

1. INTRODUÇÃO GERAL

A modificação oxidativa das partículas de LDL é considerada um dos principais eventos na indução e progressão da aterosclerose. Os resultados de estudos experimentais e epidemiológicos têm sugerido que a maior taxa de lipoperoxidação está associada às doenças cardiovasculares (Kriparides & Estocker, 2002; Petrovan et al., 2007).

A aterosclerose tem sido a causa principal de doenças coronarianas. Ela é causada pelo aumento das lipoproteínas (LDL, IDL, VLDL, e remanescentes de quilomícrons) no plasma e turbulências hemodinâmicas. Como consequência, ocorre uma disfunção endotelial, aumentando a permeabilidade da íntima às lipoproteínas plasmáticas favorecendo a retenção destas no espaço subendotelial. Retidas, as partículas de LDL sofrem oxidação, causando a exposição de diversos neo-epítópos, tornando-as imunogênicas. Assim, devido a uma ativação endotelial ocorre um recrutamento de leucócitos e com isso inicia-se um centro de desenvolvimento e progressão de placas ateroscleróticas causando complicações clínicas (Petrovan et al., 2007).

Tratamentos, tais como, mudanças no estilo de vida do paciente, medicamentos, antihipertensivos, aspirina (para diminuir o potencial de coagulação sanguínea), drogas para diminuir a colesterolemia (Sinvastatinas e Lovastatinas), cirurgia ou angioplastia, têm sido usados no tratamento da aterosclerose (Toomey et al., 2003). No entanto, em alguns casos, estes tipos de tratamentos não têm demonstrado ser efetivos na cura e, até mesmo na prevenção das patologias relacionadas ao sistema cardiovascular.

Para o estudo desta doença, têm ocorrido vários avanços com o uso de camundongos geneticamente modificados. Alguns destes animais possuem um gene deletado para a apolipoproteína E (apoE) ou para o receptor de lipoproteína de baixa densidade, desenvolvendo 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).

Como forma de atenuar ou diminuir a ocorrência do processo aterosclerótico, os lipídeos têm sido, nas últimas duas décadas, importante ponto de pesquisa em saúde e nutrição. Sendo assim, existe um grande interesse em estudar os efeitos benéficos destes compostos sobre a saúde humana, especialmente na prevenção e tratamento das doenças cardiovasculares, como: enfarte do miocárdio, angina *pectoris*, acidente vascular cerebral e aterosclerose.

O ácido linoleico conjugado (CLA) tem sido investigado pelos seus efeitos benéficos na prevenção e tratamento de doenças em uma variedade de modelos experimentais, incluindo modelos de obesidade, diabetes tipo 2, câncer e doenças cardiovasculares (Parodi, 1999; Pariza et al., 2000). Em se tratando de doenças coronarianas, observa-se que o CLA pode diminuir a extensão da aterosclerose (Kritchevsky et al., 2002; Toomey et al., 2003; Bhattacharya et al., 2006). Segundo o estudo de Toomey et al. (2003), a administração do isômero cis 9 e trans 11 do CLA em camundongos *knockout* para o gene da ApoE, com lesões ateroscleróticas pré-estabelecidas, não só retardou a progressão, como também induziu à regressão de lesões na aorta.

O possível mecanismo para explicar o efeito do CLA na aterosclerose seria a habilidade em alterar o metabolismo hepático dos lipídios e lipoproteínas (Mitchell et al., 2005). Devido às suas características físicas, semelhantes aos ácidos graxos insaturados, há especulações de que o CLA pode operar como um ligante de vários receptores nucleares (Pariