade moderada (40% a 60% do VO₂max), a atividade física tende a ser eficaz em situações de prevenção ou como terapêutica (Willians *et al.*, 2003).

Os efeitos benéficos dos alimentos têm sido relacionados à presença de polifenóis e outros nutrientes, como ácidos graxos insaturados, fibras e fitoesteróis. Alguns exemplos são os compostos fenólicos como as isoflavonas, os ácidos fenólicos, as catequinas do chá, os ácidos clorogênicos do café, as antocianinas presentes no vinho, (Miranda e Mancini-Filho, 1997), no açaí, ameixa, amora, cereja, figo, etc. (Guedes, 2004). Além de seus efeitos antioxidantes, esses alimentos têm a capacidade de alterar os níveis de colesterol, principalmente o colesterol LDL, no sistema circulatório (Poli, *et al.*, 2008).

Os frutos de *Euterpe Edulis* Martius, também conhecido popularmente como açaí da palmeira juçara ou Açaí da Mata Atlântica, são ricos em flavonóides em especial as antocianinas como a cianidina-3-glicosídeo (1358mg/100g de peso seco) e a cianidina-3-rutinosídeo (1565mg/100g de peso seco) em maior quantidade (Brito *et al.*, 2007; Rosso *et al.*, 2008). Estas antocianinas têm apresentado um grande potencial farmacológico, que incluem propriedades antioxidantes (Garcia-Alonso *et al.*, 2008), antiinflamatórias (Xia *et al.*, 2009), inibição da oxidação do LDL (Chang *et al.*, 2006), diminuição dos riscos de doenças cardiovasculares (Toufektsian *et al.*, 2008) e de câncer (Chen *et al.*, 2006).

Poucos estudos foram realizados com os frutos da juçara e sua relação com atividade física no controle das doenças crônicas. Os objetivos deste foram avaliar se os compostos antioxidantes presentes neste fruto podem influenciar o processo de regressão da placa aterosclerótica em camundongos adultos e avaliar se com a atividade física regular este processo pode ser mantido e/ou potencializado.

4.2. Materiais e Métodos

Frutos

Os frutos do açaí foram obtidos no entorno do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB), localizada na região da zona da mata do estado de Minas Gerais. A colheita, pós-colheita e despoldamento dos frutos foram realizados conforme orientações da Embrapa para os frutos do *E. oleracea*, açaí da Amazônia (Embrapa, 2005). Após todas as fases, a polpa do fruto do *E. edulis* foi embalada e liofilizada.

Na polpa liofilizada foram determinadas a composição centesimal e uma triagem fitoquímica para avaliação das principais classes de metabólitos secundários: flavonóides, cumarinas, taninos, antraquinonas, óleos essenciais, triterpenos/esteróides, saponinas e alcalóides.

A composição química centesimal foi determinada, avaliando-se os teores de umidade, cinzas, lipídeos, proteínas, carboidratos. O teor de umidade foi determinado por secagem direta da amostra em estufa a 105°C, o teor de cinzas por incineração em mufla a 550°C e posterior resfriamento em dessecador até a temperatura ambiente. A determinação de lipídeos totais ou

extrato etéreo foi realizado por secagem da amostra em estufa a 105°C seguida por extração com éter, em extrator do tipo Soxhlet, e posterior remoção do solvente empregado por destilação (A.O.A.C., 1989). O teor de proteínas foi medido pelo método de *Kjeldahl* clássico e a quantificação de carboidratos foi obtida pelo cálculo da diferença percentual, subtraindo-se do total da soma de umidade, cinzas, lipídeos e proteínas.

A triagem fitoquímica foi realizada em suporte cromatoplaca de alumínio (Alugram® Sil G/UV), com diferentes fases móveis e aspensão empregando reagentes reveladores específicos combinados com a visualização do cromatograma sob luz de comprimento de onda na região do ultravioleta, 254 e 365nm (Wagner & Blatt, 1996). Na análise cromatográfica para cada classe foram utilizados padrões de referência de forma a confrontar os resultados obtidos. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

Dieta

As dietas foram elaboradas de acordo com a AIN-93M (Reeves *et al*, 1993), sendo confeccionadas manualmente e mantidas sob refrigeração (0 a 4°C) , protegidas da luz, até o momento da utilização

Para os grupos que receberam 2% de polpa liofilizada do açaí, a composição da dieta foi modificada, levando em consideração os valores de umidade, carboidrato, proteína, lipídios e fibras dietéticas. O valor da quantidade de fibras foi baseado na composição do Açaí do Norte (*Euterpe oleraceae* Martius) (Schaus, *et al.*, 2006). A Tabela 1 mostra a composição das dietas experimentais.

Tabela 1. Composição das Dietas experimentais (g/kg dieta)

Ingredientes	Dieta AIN-93M (g)	AIN-93M com 2% de Açai liofilizado (g)
Amido (qpc)	515,7	521,3
Amido dextrinizado (15,5%)	155	155
Sacarose(10%)	100	91,6*
Proteína (caseína) (9%)	90	88,6*
Fibra (celulose) (5%)	50	41,2*
Mix de mineral (3,5%)	35	35
Mix de vitamina (1%)	10	10
Bitartarato de colina (0,25%)	2,5	2,5
L-cistina (0,18%)	1,8	1,8
Açai	-	21,2
Óleo (4%)	40	31,8*
	1000g	1000g

*Para estes ingredientes foi descontado a concentração dos nutrientes presentes no fruto. Em 100g de Açai da Mata Atlântica liofilizado há 7g de proteínas, 41g de lipídios, 42g de carboidratos e aproximadamente 44,2g de fibras dietéticas (Schaus, *et al.*, 2006). Quantidade energética aproximada: Dieta AIN-93M 380Kcal/100g; Dieta AIN-93M com 2% Açai 385Kcal/100g.

Animais

Foram utilizados 26 camundongos adultos ApoE^{-/-}, 9 camundongos adultos C57Bl/6, com 21 semanas de vida, procedentes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Viçosa. Os animais no início do experimento tinham peso médio inicial de 24,81±3,19 g e foram mantidos em gaiolas coletivas, em ambiente com temperatura controlada (23°C) e fotoperíodo de 12 horas até completarem a idade de 32 semanas.

Após o desmame (quatro semanas), os animais receberam dieta comercial (Nuvilab) até atingirem 21 semanas, para serem submetidos ao tratamento. Antes de iniciar o experimento 5 animais C57Bl/6 e 4 ApoE^{-/-} sofreram eutanásia, considerando-os como tempo zero (no início da administração da dieta) para quantificação das lesões, e avaliação do quadro aterosclerótico inicial. O grupo Controle Negativo (C57Bl/6 n=4) não treinado, recebeu dieta AIN-93M; o Controle positivo (ApoE^{-/-} n=4) não treinado, recebeu dieta AIN-93M com Açai 2%; Grupo 1 (ApoE^{-/-} n=6) não treinado com

dieta AIN-93M com Açai 2%; Grupo 2 (ApoE^{-/-} n=6) treinado, dieta AIN-93M com Açai 2%; Grupo 3 (ApoE^{-/-} n=6) treinado com dieta AIN-93M (Figura 2).

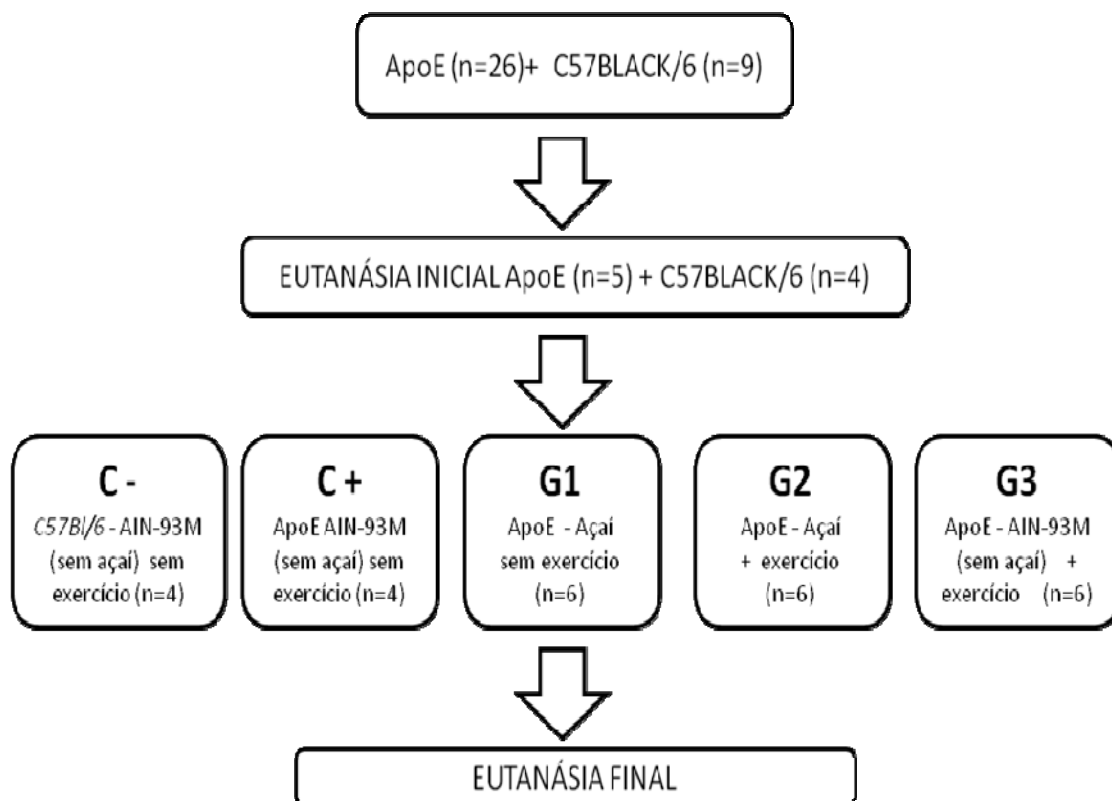


Figura 2: Desenho experimental até 32 semanas.

Controle de peso corporal e do consumo alimentar

Semanalmente, os camundongos foram pesados para observar o crescimento ponderal e o efeito do exercício físico sobre o peso. Também foi realizada a quantificação do consumo alimentar. Para tanto, as dietas ofertadas aos animais foram pesadas semanalmente, sendo que os dados da diferença entre dieta ofertada e o restante não consumido e sobras no fundo da gaiola foram utilizados para o cálculo do consumo de dieta semanal.

Protocolo de exercício/corrída em esteira

Os camundongos foram submetidos a um programa progressivo de corrida na esteira (*INSIGHT*, Ribeirão Preto, São Paulo - Brasil), 5 dias por semana, por 12 semanas consecutivas (adaptado de Meilhac *et al.*, 2001) chegando ao final do experimento a 60 minutos diários com uma velocidade de 16m/min com 0% de inclinação.

Eutanásia e dissecação dos Órgãos

Os animais sofreram eutanásia 48 horas após a última sessão de exercício por sangria sob anestesia intraperitoneal (90mg/kg de quetamina+ 15mg/kg de xilasina). O sangue foi removido por punção na aorta abdominal, imediatamente centrifugado a 3000rpm, por 10 minutos à 4°C. O soro, o fígado, e aorta foram retirados e armazenados à -80°C para posteriores análises. O músculo sóleo e gastrocnêmio dos animais foram coletados e armazenados à -80°C para análise da enzima citrato sintase (adaptado de Alp, *et al.*, 1976) para se comprovar o condicionamento físico e adaptação ao exercício.

Parâmetros sanguíneos

O colesterol total, colesterol - HDL e triglicerídeos foram obtidos através de Kits comerciais (Bioclin[®], Brasil) por método colorimétrico enzimático e analisador automático Cobas[®] pelo laboratório especializado em análises clínicas da Divisão de Saúde/UFV.

Avaliação da deposição lipídica na aorta

A deposição lipídica foi determinada nas aortas torácica e abdominal, utilizando-se a análise *en face* pela coloração Sudan IV, segundo Palinski *et al.* (1994). A soma das áreas das lesões ateroscleróticas (local onde houve acúmulo lipídico) foi calculada pelo programa Image-Pro Plus, sendo o resultado expresso em milímetros quadrados. Para garantir que não houvesse diferença entre os animais quanto ao tamanho total da aorta analisado, a área total da aorta também foi mensurada.

Atividade enzimática: catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) no fígado

Para determinar a atividade da CAT, porções do fígado foram homogenizadas em Tampão fosfato 50 mM e a suspensão resultante foi centrifugado por 10min a 6000 rps, 4° C. O sobrenadante foi utilizado para a dosagem das enzimas. A atividade da CAT foi determinada pela taxa de decaimento do peróxido de hidrogênio lido em espectrofotômetro (Pró-análise UV.1600) a 240nm, segundo descrito anteriormente (Aebi, 1984). A atividade da SOD foi determinada segundo Dieterich *et al*, (2000) adaptado, o qual é

baseado na habilidade da superóxido dismutase retirar o O_2^- , diminuindo assim a razão de autooxidação do pirogalol, usando leitor de microplaca (Asys, UVM 340) a 570nm. O conteúdo de proteínas foi mensurado de acordo com o método descrito por Lowry *et al.*, (1951).

Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, processo nº 19/2010. O experimento foi conduzido em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA (COBEA, 2009)(Anexo 1).

Análise estatística

Os dados foram inicialmente analisados usando-se o teste de Kolmogorov-Sminorv para verificar a simetria e igualdade de variância (método de Levene), O teste paramétrico de análise de variância para um fator (one way ANOVA) foi usado para comparações envolvendo 3 ou mais grupos com apenas um fator. O teste não paramétrico Kruskal Wallis foi usado quando o teste one way ANOVA era contra indicado. O teste de comparações múltiplas de Tukey foi utilizado quando o teste one way ANOVA detectava diferença estatística. Para situações em que o teste Kruskal Wallis detectava diferença estatística, utilizou-se o teste de comparações múltiplas de Dunn's.

Os resultados foram apresentados como “Média±Desvio Padrão (DP)” quando apenas o teste one way ANOVA foi exigido. Quando o teste não paramétrico Kruskal Wallis foi exigido, os resultados (valores) foram apresentados como “Mediana (Média±DP)”. Para todos os testes utilizados, o erro máximo permitido para assumir a existência de diferença entre os grupos foi de 5% ($p < 0,05$). O programa estatístico usado para todas as análises foi o Sigma Stat 3.5.

4.3. Resultados

Açaí

A polpa do fruto liofilizada apresentou 8,45 % de umidade, 5,28% proteína, 49,35% de lipídeos e 42,86% de carboidratos. A triagem fitoquímica da polpa de açaí esta representada na tabela 2.

Tabela 2. Resultados da prospecção fitoquímica preliminar da polpa de açaí liofilizada.

Classe dos Metabólitos	Revelador	Extrato
Flavonóides	Solução de AlCl ₃ a 5% em etanol	+
Alcalóides	Reagente de Drangendorff	-
Esteróides/triterpenos	Reagente de Lieberman Burchard	-
Cumarinas	Solução de KOH a 5% em etanol	-
Polifenóis	Reagente de Barton	+
Antraquinonas	Solução de KOH a 5% em etanol	-
Saponinas	Anisaldeído-sulfúrico	+

O sinal (+) indica presença e (-) ausência do constituinte químico.

Consumo alimentar e evolução ponderal

Ao fim do experimento, não foi verificado nenhuma diferença entre os tratamentos ($p < 0,05$; one way ANOVA) para o consumo alimentar diário (figura 3) e evolução ponderal (figura 4) entre os grupos experimentais. A média de consumo de fruto liofilizado presente na dieta foi de 3,25g/kg/dia. Os animais também não diferiram quanto o peso dos fígados (dados não mostrados).

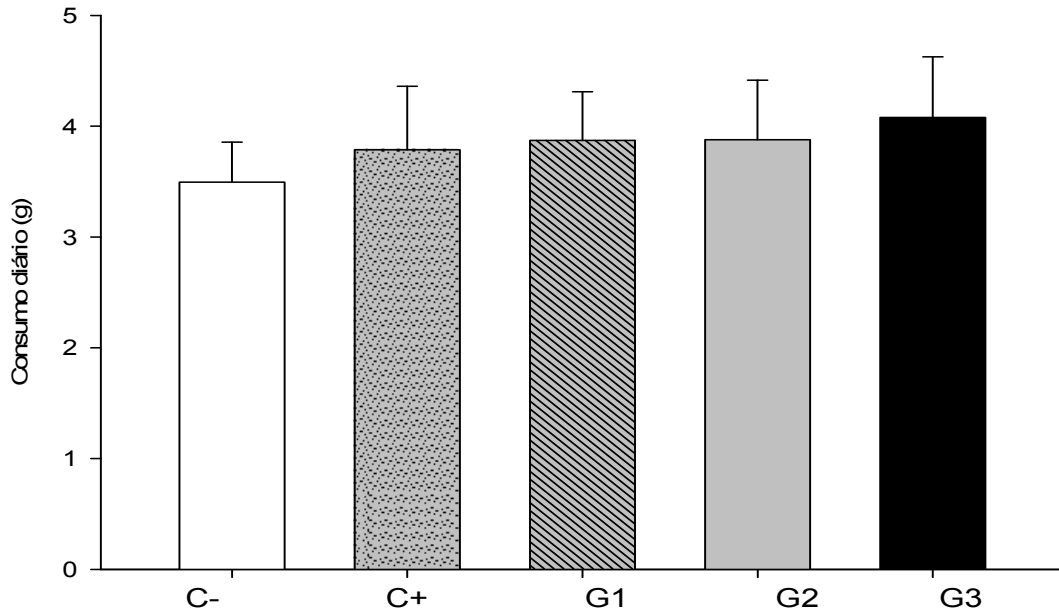


Figura 3 - Consumo alimentar diário dos grupos experimentais. Teste one way ANOVA; Colunas = médias; Barras de erro = desvio padrão. C- Controle negativo – C57Bl/6, sem açai, não-treinado (n=4); C+ Controle positivo – ApoE -/- sem açai, não-treinado (n=4); G1 ApoE -/- com açai, não-treinado (n=6); G2 ApoE -/- com açai, treinados (n=6); G3 ApoE -/- sem açai, treinados (n=6).

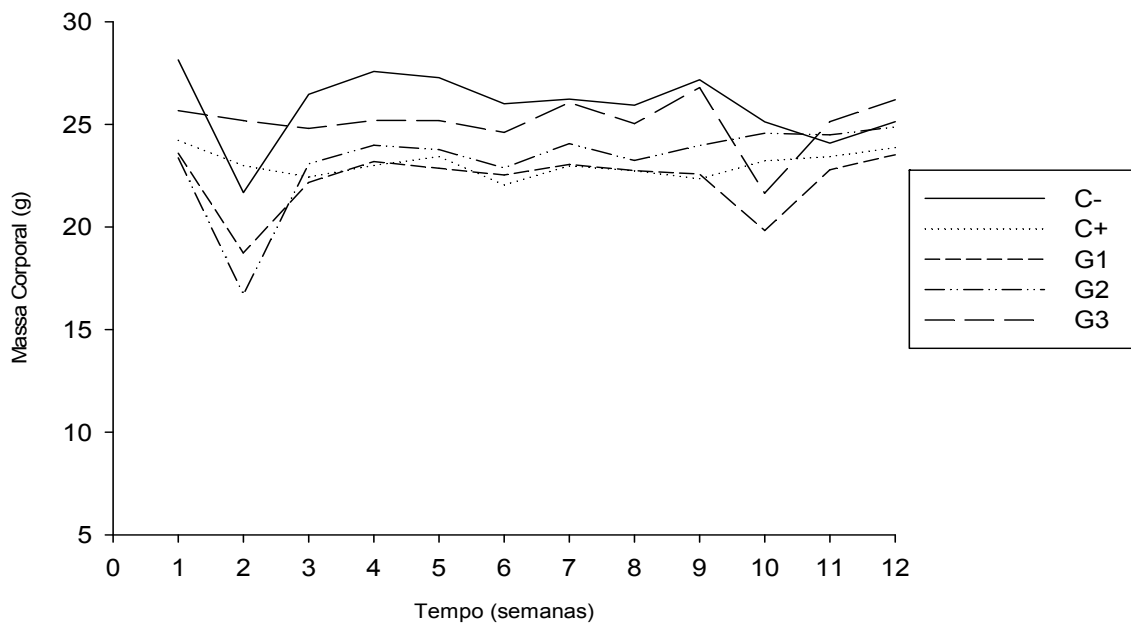


Figura 4 - Evolução da massa corporal durante as 12 semanas de experimento. O peso foi semelhante ($p > 0,05$) entre os tratamentos. C- Controle negativo – C57Bl/6, sem açai, não-treinado (n=4); C+ Controle positivo – ApoE -/- sem açai, não-treinado (n=4); G1 ApoE -/- com açai, não-treinado (n=6); G2 ApoE -/- com açai, treinados (n=6); G3 ApoE -/- sem açai, treinados (n=6).

Citrato-sintase

A atividade da Citrato-sintase (CS) foi usada como indicador do efeito do exercício físico. Os resultados (figura 5) indicam que o programa de treinamento realizado em esteira foi suficiente para aumentar a capacidade oxidativa do músculo esquelético (Não-treinados= $0,63 \pm 0,18$ $\mu\text{mol/ml/mg}$ proteína, Treinados = $1,28 \pm 0,14$ $\mu\text{mol/ml/mg}$ proteína, $p < 0,05$).

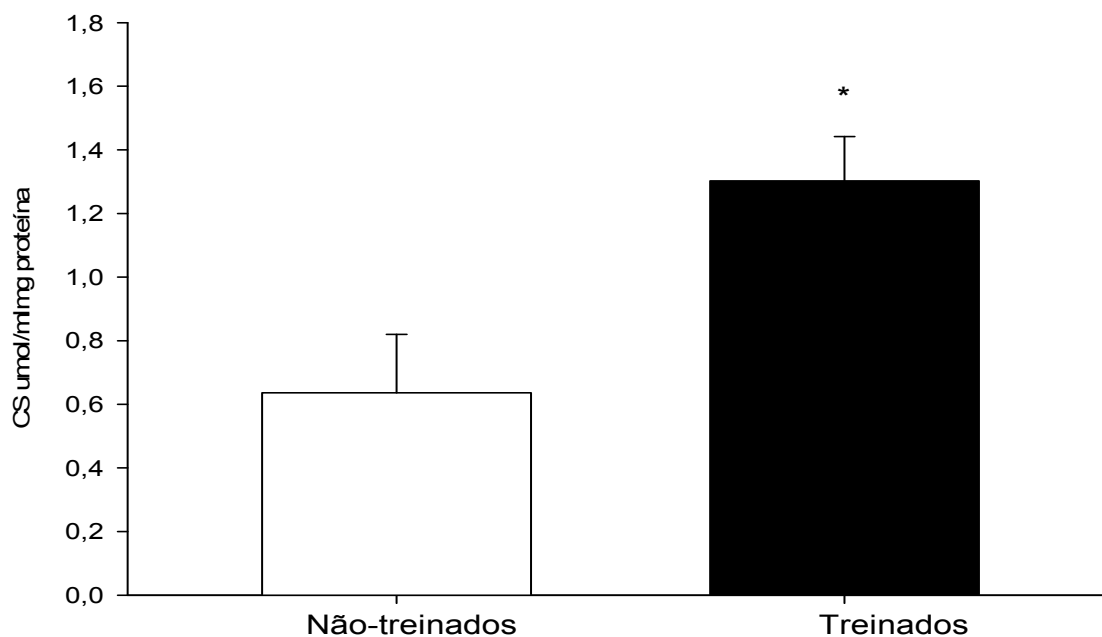


Figura 5 - Atividade da Citrato-sintase em músculo esquelético (sóleo) de ratos treinados e não-treinados. Teste t; Colunas = médias; Barras de erro = desvio padrão. Não-treinados= grupos C+ (n=4) e G1(n=6); Treinados= grupos G2(n=6) e G3(n=6). * $p < 0,05$.

Determinação de colesterol total (CT), triglicerídeos (TG) e HDL

Os parâmetros sanguíneos colesterol total, triglicerídeos e fração HDL colesterol, ao serem analisados nos grupos experimentais em relação ao controle *knockout* Apo E (C+), não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$). Quando comparados ao seu controle selvagem (C-) todos os grupos apresentaram diferença estatística para CT e HDL, mas para TG apenas o G1 que não diferiu do C- (Tabela 3).

Tabela 3. Valores de colesterol total, triglicerídeos e HDL dos grupos experimentais.

Parâmetros sanguíneos (mg/dL)	Grupos				
	C - n=4	C + n=4	G1 n=5	G2 n=5	G3 n=5
CT	152,5 (155,7±8,2)	437,0 (429,7±30,2)*	435,0 (430,8±68,0)*	410,5 (371±113,9)*	370,0 (393,4±79,0)*
TG	108,0 (105,2±13,2)	64,5 (65,2±13,4)*	90,0 (100,2±34,3)	60,0 (57,2±22,9)*	72,0 (64,2±27,6)*
HDL	87,0 (87,7±4,5)	26,0 (24,5±4,4)*	30,0 (32,2,3±7,4)*	27,5 (25,3±7,3)*	24,0 (28,8±10,8)*

Teste one way Anova ou Kruskal Wallis, complementados pelo teste de Tukey ou Dunn's, respectivamente. Valores dados em "mediana (média±DP)". * p<0,05 comparado ao controle C -. C- Controle negativo – C57Bl/6, sem açaí, não-treinado (n=4); C+ Controle positivo – ApoE -/- sem açaí, não-treinado (n=4); G1 ApoE -/- com açaí, não-treinado (n=5); G2 ApoE -/- com açaí, treinados (n=5); G3 ApoE -/- sem açaí, treinados (n=5).

Lesões na aorta

Não houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos quando avaliada a área total da aorta. Havendo confirmação de que as aortas tinham a mesma área (tabela 4), tornando-se possível a análise da área lesionada total.

O grupo T2 (controle das lesões iniciais dos animais knockout ApoE) é apresentado apenas com o interesse de mostrar o estado inicial dos animais, quanto a área lesionada na aorta, não sendo, portanto, foco de comparações com os demais grupos.

O grupo G3 apresentou menor área lesionada total ($p < 0,05$) em relação à C+, conforme demonstrado na Figuras 6. Além disso este grupo também apresentou menor ($p < 0,05$) percentual de área lesionada (área lesionada total/área total da aorta) conforme indica a tabela 4.

Tabela 4. Área total da aorta e percentual de área lesionada

	n	Área total da Aorta (cm ²)	% de Área Lesionada
T2	4	0,51 (0,53±0,11)	0,37 (0,39±0,45)
C+	4	0,38 (0,41±0,07)	6,18 (5,97±1,22) £
G1	6	0,42 (0,39±0,12)	6,14 (5,96±4,60) £
G2	6	0,39 (0,39±0,09)	4,55 (5,74±2,66) £
G3	6	0,49 (0,48±0,03)	2,88 (2,51±1,16) * £

Teste one way Anova ou Kruskal Wallis, complementados pelo teste de Tukey ou Dunn's, respectivamente. Valores dados em "mediana (média±DP)".* P<0,05 comparado ao controle C+; £ P<0,05 comparado ao controle T2. C- Controle negativo – C57Bl/6, sem açaí, não-treinado (n=4); C+ Controle positivo – ApoE -/- sem açaí, não-treinado (n=4); G1 ApoE -/- com açaí, não-treinado (n=6); G2 ApoE -/- com açaí, treinados (n=6); G3 ApoE -/- sem açaí, treinados (n=6).

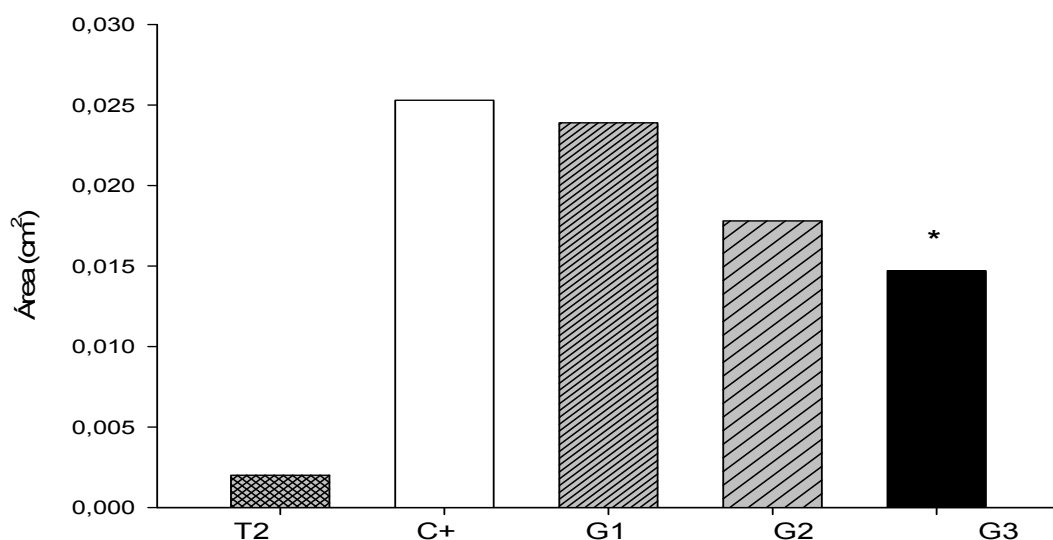


Figura 6 - Área lesionada total (cm²) das aortas. * P<0,05 comparado ao controle C+; Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn's. barras= mediana. C- Controle negativo – C57Bl/6, sem açaí, não-treinado (n=4); C+ Controle positivo – ApoE -/- sem açaí, não-treinado (n=4); G1 ApoE -/- com açaí, não-treinado (n=6); G2 ApoE -/- com açaí, treinados (n=6); G3 ApoE -/- sem açaí, treinados (n=6).

Atividade das enzimas antioxidantes no fígado

A capacidade antioxidante no fígado foi investigada através da quantificação da atividade enzimática da catalase e da superóxido dismutase. Tanto o exercício quanto o açaí foram insuficientes para provocar uma alteração significativa na atividade da CAT (tabela 5).

Para atividade da SOD, o grupo C+ (1,79 ±0,27 U.mg⁻¹ de proteína) apresentou maior atividade da enzima em relação ao controle selvagem C-

(1,15 ± 0,15 U.mg⁻¹ de proteína) mostrando a diferença do estresse causado pelo modelo knockout ApoE. Comparando apenas os grupos com tratamento, G3 (0,98± 0,17 U.mg⁻¹ de proteína) e G2(0,97 ±0,20 U.mg⁻¹ de proteína), demonstraram uma diminuição significativa em relação a C+ (1,79 ±0,27 U.mg⁻¹ de proteína) (Figura 7).

Tabela 5. Atividade da enzima catalase (U/mg⁻¹ de proteína) no fígado.

CAT U/mg ⁻¹ proteína	GRUPOS				
	C- (n=4)	C+ (n=4)	G1 (n=6)	G2 (n=6)	G3 (n=6)
	0,87 (1,06±0,71)	0,94 (0,92±0,15)	0,74 (0,83±0,19)	0,91 (0,86±0,19)	1,08 (1,15±0,27)

Teste Kruskal-Wallis; Valores dados em “mediana (média±DP)”. (P<0,05). C- Controle negativo – C57Bl/6, sem açaí, não-treinado (n=4); C+ Controle positivo – ApoE -/- sem açaí, não-treinado (n=4); G1 ApoE -/- com açaí, não-treinado (n=6); G2 ApoE -/- com açaí, treinados (n=6); G3 ApoE -/- sem açaí, treinados (n=6).

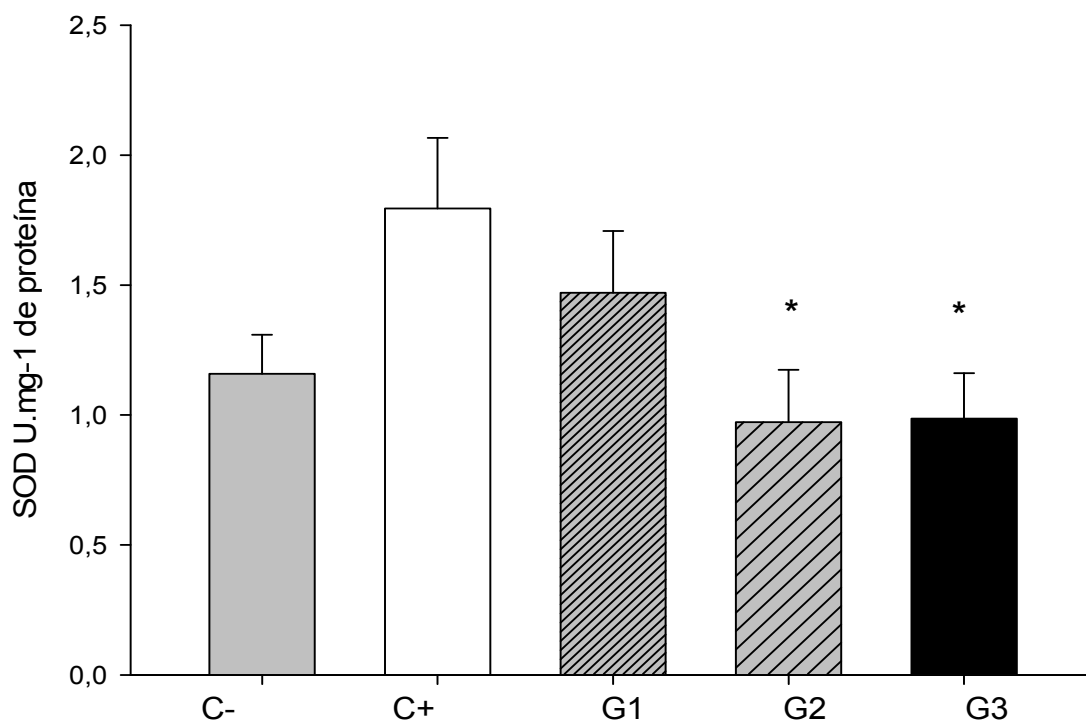


Figura 7 - Atividade da enzima SOD (U.mg⁻¹ de proteína) no fígado. Teste one way Anova. Barras de erro = desvio padrão; * p < 0,05 em relação ao grupo Controle C+. C- Controle negativo – C57Bl/6, sem açaí, não-treinado (n=4); C+ Controle positivo – ApoE -/- sem açaí, não-treinado (n=4); G1 ApoE -/- com açaí, não-treinado (n=6); G2 ApoE -/- com açaí, treinados (n=6); G3 ApoE -/- sem açaí, treinados (n=6).

4.4. Discussão

A hiperlipidemia, dieta de com elevada quantidade de colesterol e sedentarismo são fatores importantes no desenvolvimento de doenças cardiovasculares. A busca por alternativas como, mudanças no consumo alimentar e a pratica regular de atividade, que possam reduzir ou controlar os níveis de colesterol e exercer uma ação antioxidante é importante para a prevenção de doenças vasculares. No presente estudo investigou-se o modelo animal que desenvolve aterosclerose, o ApoE^{-/-}, para avaliar diretamente o efeito do açaí liofilizado e do treinamento físico no desenvolvimento desta doença.

No presente estudo os resultados de evolução ponderal e consumo da dieta tanto com açaí ou não, não diferiram em relação ao controle. Estes dados mostram que o uso do açaí na dieta e o treinamento físico não foram capazes de interferir nestes parâmetros.

Com relação a atividade da CS, esta apresentou um aumento duas vezes maior nos animais treinados comparados com os não-treinados (Figura 2). Condizente com este resultado alguns estudos mostraram que a corrida em esteira com ratos aumenta a atividade da CS no gastrocnêmio em relação ao grupo controle (Alessio e Goldfarb, 1988; Radak *et al.*, 1999). Considerando trabalhos com camundongos knockout, em nosso laboratório foi realizada uma pesquisa (Teodoro, 2010) onde, animais knockout para receptor LDL treinados em esteira (5vezes por semana, 30 minutos/dia a 16m/min) aumentaram significativamente a atividade da CS. Estes resultados podem indicar a eficácia treinamento em promover as adaptações na capacidade aeróbica dos animais treinados

A Citrato-sintase é uma enzima presente no Ciclo do acido cítrico que regula a produção de energia aeróbica catalisando a condensação do oxaloacetato e acetil CoA para citrato (Siu *et al.*, 2003). Vários estudos têm utilizado a atividade de enzimas mitocondriais para confirmar ou não a influência do exercício físico na adaptação oxidativa do músculo esquelético de ratos (Hoffman-Goetz e Pervaiz, 2009; da Silva *et al.*, 2009).

Os valores encontrados para CT, TG e HDL-c dos animais tratados com açaí, atividade física e a conjunção destes dois fatores não diferiram em relação ao controle knockout ApoE. Nossos dados corroboram com o estudo

de Miyazaki *et al.*, (2008) onde camundongos deficientes em ApoE não apresentaram diferença em seus perfil lipídico quando tratados com dieta complementada com antocianina (1% batata doce roxa). Este fato pode estar relacionado ao modelo animal, pois ele é específico para desenvolvimento de lesões ateroscleróticas e o tempo de estudo pode não ter sido suficiente para desenvolver uma alteração significativa no perfil lipídico do sangue.

Com relação a influência da atividade física no perfil lipídico em modelos *knockout*, Yang *et al.*, (2009) mostrou que animais experimentais Apo E^{-/-} apresentaram diminuição da lesão aterosclerótica sem ocorrer mudanças do CT e TG séricos. Braz Jr e colaboradores (2007) mostraram que o nível de CT e TG séricos exercem pouca ou nenhuma influência na deposição lipídica da artéria coronária em indivíduos com aterosclerose severa, justificando a redução da lesão aterosclerótica por outros fatores que não sejam a diminuição do CT, tais como alterações no processo inflamatório, disfunção endotelial, estresse oxidativo e fatores genéticos.

No presente estudo demonstrou-se que o exercício foi capaz de reduzir as lesões ateroscleróticas, em relação ao controle sedentário após 3 meses de tratamento em camundongos *knockout* ApoE. Estudos anteriores demonstraram regressão ou menor grau de lesão aterosclerótica em animais experimentais, principalmente em camundongos LDLr^{-/-} e ApoE^{-/-}, submetidos a exercícios aeróbicos tanto em esteira quanto em natação (Ramachandran *et al.*, 2005; Pellegrin *et al.*, 2009).

Xia *et al.* (2009), investigaram a influência do extrato rico em antocianina do arroz preto na vulnerabilidade de placas ateroscleróticas avançadas em camundongos *knockout* ApoE com 30 semanas de idade. Após 20 semanas de intervenção, o tamanho da placa foi reduzido em 18% no grupo que recebeu o extrato rico em antocianina e em 13% no grupo com sinvastatina em relação ao controle dieta normal. No presente estudo o Açaí da Mata Atlântica não foi capaz de reduzir ou estabilizar o quadro de lesões na aorta. Este fato pode estar relacionado não somente a idade dos animais e tempo de evolução da lesão (placas avançadas), mas também a quantidade de antocianinas presente no liofilizado.

Relacionando somente a atividade física, Okabe *et al.*, (2007) observaram que camundongos *knockout* ApoE que realizaram 45 minutos de

natação por dia, 3 vezes por semana, diminuíram a lesão aterosclerótica em. Teodoro (2010) trabalhou com camundongos LDL^{r-/-} treinados em esteira com duas intensidades (leve e moderada) e também verificaram uma menor área de deposição lipídica aórtica em relação aos controles os dois momentos. Baseando no estudo citado, planejamos o nosso protocolo em esteira considerando a velocidade trabalhada como moderada, apenas aumentando o tempo de treinamento. De acordo com os resultados pode-se inferir que o treinamento físico nesta intensidade pode melhorar o quadro de aterosclerose avançada.

Vários são os fatores que tem sido relacionados com aterosclerose, dentre eles, distúrbios do metabolismo de lipoproteínas plasmáticas, aumentos sistêmicos da pressão arterial e angiotensina II (Pellegrin *et al.*, 2009), níveis alterados de glicose sanguínea e aumento da resistência à insulina (Duncan *et al.*, 2007), percentual de gordura corporal (Tsitsilonis *et al.*, 2009), relaxamento vascular, fatores agregatórios plaquetários, inflamatórios e o balanço oxidativo do organismo (Parthasarathy *et al.*, 2008). Neste trabalho, investigou-se as mudanças decorrentes do metabolismo lipídico e do balanço oxidativo hepático.

Neste estudo foram avaliadas as defesas antioxidantes do tecido hepático, já que o fígado é considerado o maior órgão metabólico, responsável pela detoxificação de várias substâncias, sendo que os produtos metabólicos nocivos produzidos em outros órgãos podem indiretamente afetá-lo. O fígado apresenta conteúdo substancial de proteínas e enzimas com grande capacidade anti-oxidante (Ji 1993; Burneik *et al.*, 2006). Além disso, o fígado pode ser um dos principais locais para a oxidação da LDL pelo citocromo P450 (Aviram *et al.*, 1999), um dos eventos primários e mais importantes para início da aterosclerose. Assim, o balanço oxidativo do fígado é de fundamental importância para compreensão dos mecanismos da aterosclerose e vem sendo amplamente estudado (Ramirez-Tortosa *et al.*, 2008; Ishigaki *et al.*, 2008).

Quanto ao efeito da polpa de açaí e da prática de exercício físico sobre as enzimas antioxidantes, a atividade da SOD e da CAT foram analisadas no fígado. A SOD reduziu apenas nos dois grupos treinados (açaí mais exercício e somente exercício). A atividade da SOD aumentada no grupo controle knockout ApoE pode ser o resultado do aumento na produção de EROS induzida pelo

modelo knockout ApoE que, conseqüentemente, ativa mecanismos nucleares para contornar o quadro de estresse oriundo do próprio modelo, por ser mais susceptível a lesão. Quando os animais tratados, tanto com dieta normal quanto com açai, foram submetidos ao treinamento físico, ocorreu uma redução na concentração de SOD o que não aconteceu com o grupo apenas tratado com Açai.

Com relação a atividade da CAT, os resultados encontrados na literatura para esta enzima são controversos. Alguns estudos mostraram um aumento na sua atividade (Pinho *et al.*, 2006), outros uma diminuição (da Silva *et al.*, 2009) ou não alteram em função dos tratamentos (Alessio e Goldfarb 1980). A ambigüidade destes resultados pode ser devido a uma variedade de fatores, incluindo divergência de protocolos. A maioria dos ensaios envolvem a degradação de seu substrato H_2O_2 que é acompanhada espectrofotometricamente, portanto, a atividade da CAT é dependente não só do montante de proteína CAT, mas também da concentração de H_2O_2 que é usada como substrato (Ji 1995).

No presente trabalho a CAT não apresentou diferença estatística entre os tratamentos e o controle. Este fato pode ser explicado pelo balanço enzimático SOD/CAT. A SOD catalisa a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 , e este produto uma vez produzido precisa ser destruído, visto que participa da reação que produz o radical hidroxila (a EROS mais reativa nos sistemas biológicos). O H_2O_2 é então eliminado pelas enzimas antioxidantes, CAT e glutatona peroxidase (GSH-Px) (Powers e Jackson, 2008). Como o estresse oxidativo foi reduzido e a atuação da SOD foi menor (produzindo menor quantidade de H_2O_2) a CAT pode não ter sofrido alterações significativas.

No entanto, mostrou-se que a prática de atividade física teve um efeito positivo sobre a enzima antioxidante atividades de SOD e CAT, sugerindo que prática regular de atividade física pode reduzir o ambiente de tensão causado pelo modelo aterogênico.

Neste cenário, a não atuação do Açai da Mata Atlântica na redução ou estabilização da placa ou na melhora do potencial oxidativo pode ser explicado pela constituição e processamento do próprio fruto. A polpa utilizada para a confecção da dieta foi feita a base de água e a literatura mostra que as

antocianinas são solúveis em água e podem ser facilmente extraídas com solventes polares, dentre eles os solventes alcoólicos, como metanol e etanol, são os mais utilizados (Lee e Hong 1992; Revilla *et al.*, 1998; Terci 2004; Stintzing *et al.*, 2006; Macz-pop *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006). Muitos trabalhos têm empregado solventes extratores alcoólicos acidificados (Revilla *et al.*, 1998; Macz-pop *et al.*, 2006) para favorecer a extração, pois auxilia a penetração do solvente nos tecidos das frutas e vegetais, além de aumentar a estabilidade dos extratos por dificultar o aparecimento de fungos que degradam as antocianinas.

Alem disso, a estabilidade das antocianinas presentes no fruto pode ser influenciada por temperaturas de extração e de armazenamento (Kirca *et al.*, 2006; Amr e Al-tamimi 2007), exposição à luz (Lee e Hong 1992), variações de pH e ação de agentes oxidantes (Kirca *et al.*, 2006; Türker e Erdogdu 2006; Revilla *et al.*, 1998; Macz-pop *et al.*, 2006) e também condições de cultivo, crescimento e fertilização (Siriwoharn *et al.*, 2004; Syvacy e Sökmen 2004). Outro fator que deve ser observado é a quantidade de liofilizado adicionado a dieta, pode ter sido pequena a ponto de não provocar alterações no quadro geral da aterosclerose.

Com isso conclui-se que apenas o treinamento físico poderá ter influenciado na alteração da lesão aterosclerótica e este fato foi confirmado com uma melhora no potencial antioxidante no fígado dos animais knockout ApoE, não provocando alterações no perfil lipídico do sangue. O Açaí da Mata Atlântica isolado não foi capaz de provocar alterações nas lesões, nas enzimas antioxidantes ou no perfil lipídico, provavelmente em função da concentração utilizada ou do protocolo de extração.

4.5. Referências

- A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemistry. Official Methods of Analysis of A. O. A. C. 14 ed. Whashington; A. O. A. C., 1989.
- AEBI, H. Catalase in Vitro. *Methods of Enzimology*, v.105, p.121-127, 1984.
- ALESSIO, H. M.; GOLDFARB, A. H. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptative response to training. *Journal of Applied Physiology*, v. 64, p. 1333-1336,1988.
- ALP, P.R.; NEWSHOLME, E.A.; ZAMMIT, T.A. Activities of citrate synthase and NAD+linked and NADP+linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochem J.*, v. 154, p. 689-700, 1976.
- AMR, A.; AL-TAMIMI, E. Stability of the crude extracts of *Ranunnculus asiaticus* anthocyanins and their use as food colorants. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 42, n. 8, p. 285, 2007.
- AVIRAM, M.; KENT, U. M.; HOLLENBERG, P. F. Microsomal cytochromes P450 catalyze the oxidation of low density lipoprotein. *Atherosclerosis*, v. 143, n. 2, p. 253-260, 1999.
- BAZZANO, L.A.; HE, J.; OGDEN, L.G.; LORIA, C.M.; VAPPUTURI, S.; MYERS, L.; WHELTON, P.K. Fruit and vegetable and risk or cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition examination survery epidemiologic follow-up study. *American Journal Clinical Nutrition*, v.76, p. 93-99, 2002.
- BRAZ JR, D. J.; GUTIERREZ, P. S.; DA LUZ, P. L. Coronary fat content evaluated by morphometry in patients with severe atherosclerosis has no relation with serum lipid levels. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 40, n. 4, p. 467-473, 2007.
- BRITO, E.S.; ARAUJO, M.C.P.; ALVES, R.E.; CARKEET, C.; CLEVIDENCE, B.A.; NOVOTNY, J.A. Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits: Acerola, Jambolão, Jussara, and Guajiru. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 55, n. 23, 2007.
- BURNEIK, R. C.; DINIZ, Y. S.; GALHARDI, C. M.; RODRIGUES, H. G.; EBAID G. M.; FAINE, L. A. Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. *Food Chemistry Toxicol*, v. 44, p. 1167-1172, 2006.
- CAL, R. G. R.; FIGUEIREDO, L. F. Poli de. Tipo e intensidade de exercício em relação a doença coronariana. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v. 48 n. 4, p. 275-96, 2002.
- CHANG, Y.C.; HUANG, K.X.; HUANG, A.C.; HO, Y.C.; WANG, C.J. Hibiscus anthocyanins-rich extract inhibited LDL oxidation and oxLDL-mediated

- macrophages apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*, v. 44, p. 1015–1023, 2006.
- CHEN, P. N.; CHU, S. C.; CHIOU, H. L.; KUO, W. H.; CHIANG, C. L.; HSIEH, Y. S. Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. *Cancer Letters*, v. 235, n. 2, p. 248, 2006.
- COBEA. Ethical Principles for the use of laboratory animals. *Brazilian College on Animal Experimentation*. 2009.
- DA SILVA, L. A., C. A. PINHO, ROCHA, L. G.; TUON, T.; SILVEIRA, P. C.; PINHO, R. A. Effect of different models of physical exercise on oxidative stress markers in mouse liver. *Appl Physiol Nutr Metab*, v.34, n.1, Feb, p.60-5. 2009.
- DAS, U. N. Anti-Inflammatory Nature of Exercise. *Nutrition*, v. 20, p. 323–326, 2004
- DIETERICH, S.; BIELIGK, U.; BEULICH, K.; HASENFUSS G.; PRESTLE, J. Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart: Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. *Circulation*, v. 101, p. 33-39, 2000.
- DUNCAN, E. R.; WALKER, J. S.; EZZAT, V. A.; WHEATCROFT, S. B.; LI, J-M.; SHAH, A. M.; KEARNEY, M. T. Accelerated endothelial dysfunction in mild prediabetic insulin resistance: the early role of reactive oxygen species. *American Journal Physiology. Endocrinology Metabolism*. v. 293, p.1311–1319, 2007.
- EMBRAPA. Sistema e produção do açaí, 2005. Disponível em: http://sistemaproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai_1ed/index.htm. Acesso em março de 2009.
- GARCIA-ALONSO, M.; MINIHANE, A.M.; RIMBACH, G.; RIVAS-GONZALO, J.C.; TEREZA, S. P. Red wine anthocyanins are rapidly absorbed in humans and affect monocyte chemoattractant protein 1 levels and antioxidant capacity of plasma. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 20, n. 7, p. 521-529, 2008.
- GUEDES, M.C. Antocianinas: pigmento natural ou remédio? *Editorial da Revista Científica do Instituto Manchester Paulista de Ensino Superior (IMAPES)*, Sorocaba, São Paulo, Brasil, p. 71-73, 2004.
- HOFFMAN-GOETZ, L.; PERVAIZ, N.; GUAN, J. Voluntary exercise training in mice increases the expression of antioxidant enzymes and decreases the expression of TNF- α in intestinal lymphocytes. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 23, p. 498–506, 2009.
- ISHIGAKI, Y.; KATAGIRI, H.; GAO, J.; YAMADA, T.; IMAI, J.; UNO, K.; HASEGAWA, Y.; KANEKO, K.; OGIHARA, T.; ISHIHARA, H.; SATO, Y.; TAKIKAWA, K.; NISHIMICHI, N.; MATSUDA, H.; SAWAMURA, T.; OKA, Y. Impact of plasma oxidized low-density lipoprotein removal on atherosclerosis. *Circulation*, v. 118, n. 1, p. 75-83, 2008.

- JI, L.L. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Medicine Science Sports Exercise*, v. 25, p. 225–231, 1993.
- JI, L. L. Exercise and oxidative stress: role of the cellular antioxidant systems. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, v. 23, p. 135–166, 1995.
- KIRCA, A.; OZKAN, M.; CEMEROGLU, B. Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars. *Food Chemistry*, v. 97, n. 4, p. 598, 2006.
- KONG, J., CHIA, L., GOH, N., CHIA, T., BROUILLARD, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, v. 64, p. 923–933, 2003.
- LAKKA, T. A.; LAUKKANEN, J.A.; RAURAMAA, R.; SALONEN, R.; LAKKA, H.-M.; KAPLAN, G. A.; SALONEN, J. T. Cardiorespiratory Fitness and the Progression of Carotid Atherosclerosis in Middle-Aged Men. *Annals of Internal Medicine*. v.134, n. 1, 2001.
- LEE, H. S.; HONG, V. Chromatographic analysis of anthocyanins. *Journal of Chromatography A*. v. 624, n. 1-2, p. 221, 1992
- LIN, S.S. Efeito no tamanho e maturidade sobre a viabilidade, germinação e vigor do fruto de Palmiteiro. *Revista Brasileira de Sementes*, vol. 8, n. 1, p. 57-66, 1988.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J.; Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* v.193, p.265-75, 1951.
- MACZ-POP, G. A.; RIVAS-GONZALO, J. C.; PÉREZ-ALONSO, J. J.; GONZALÉZPARAMÁS, A. M. Natural occurrence of free anthocyanin aglycones in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, v. 94, n. 3, p. 448, 2006.
- MAEDA, S.; TANABE, T.; MIYAUCHI, T.; OTSUKI, T.; SUGAWARA, J.; IEMITSU, M.; KUNO, S.; AJISAKA, R.; YAMAGUCHI, I.; MATSUDA, M. Aerobic exercise training reduces plasma endothelin-1 concentration in older women. *J Appl Physiol*, v. 95, p. 336–341, 2003.
- MEILHAC, O.; RAMACHANDRAN, S.; CHIANG, K.; SANTANAM, N.; PARTHASARATHY, S. Role of Arterial Wall Antioxidant Defense in Beneficial Effects of Exercise on Atherosclerosis in Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 21, p. 1681 – 1688, 2001.
- MIRANDA, M.S.; MANCINI-FILHO, J. Conseqüências dos radicais livres em alimentos. *Laes & Haes*, v.104, p. 110-117, 1997.
- MIYAZAKI, K.; MAKINO, K.; IWADATE, E.; DEGUCHI, Y.; ISHIKAWA, F. Anthocyanins from Purple Sweet Potato *Ipomoea batatas* Cultivar Ayamurasaki Suppress the Development of Atherosclerotic Lesions and Both Enhancements of Oxidative Stress and Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Journal Agricultural Food Chemistry*, v. 56,p. 11485–11492, 2008.

OKABE, T.; SHIMADA, K.; HATTORI, M.; MURAYAMA, T.; YOKODE, M.; KITA, T.; KISHIMOTO, C. Swimming reduces the severity of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice by antioxidant effects. *Cardiovascular Research*, v. 74, p. 537–545, 2007.

PALINSKI, W.; ORD, V.A.; PLUMP, A.S.; BRESLOW, J.L.; STEINBERG, D.; WITZTUM, J.L. ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arterioscler. Thromb.*, v.14, n.4, p. 605-616, 1994.

PARTHASARATHY, S.; LITVINOV, D.; SELVARAJAN, K.; GARELNABI, M. Lipid peroxidation and decomposition-conflicting roles in plaque vulnerability and stability. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1781, n. 5, p. 221-231, 2008.

PELLEGRIN, M.; ALONSO, F.; AUBERT, J. F.; BOUZOURENE, K.; BRAUNERSREUTHER, V.; MACH, F.; HAEFLIGER, J. A.; HAYOZ, D.; BERTHELOT, A.; NUSSBERGER, J.; LAURANT, P.; MAZZOLAI, L. Swimming prevents vulnerable atherosclerotic plaque development in hypertensive 2-kidney, 1-clip mice by modulating angiotensin II type 1 receptor expression independently from hemodynamic changes. *Hypertension*, v. 53, n. 5, p. 782-789, 2009.

PETROVAN, R. J.; KAPLAN, C. D.; REISFELD, R. A.; CURTISS, L. K. DNA vaccination against vegf Receptor 2 Reduces Atherosclerosis in LDL Receptor-Deficient Mice. *American Heart Association*, v. 27, n.5, p 1095-1100, 2007.

PINHO, R.A.; ANDRADES, M.E.; OLIVEIRA, M.R.; PIROLA, A.C.; ZAGO, M.S.; SILVEIRA, P.C.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J.C. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biology International*, v.30, n.10, p.848-853, 2006.

POLI A, MARANGONI F, PAOLETTI R, MANNARINO E, LUPATTELLI G, NOTARBARTOLO A, et al. Non-pharmacological control of plasma cholesterol levels. *Nutr Metab Cardiovas Dis.*, v.18, p. 1-16, 2008.

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

RADAK, Z.; KANEKO, T.; TAHARA, S.; NAKAMOTO, H.; OHNO, H.; SASVARI, M.; NYAKAS, C.; GOTO, S. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med.*, v.27,p.69-74, 1999.

RAMACHANDRAN, S.; PENUMETCHA, M.; MERCHANT, N. K.; SANTANAM, N.; RONG, R.; PARTHASARATHY, S. Exercise reduces preexisting atherosclerotic lesions in LDL receptor knockout mice. *Atherosclerosis*, v. 178, p. 33-38, 2005.

RAMIREZ-TORTOSA, M. C.; GRANADOS, S.; RAMIREZ-TORTOSA, C. L.; OCHOA, J. J.; CAMACHO, P.; GARCÍA-VALDÉS, L.; BATTINO, M.; QUILES, J.

L. Oxidative stress status in liver mitochondria and lymphocyte DNA damage of atherosclerotic rabbits supplemented with water soluble coenzyme Q10. *Biofactors*, v. 32, n. 1-4, p. 263-273, 2008.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition*. v.123, p.1939-51, 1993.

REVILLA, E.; RYAN, J. M.; MARTIN-ORTEGA, G. Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 46, n. 11, p. 4592, 1998.

RIBOLI, E.; NORAT, T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *The American Journal Clinical of Nutrition*. v. 78, p. 559S-569S, 2003.

ROSSO, V.V.; HILLEBRAND, S.; MONTILLAB, E.C.; BOBBIO, F.O.; WINTERHALTER, P.; MERCADANTE, A. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC-PDA-MS/MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 21, p. 291-299, 2008.

SCHAUSS, A. G.; WU, X.; PRIOR, R. L.; OU, B.; PATEL, D.; HUANG, D.; KABABICK, J. P. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Açai). *Journal Agricultural and Food Chemistry*., v. 54, p. 8598-8603, 2006.

SIRIWOHARN, T.; WROLSTAD, R.E.; FINN, C. E.; PEREIRA. C.B. Influence of cultivar, maturity and sampling on blackberry (*Rubus* L. Hybrids) Anthocyanins, polyphenolics, and antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n. 26, p. 8021, 2004.

SIU, P.M.; DONLEY, D.A.; BRYNER, R.W.; ALWAYS. S.E. Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. *J. Appl Physiol*.v.94, n.2, p. 555-560, 2003.

STINTZING, F. C.; STINTZING, A. S.; CARLE, R.; FREI, B.; WROLSTAD, R. E. Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; v. 50, n. 21, p. 6172, 2002.

SYVACY, A.; SÖKMEN, M. Seasonal chances in antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin constituent of the stems of two *Morus species* (*Morus alba* L. and *Morus nigra* L.). *Plant Growth Regulation*, v.44, n. 3, p. 251, 2004.

TEODORO, B.G. *Efeitos da intensidade do treinamento sobre parâmetros de estresse oxidativo e perfil lipídico em camundongos LDL^{-/-}*. 2009. 57 f. Dissertação (Mestrado em Educação Física) - Departamento de Educação Física, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 2009

TERCI, D. B. L. Aplicações analíticas e didáticas de antocianinas extraídas de Frutas. Tese de Doutorado; Instituto de Química – UNICAMP, Campinas, São Paulo, 2004.

TOOMEY, S.; ROCHET, H.; FITZGERALD, D.; BELTON, O. Regression of pre-established atherosclerosis in apoE ^{-/-} mouse by conjugated linoleic acid. *Biochemical Society Transactions*, v. 31, p. 1075-1079, 2003.

TOUFEKTSIAN, M.C.; DE LORGERIL, M.; NAGY, N.; SALEN, P.; DONATI, M.B.; GIORDANO, L.; MOCK, H.P.; PETEREK, S.; MATROS, A.; PETRONI, K.; PILU, R.; ROTILLO, D.; TONELLI, C.; DE LEIRIS, J.; BOUCHER, F.; MARTIN, C. Chronic dietary intake of plant-derived anthocyanins protects the rat heart against ischemiareperfusion injury. *Journal of Nutrition*, v. 138, p. 747–52, 2008.

TSITSILONIS, S.; VLACHOS, I. S.; BAMPALI, A.; REVENAS, K.; VOTTEAS, V.; PERREA, D. N. Sonographic measurements of subcutaneous fat in obese individuals may correlate better with peripheral artery disease indices. *Journal of Clinical Ultrasound*, v. 37, n. 5, p. 263-269, 2009.

TÜRKER, N.; ERDOGDU, F. Effects of pH and temperature of extraction medium on effective diffusion coefficient of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* var. L.). *Journal of Food Engineering*, v. 76, n. 4, p. 579, 2006.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant Drug Analysis: a Thin Layer Chromatography Atlas. 2. ed. Berlin: Springer. 384p, 1996.

WILLIAMS, J.K.; KAPLAN, J.A.; SUPARTO, I.H.; FOX, J.L.; MANUCK, S.B. Effects of Exercise on Cardiovascular Outcomes in Monkeys With Risk Factors for Coronary Heart Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. v. 23; p. 864-871, 2003.

XIA, M.; LING, W.; ZHU, H.; MA, J.; WANG, Q.; HOU, M.; TANG, T.; GUO, H.; LIU, C.; YE, Q. Anthocyanin attenuates CD40-mediated endothelial cell activation and apoptosis by inhibiting CD40-induced MAPK activation. *Atherosclerosis*, v. 202, p. 41–47, 2009.

YANG, H.; ZHOU, L.; WANG, Z. L.; ROBERTS, L. J.; LIN, X.; ZHAO, Y.; GUO, Z. Overexpression of antioxidant enzymes in ApoE-deficient mice suppresses Benzo(a)pyrene-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis*, v. 207, n. 1, p. 51-58, 2009.

5. ARTIGO II

Fotomicrografias representativas do fígado e rim de camundongos *Apo E* -/- tratados com *Euterpe edulis* Martius e exercitados aerobicamente.

Objetivo: avaliar o efeito do exercício regular e do consumo de açaí nas estruturas histopatológicas do fígado e rim de camundongos knockout ApoE

Métodos: Foram utilizados 28 camundongos (ApoE-/-) e 10 camundongos C57Bl/6, com 21 semanas de idade, submetidos a 12 semanas de exercício físico moderado (corrida em esteira atingindo ao final 60 minutos/sessão/dia, 5 dias/semana e velocidade de 15 m/min) e dieta com 2% de polpa de açaí liofilizada. No início do tratamento os animais foram divididos em 5 grupos: : C- Controle negativo – animais C57Bl/6, sem 2% de açaí, não-treinado (n=4); C+ Controle positivo – animais ApoE -/- sem 2% de açaí, não-treinado (n=4); G1 animais ApoE -/- com 2% de açaí, não-treinado (n=6); G2 animais ApoE -/- com 2% de açaí, treinados (n=6); G3 animais ApoE -/- sem 2% de açaí, treinados (n=6). O peso e o consumo alimentar dos camundongos foram avaliados semanalmente. Ao final do tratamento os animais sofreram eutanásia, o fígado, rins, foram removidos e lavados em solução fisiológica, em seguida, conservados em paraformaldeído 10% para as análises histopatológicas.

Resultados: Não houve diferença estatística entre os grupos para peso corporal, consumo e peso do fígado. Nas análises histopatológicas do fígado os grupos treinados apresentaram menor porcentagem de esteatose. No rim os tratamentos não demonstraram alterações no número e área dos glomérulos.

Conclusão: O exercício físico foi capaz de reduzir a deposição de gordura no tecido hepático dos animais knockout ApoE, mas o açaí não afetou a histopatologia dos órgãos estudados.

5.1. Introdução

As doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de morte no mundo, sendo a aterosclerose sua principal representante. A aterosclerose pode ser definida como uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo a íntima das artérias de médio e grande calibre (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007). O controle das lipoproteínas e do estresse oxidativo no organismo são ferramentas importantes no combate a esta doença.

Os ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular podem ser alvo das espécies reativas de oxigênio (ROS), desencadeando reações químicas denominadas peroxidação lipídica (Shao e Heinecke, 2009). Esta modificação oxidativa nas partículas da lipoproteína de baixa densidade (LDL) parece estar ligada a gênese do ateroma (Ishigaki *et al.*, 2008).

Estudos experimentais têm demonstrado que as lipoproteínas potencialmente aterogênicas, como a (LDL), estão associados com alterações renais como insuficiência renal e progressivo dano glomerular, assim como lesões hepáticas. Associado a este fato, têm-se a combinação da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e diminuição das defesas antioxidantes. Esses radicais são altamente reativos e oxidam lipídios insaturados e proteínas das membranas celulares em um processo denominado peroxidação lipídica que culmina em alteração da estrutura e função celular e, eventualmente, morte celular (Boll *et al.*, 2001)

Conduas como mudanças no estilo de vida do paciente, prática de atividade física aeróbica (Meilhac, *et al.*, 2001; Maeda, *et al.*, 2003) e consumo de alimentos (Bazzano, He *et al.*, 2002) ricos em compostos fenólicos são algumas formas de prevenção e tratamento das patologias relacionadas ao sistema cardiovascular.

O exercício físico regular parece ser efetivo na redução do risco cardiovascular (Thompson *et al.*, 2003; Bassuk e Manson, 2005; Gaesser, 2007). Especificamente, o exercício tem demonstrado reduzir a progressão da aterosclerose em pacientes com doença arterial coronariana (Niebauer *et al.*, 1997). De maneira similar, em diversos modelos animais, o exercício regular exerce um efeito benéfico no processo aterosclerótico (Ramachandran *et al.*, 2005; Napoli *et al.*, 2006; Shimada *et al.*, 2007; Pellegrin *et al.*, 2009, Teodoro,

2010). Desta forma, vários consensos e diretrizes de órgãos nacionais e internacionais recomendam um mínimo de 30 minutos de exercício aeróbico por dia, na maioria dos dias da semana, como sendo um elemento chave na redução da magnitude do risco cardiovascular.

Os frutos de *Euterpe Edulis Martiu* também conhecido popularmente como açaí da palmeira juçara ou Açaí da Mata Atlântica, é um exemplo de fruto rico em flavonóides em especial as antocianinas como a cianidina-3-glicosídeo (1358 mg/100g de peso seco) e a cianidina-3-rutinosídeo (1565 mg/100g de peso seco) em maior quantidade (De Brito *et al.*, 2007; Rosso *et al.*, 2008). Este pertence a família Arecaceae e faz parte do mesmo gênero botânico do açazeiro da Amazônia (*Euterpe oleracea* Martiu). É encontrada principalmente em áreas remanescentes da Mata Atlântica do Brasil, inclusive no estado de Minas Gerais (Lin, 1988).

Assim, estudos sobre o estresse oxidativo têm sido direcionados para a descoberta de agentes que atuem no combate aos danos existentes na doença aterosclerótica. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do exercício físico regular e do consumo de açaí nas estruturas histopatológicas do fígado e rim de camundongos knockout ApoE-/-.

5.2. Materiais e Métodos

5.2.1. Dietas

As dietas foram elaboradas de acordo com a *Association of Official Analytical Chemistry* (1989) e AIN-93M (Reeves *et al.*, 1993) sendo confeccionadas manualmente e mantidas sob refrigeração (0 a 4°C) , protegidas da luz, até o momento da utilização.

Para os grupos que receberam 2% de polpa liofilizada dos frutos de *E. edulis*, a composição da dieta foi modificada, levando em consideração os valores de umidade, carboidrato, proteína, lipídios e fibras dietéticas. O valor da quantidade de fibras foi baseado na composição do açaí do Norte (*Euterpe oleraceae* Martius) (Schauss *et al.*, 2006). A Tabela 6 mostra a composição das dietas experimentais.

Tabela 6. Composição das dietas experimentais (g/kg dieta)

Ingredientes	Dieta AIN-93M (g)	AIN-93M com 2% de Açaí liofilizado (g)
Amido (qpc)	515,7	521,3
Amido dextrinizado (15,5%)	155	155
Sacarose(10%)	100	91,6*
Proteína (caseína) (9%)	90	88,6*
Fibra (celulose) (5%)	50	41,2*
Mix de mineral (3,5%)	35	35
Mix de vitamina (1%)	10	10
Bitartarato de colina (0,25%)	2,5	2,5
L-cistina (0,18%)	1,8	1,8
Açaí	-	21,2
Óleo (4%)	40	31,8*
	1000g	1000g

*Para estes ingredientes foi descontado a concentração dos nutrientes presentes no fruto. Em 100g de Açaí da Mata Atlântica liofilizado há 7g de proteínas, 41g de lipídios, 42g de carboidratos e aproximadamente 44,2g de fibras dietéticas (Schaus, *et al.*, 2006). Quantidade energética aproximada: Dieta AIN-93M 380Kcal/100g; Dieta AIN-93M com 2% Açaí 385Kcal/100g.

5.2.2. Animais

Foram utilizados 26 camundongos adultos *knockout* para apolipoproteína E e 9 camundongos adultos *C57Bl/6*, com 21 semanas de vida, procedentes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil. Os animais foram mantidos sob condições controladas de luminosidade (ciclos de 12 horas claridade/escuridão), temperatura (21 ± 2 °C) e umidade relativa do ar (60% - 70%). Todos os procedimentos envolvidos no protocolo experimental foram aprovados pelo Comitê de Ética do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, processo nº 19/2010. O experimento foi conduzido em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA (COBEA, 2009)(Anexo 1).

Após o delineamento experimental os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos: grupo C- Controle Negativo (*C57Bl/6* $n=4$) não-treinado, recebeu dieta AIN-93M; o C+ Controle positivo (*knockout ApoE* $n=4$) não-treinado, recebeu dieta AIN-93M com Açaí 2%; G1 (*knockout ApoE* $n=6$) não-treinado com dieta AIN-93M com Açaí 2%; G2 (*knockout ApoE* $n=6$) treinado com dieta AIN-93M com Açaí 2%; G3 (*knockout ApoE* $n=6$) treinado com dieta AIN-M93.

5.2.3. Protocolo de exercício/corrida em esteira

Os camundongos foram submetidos a um programa progressivo de corrida na esteira (*INSIGHT*, Ribeirão Preto, São Paulo - Brasil), no Biotério de Experimentação Animal do Departamento de Educação Física da Universidade Federal de Viçosa, 5 dias por semana, por 12 semanas consecutivas (adaptado de Meilhac *et al.*, 2001) chegando ao final do experimento a 60 minutos diários com uma velocidade de 16m/min com 0% de inclinação.

5.2.4. Eutanásia e coleta de tecidos

Quarenta e oito horas após a última sessão de exercício os animais foram anestesiados com quetamina (10 mg/kg de peso corporal) e xilazina (2 mg/kg de peso corporal) e sofreram eutanásia por meio do aprofundamento da anestesia seguido de punção cardíaca. Para análise histopatológica e dosagem bioquímica, o fígado e rins foram removidos *in totum* e pesados. Em seguida, os fragmentos foram congelados em nitrogênio líquido (-196 °C) e mantido em freezer - 80 °C. O sangue foi coletado por punção na aorta abdominal e centrifugado a 1750 g durante 10 minutos à 4°C para separação do soro que foi armazenado à -80°C para posteriores análises.

5.2.5. Análise histopatológica

Para análise histopatológica, fragmentos do lóbulo caudado do fígado e os rins foram imersos em solução de Karnovsky durante 24 horas, desidratados em etanol e incluídos em parafina. Secções de 4 µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (Multicut 2045®, Reichert-Jung, Alemanha), coradas com hematoxilina-eosina e montadas com Entellan® (Merck, Alemanha). Para análise do fígado foram capturadas 10 imagens para cada animal utilizando-se objetiva de 20x do microscópio de luz (BX-60®, Olympus, Tokio, Japão) conectado a uma câmera digital (QColor-3®, Olympus, Tokio, Japão). Para a análise dos rins foram capturadas 5 imagens utilizando a objetiva de 20X. Uma grade de 810 pontos foi utilizada sobre as imagens digitalizadas, para quantificar a presença de gotículas lipídicas nos hepatócitos (% por área histológica), além da contagem de pontos sobre capilar sinusóide, citoplasma de hepatócito e núcleo binucleado. Foi analisado o número de glomérulos e a área do glomérulo por fotomicrografia, utilizando-se o software

Image Pro-plus 4.5® (Média Cybernetcs, Silver Spring, USA) (Azevedo et al., 2010).

5.2.6. Análise estatística

Os dados foram inicialmente analisados usando o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a simetria e igualdade de variância (método de Levene), O teste paramétrico de análise de variância para um fator (one way ANOVA) foi usado para comparações envolvendo 3 ou mais grupos com apenas um fator. O teste não paramétrico Kruskal Wallis foi usado quando o teste one way ANOVA era contra indicado. O teste de comparações múltiplas de Tukey foi utilizado quando o teste one way ANOVA detectava diferença estatística. Para situações em que o teste Kruskal Wallis detectava diferença estatística, utilizou-se o teste de comparações múltiplas de Dunn's.

Os resultados foram apresentados como “Média±Desvio Padrão (DP)” quando apenas o teste one way ANOVA foi exigido. Quando o teste não paramétrico Kruskal Wallis foi exigido, os resultados (valores) foram apresentados como “Mediana (Média±DP)”. Para todos os testes utilizados, o erro máximo permitido para assumir a existência de diferença entre os grupos foi de 5% ($p=0,05$). O programa estatístico usado para todas as análises foi o Sigma Stat 3.5.

5.3. Resultados

5.3.1. Consumo alimentar e evolução ponderal

Não houve diferença significativa entre os pesos dos animais nos diferentes grupos no início do experimento ($p>0,05$). Ao final do experimento também não foi observada nenhuma diferença significativa do peso dos animais entre os diferentes grupos de tratamento (figura 8). A figura 9 apresenta a medida do consumo alimentar diário que também não diferiu entre os grupos ($p>0,05$).

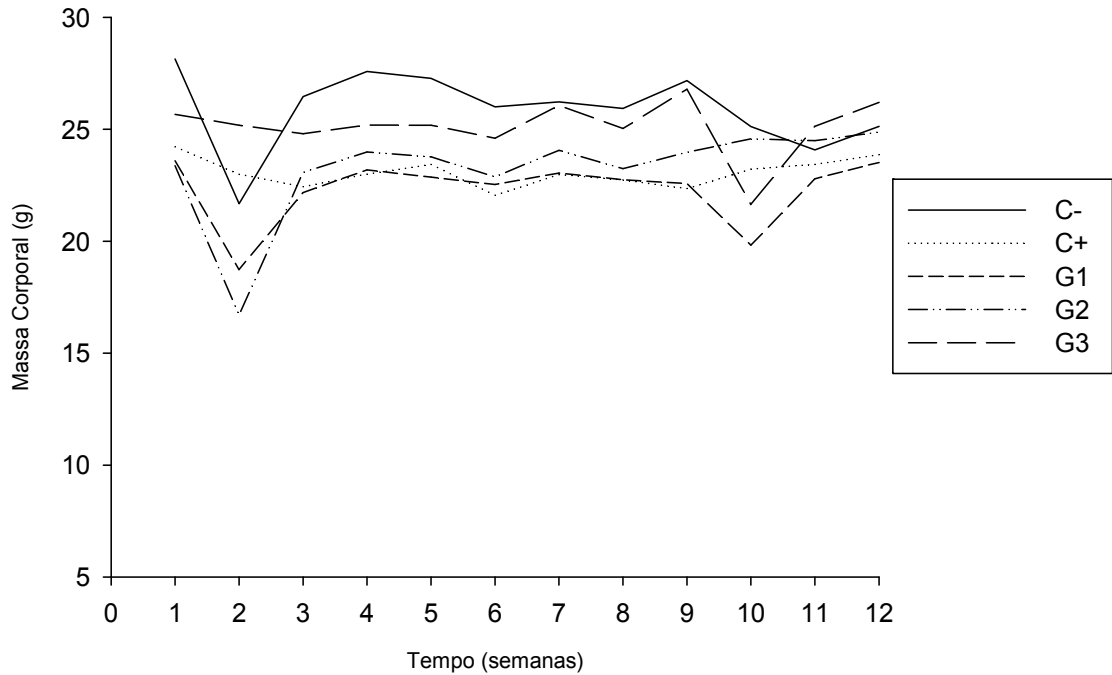


Figura 8 - Evolução da massa corporal durante as 12 semanas de experimento. Dados são expressos em média \pm S.D. ($p < 0,05$), teste one way ANOVA complementados pelo teste de Tukey; C- Controle negativo – C57Bl/6, sem açaí, não-treinado (n=4); C+ Controle positivo – ApoE $-/-$ sem açaí, não-treinado (n=4); G1 ApoE $-/-$ com açaí, não-treinado (n=6); G2 ApoE $-/-$ com açaí, treinados (n=6); G3 ApoE $-/-$ sem açaí, treinados (n=6).

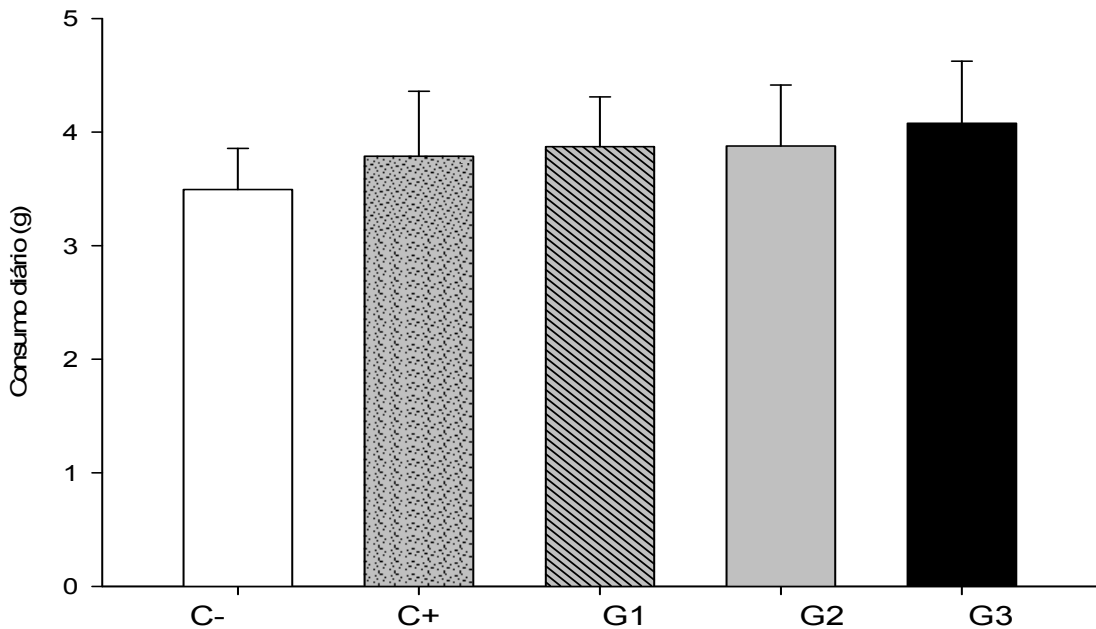


Figura 9 - Consumo alimentar diário dos grupos experimentais. Dados são expressos em média \pm S.D. ($p < 0,05$), teste one way ANOVA complementados pelo teste de Tukey. C- Controle negativo – C57Bl/6, sem açaí, não-treinado (n=4); C+ Controle positivo – ApoE $-/-$ sem açaí, não-treinado (n=4); G1 ApoE $-/-$ com açaí, não-treinado (n=6); G2 ApoE $-/-$ com açaí, treinados (n=6); G3 ApoE $-/-$ sem açaí, treinados (n=6).

5.3.2. Histopatologia de fígado

Na tabela 7 são mostrados dados de hepatócitos uninucleados e binucleados, assim como capilar sinusóide e infiltrado inflamatório. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos em relação a estes parâmetros analisados ($p < 0,05$).

Tabela 7. Porcentagem de estruturas no fígado.

	HEPATÓCITOS	CAPILAR SINUSÓIDE	INFILTRADO INFLAMATÓRIO
C- (n=4)	80,86 ±6,5	8,28±3,26	0,06(0,12±0,17)
C+ (n=4)	74,46±5,04	7,11±2,51	0,24(0,26±0,24)
G1 (n=6)	66,26± 5,75	6,91±1,39	0,43(0,50±0,54)
G2 (n=6)	72,02±2,24	9,95±0,71	0,21(0,24±0,22)
G3 (n=6)	67,13± 4,56	12,40±1,44	0,30(0,30±0,25)

Dados expressos como média ± SD ou mediana(media±DS). ($p < 0,05$), ANOVA one-way, ou Kruskal Wallis. C- Controle negativo – C57Bl/6, sem açaí, não-treinado (n=4); C+ Controle positivo –ApoE -/- sem açaí, não-treinado (n=4); G1 ApoE -/- com açaí, não-treinado (n=6); G2 ApoE -/- com açaí, treinados (n=6); G3 ApoE -/- sem açaí, treinados (n=6).

Na figura 10 pode-se observar o efeito hepatoprotetor da atividade física e do *E. edulis* ao analisar o fígado dos animais dos grupo G2 e G3 que apresentaram proporção de gotículas lipídicas significativamente menor ($p < 0,05$), em relação aos outros grupos.

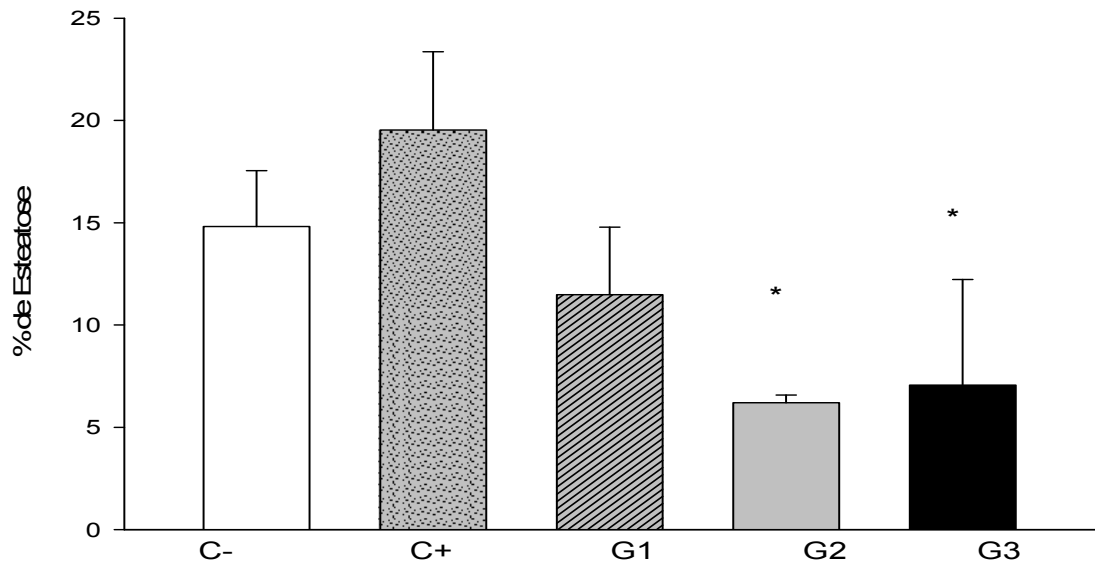


Figura 10 - Efeito da atividade física e do açaí sobre a área histológica de gotículas lipídicas (%) no fígado de camundongos knockout Apo E. Dados em média \pm S.D. (*) indica diferenças estatísticas comparando ao C+ ($p < 0,05$), teste one way ANOVA complementados pelo teste de Tukey. C- Controle negativo – *C57Bl/6*, sem açaí, não-treinado ($n=4$); C+ Controle positivo – ApoE $-/-$ sem açaí, não-treinado ($n=4$); G1 ApoE $-/-$ com açaí, não-treinado ($n=6$); G2 ApoE $-/-$ com açaí, treinados ($n=6$); G3 ApoE $-/-$ sem açaí, treinados ($n=6$).

Na figura 11 podemos analisar a presença desta diferença de gotículas lipídicas. Nos grupos treinados (figura 11D e 11E) a análise morfológica mostra um número diminuído de gotículas lipídicas (GL) comparado ao grupo controle (figura 11B) que apresenta gotículas lipídicas mais numerosas e também volumosas (macrovesiculares). O citoplasma dos hepatócitos destes grupos treinados apresentou-se bastante homogêneo e com as gotas lipídicas menos numerosas e volumosas (microvesiculares).

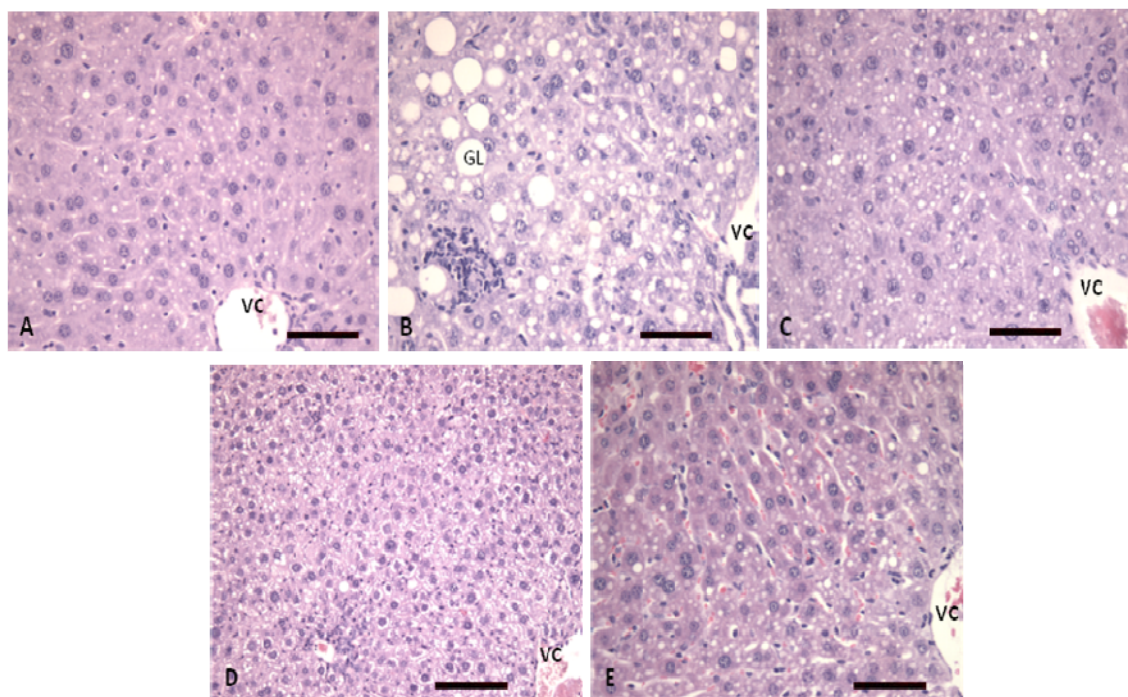


Figura 11 - Fotomicrografia representativas no tecido hepático de camundongos ApoE^{-/-}. A = grupo controle negativo C57Bl/6; B = grupo controle positivo ApoE^{-/-}; C = G1, animais ApoE^{-/-} com açai, não-treinado; D = G2 animais ApoE^{-/-} com açai, treinados; E =G3 animais ApoE^{-/-} sem açai, treinados. Veia Centro lobular (VC); Gotículas lipídicas (GL). Hematoxilina-Eosina (HE),200x . Barra: 65µm.

5.3.3. Histopatologia do rim.

Na tabela 8 são mostrados a área e o número de glomérulos em relação aos diferentes tratamentos. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 8. Valores do número e área dos glomérulos nos grupos experimentais.

	C- (n=4)	C+ (n=4)	G1 (n=6)	G2 (n=6)	G3 (n=6)
Número de Glomérulos (U)	1,95± 0,19	2,00± 0,16	2,05± 0,37	2,15± 0,37	2,5± 0,52
Área do glomérulo (µm²)	2156,68± 464,29	2847,59± 739,79	2470,10± 319,71	2952,25± 222,96	2946,43± 590,27

Dados expressos como média ± S.D. ($p < 0,05$), ANOVA one-way, C- Controle negativo – C57Bl/6, sem açai, não-treinado (n=4); C+ Controle positivo –ApoE^{-/-} sem açai, não-treinado (n=4); G1 ApoE^{-/-} com açai, não-treinado (n=6); G2 ApoE^{-/-} com açai, treinados (n=6); G3 ApoE^{-/-} sem açai, treinados (n=6).

5.4. Discussão

O fígado é um importante órgão responsável por diversos processos metabólicos de desintoxicação do organismo (Ranawat et al., 2010). O desenvolvimento da aterosclerose e conseqüente produção de radicais livres está associado a mudanças na arquitetura de vários órgãos, entre eles fígado e rins (Wu et al., 2007). No presente estudo foi observado a presença de grande quantidade de gotículas lipídicas nos animais ApoE knockout. No entanto, os grupos que foram treinados associados ou não ao açaí apresentaram uma diminuição significativa na porcentagem de gotículas de gordura. Os trabalhos que relacionam atividade física e lesões degenerativas como a esteatose ainda são controversos. Narayan 1975 e Straczkowski et al., 2001 mostraram que a atividade física reduz a quantidade de gotículas lipídicas no fígado dos animais. Por outro lado Terao et al., 1987 e Gauthier et al., 2003 mostraram que o exercício não influencia a deposição de gordura no tecido hepático.

Apesar de não ter sido encontrada diferença significativa entre os grupos exercitados que receberam ou não o açaí, observa-se uma menor quantidade de gordura nos animais que tiveram os dois tratamentos associados. Este fato pode ser justificado pela composição do açaí que é rico em flavonóides em especial as antocianinas (Brito *et al.*, 2007). Essas substâncias têm sido estudadas por ter possíveis efeitos sobre o ataque de radicais livres no corpo através de suas propriedades antioxidantes (Xia *et al.* 2006).

Os rins são órgãos responsáveis pela remoção de restos metabólicos do organismo, regulação do equilíbrio hídrico e eletrolítico além da excreção de substâncias bioativas que afetam o organismo (Eaton e Pooler, 2006). De acordo com Rein *et al.* (2010), a diminuição da função renal pode ser usada como o mais novo marcador de progressão da doença aterosclerótica, uma vez que a diminuição da função renal é conseqüência da ocorrência do dano vascular. No presente estudo os animais ApoE^{-/-} que foram tratados não apresentaram diferença significativa quando comparados aos demais grupos em relação ao número de glomérulos e a área dos mesmos. Nossos achados contrastam com Mulder et al. (2010), que observaram um aumento do volume glomerular em animais sedentários quando comparados aos animais que foram submetidos ao exercício aeróbico. De acordo com Knight et al. (2008) é cada vez mais crescente a relação entre obesidade, hipertensão e aumento das

citocinas pró-inflamatórias com a injúria renal. Estas podem também estar relacionadas a um aumento da permeabilidade do endotélio, provocado pelo excesso de radicais livres que causam danos na membrana. Desta forma, pode haver o aumento da passagem de LDL promovendo a formação da placa aterosclerótica e atrofia glomerular (Unserpater e Inserta, 2004).

Por haver poucos dados na literatura referente às alterações do tecido renal associadas à evolução da placa aterosclerótica com modelos animais treinados ou mesmo associados ao consumo do açaí, nossa intenção é continuar as análises com o intuito de contribuir um pouco mais para a literatura científica.

5.5. Conclusão

Conclui-se que o programa de exercício físico aplicado reduziu o percentual de esteatose hepática, porém, o consumo de açaí da Mata Atlântica isolado não afetou a histopatologia dos órgãos estudados. Os tratamentos com treinamento ou com a adição do açaí não provocaram alterações no número e estrutura do glomérulo renal.

5.6. Referências

ALBANO, E. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proc Nutr Soc*, v.65, n.3, Aug, p.278-90. 2006.

ALP, P. R., E. A. NEWSHOLME, *et al.* Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochem J*, v.154, n.3, Mar 15, p.689-700. 1976.

AZEVEDO, M.H.F., PAULA T.A.R., MATTA, S.L.P., FONSECA, C.C., COSTA, E.P., COSTA, D. S., PEIXOTO, J.V. Cell population indexes of spermatogenic yield and testicular sperm reserves in adult jaguars (*Panthera onca*). *Animal Reproduction Science* 118, 83-88, 2010.

BASSUK, S. S. E J. E. MANSON. Epidemiological evidence for the role of physical activity in reducing risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease. *J Appl Physiol*, v.99, n.3, Sep, p.1193-204. 2005.

BAZZANO, L. A., J. He, *et al.* Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study. *Am J Clin Nutr*, v.76, n.1, Jul, p.93-9. 2002.

BOLL, M., WEBER, L.W., BECKER, E., STAMPFIL, A. Mechanism of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Hepatocellular damage by reactive carbon tetrachloride metabolites. *Journal of Biosciences* 56, 649-59, 2001

BRITO, E.S.; ARAUJO, M.C.P.; ALVES, R.E.; CARKEET, C.; CLEVIDENCE, B.A.; NOVOTNY, J.A. Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits: Acerola, Jambolão, Jussara, and Guajiru. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 55, n. 23, 2007.

COBEA. Ethical Principles for the use of laboratory animals. *Brazilian College on Animal Experimentation*. 2009.

DAUGHERTY A. Mouse models of atherosclerosis. *American Journal of the Medical Sciences*, v. 323, p.3-10, 2002.

DE BRITO, E. S., M. C. DE ARAUJO, *et al.* Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolao, jussara, and guajiru. *J Agric Food Chem*, v.55, n.23, Nov 14, p.9389-94. 2007.

EATON D.C., POOLER J.P. Fisiologia renal de Vander. 6.ed. Porto Alegre: Editora Artmed, p.256, 2006.

GAESSER, G. A. Exercise for prevention and treatment of cardiovascular disease, type 2 diabetes, and metabolic syndrome. *Curr Diab Rep*, v.7, n.1, Feb, p.14-9. 2007.

GAUTHIER, M. S.; COUTURIER, K. LATOUR, J. G.; LAVOIE, J. M.; Concurrent exercise prevents high-fat-diet-induced macrovesicular hepatic steatosis. *J Appl Physiol*, v.94, n.6, Jun, p.2127-34. 2003.

HA, K.T., YOONA, S.J., CHOIA, D.Y., KIMB, D.W., KIMA, J.K., KIM, C.K. Protective effect of *Lycium chinense* fruit on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 96, p.529-535, 2005.

ISHIGAKI, Y., H. KATAGIRI, *et al.* Impact of plasma oxidized low-density lipoprotein removal on atherosclerosis. *CIRCULATION*, v.118, n.1, Jul 1, p.75-83. 2008.

KEANE, W. F., B. L. KASISKE, *et al.* Lipids and progressive glomerulosclerosis. A model analogous to atherosclerosis. *Am J Nephrol*, v.8, n.4, p.261-71. 1988.

KNIGHT S.F., QUIGLEY J.E., YUAN J., ROY S.S., ELMARAKBY A., IMIG J.D. Endothelial dysfunction and the development of renal injury in spontaneously hypertensive rats fed a high-fat diet. *Hypertension*, v.51, p.352-359, 2008.

KODAMA, N., H. OTANI, *et al.* Involvement of MCP-1 and M-CSF in glomerular foam cell formation in ExHC rats. *Kidney Int Suppl*, v.71, Jul, p.S174-7. 1999.

KONO, H., ASAKAWA, M., FUJI, H., MAKI, A., AMEMIYA, H., YAMAMOTO, M., MATSUDA, M., MATSUMOTO, Y. Edaravone, a novel free radical scavenger, prevents liver injury and mortality in rats administered endotoxin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* v.307, p.74-82. 2003.

LIN, S. S. Efeito no tamanho e maturidade sobre a viabilidade, germinação e vigor do fruto de Palmeiro. *Revista Brasileira de Sementes*,v.8, p. 57-66 p. 1988.

MAEDA, S., T. TANABE, *et al.* Aerobic exercise training reduces plasma endothelin-1 concentration in older women. *J Appl Physiol*, v.95, n.1, Jul, p.336-41. 2003.

MEDINA, J. E R. MORENO-OTERO. Pathophysiological basis for antioxidant therapy in chronic liver disease. *Drugs*, v.65, n.17, p.2445-61. 2005.

MEILHAC, O., S. RAMACHANDRAN, *et al.* Role of arterial wall antioxidant defense in beneficial effects of exercise on atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.21, n.10, Oct, p.1681-8. 2001.

MULDER A.P., AGUILA M.B., BREGMAN R., LACERDA C.A. M. Exercise counters diet-induced obesity, proteinuria, and structural kidney alterations in rat. *Pathology – Research and Practice*, v.206, p.168–173, 2010.

NAPOLI, C., S. WILLIAMS-IGNARRO, *et al.* Physical training and metabolic supplementation reduce spontaneous atherosclerotic plaque rupture and prolong survival in hypercholesterolemic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.103, n.27, Jul 5, p.10479-84. 2006.

NARAYAN, K. A., J. J. MCMULLEN, *et al.* Effect of exercise on tissue lipids and serum lipoproteins of rats fed two levels of fat. *J Nutr*, v.105, n.5, May, p.581-7. 1975.

NIEBAUER, J., R. HAMBRECHT, *et al.* Attenuated progression of coronary artery disease after 6 years of multifactorial risk intervention: role of physical exercise. *Circulation*, v.96, n.8, Oct 21, p.2534-41. 1997.

PAI, R., M. A. KIRSCHENBAUM, *et al.* Low-density lipoprotein stimulates the expression of macrophage colony-stimulating factor in glomerular mesangial cells. *Kidney Int*, v.48, n.4, Oct, p.1254-62. 1995.

PELLEGRIN, M., C. MIGUET-ALFONSI, *et al.* Long-term exercise stabilizes atherosclerotic plaque in ApoE knockout mice. *Med Sci Sports Exerc*, v.41, n.12, Dec, p.2128-35. 2009.

RAMACHANDRAN, S., M. PENUMETCHA, *et al.* Exercise reduces preexisting atherosclerotic lesions in LDL receptor knockout mice. *Atherosclerosis*, v.178, n.1, Jan, p.33-8. 2005.

RANAWAT, L., BHATT, J., PATEL, J., Hepatoprotective activity of ethanolic extracts of bark of *Zanthoxylum armatum* DC in CCl₄ induced hepatic damage in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.127, p.777-780, 2010.

REIN P., SAELY C.H., MUENDLEIN A., VONBANKA A., DREXEL H. Serial decline of kidney function as a novel biomarker for the progression of atherothrombotic disease. *Atherosclerosis*, v.211, p.348–352, 2010.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition*. v.123, p.1939-51, 1993.

ROSENSON R.S., LOEWE G.D.. Effects of lipids and lipoproteins on thrombosis and rheology. *Atherosclerosis*, v.140, p.271-80, 1998.

ROSSO, V. V., S. HILLEBRAND, *et al.* Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC–PDA–MS/MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.21 p.291-299. 2008.

SCHAUSS, A. G., X. WU, *et al.* Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart. (acai). *J Agric Food Chem*, v.54, n.22, Nov 1, p.8598-603. 2006.

SHAO, B. E J. W. HEINECKE. HDL, lipid peroxidation, and atherosclerosis. *J Lipid Res*, v.50, n.4, Apr, p.599-601. 2009.

SHIMADA, K., KISHIMOTO,C. *et al.* Exercise training reduces severity of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice via nitric oxide. *Circ J*, v.71, n.7, Jul, p.1147-51. 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemia e Prevenção da Aterosclerose. *Arq. Bras. Cardiol.*, v.88, suppl.1, São Paulo, 2007.

STRACZKOWSKI, M.; KOWALSKA, I.; DZIENIS-STRACZKOWSKA, S.; KINALSKI, M.; GORSKI, J.; KINALSKA, I. The effect of exercise training on glucose tolerance and skeletal muscle triacylglycerol content in rats fed with a high-fat diet. *Diabetes Metab.* v. 27, n.1, p. 19–23, 2001.

TEODORO, B.G. *Efeitos da intensidade do treinamento sobre parâmetros de estresse oxidativo e perfil lipídico em camundongos LDL^{-/-}*. 2009. 57 f. Dissertação (Mestrado em Educação Física) - Departamento de Educação Física, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 2009

TERAO, T., FUJISE, T., NAKANO, S.. Effects of long-term exercise and high-cholesterol diet on lipid-lipoprotein metabolism in rats. *Tokai J Exp Clin Med*, v.12, n.4, Nov, p.243-51. 1987.

THOMPSON, P. D., D. BUCHNER, *et al.* Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: a statement from the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention) and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity). *Circulation*, v.107, n.24, Jun 24, p.3109-16. 2003.

UNSERPATER M, INSERTA F. Pérdida de proteínas urinarias como marcador de daño renal no glomerular y de riesgo cardiovascular. *Rev. Nefrol. Dial. Transpl.* v. 24, p. 81–86, 2004.

XIA, M.; LING, W.; ZHU, H.; MA, J.; WANG, Q.; HOU, M.; TANG, T.; GUO, H.; LIU, C.; YE, Q. Anthocyanin attenuates CD40-mediated endothelial cell activation and apoptosis by inhibiting CD40-induced MAPK activation. *Atherosclerosis*, v. 202, p. 41–47, 2009.

WU Y., LI, L., WEN, T., LI, Y-Q.,. Protective effects of echinacoside on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Toxicology*, v.232, p.50-56. 2007.

6. CONCLUSÃO GERAL

Os resultados deste estudo sugerem que a quantidade de açaí proposta na dieta dos animais não foi suficiente para alterar positivamente o processo de aterosclerose neste modelo animal. Contudo o treinamento físico isolado provocou uma diminuição da área das lesões ateroscleróticas.

O treinamento físico também reduziu a atividade da SOD no fígado, sugerindo uma melhora no quadro oxidativo do modelo em questão.

Outro achado importante foi a atuação do treinamento físico na redução da deposição de gordura no tecido hepático dos grupos.

7. ANEXO

7.1. Anexo 1

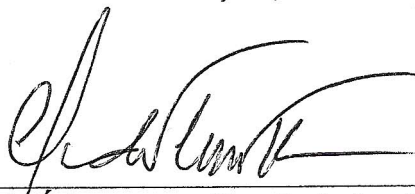
CERTIFICADO

A Comissão de Ética do DVT / UFV certifica que o processo n. ° 19/2010, intitulado “**Atividade antiaterogênica dos frutos de Euterpe edulis Martius (Açaí da Mata Atlântica) associado ao exercício físico em camundongos Apoe**” coordenado pela Professora Maria do Carmo Gouveia Peluzio do Departamento de Nutrição e Saúde, do está de acordo com o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a legislação vigente, tendo sido aprovado por esta Comissão em 20/10/2010.

CERTIFICATE

The Ethic Committee of DVT / UFV certify that the process number 19/2010, named “**Antiatherogenic activity of Euterpe edulis Martius fruit (Açaí of Atlantic) associated to exercise in Apoe mice**” is in agreement with the Medical Veterinary Professional Ethics Code, with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and with actual Brazilian legislation. This Departmental Commission on October 20, 2010 approved this process.

Viçosa, 20 de outubro de 2010



Comissão de Ética para o Uso de Animais da UFV
(CEUA / UFV)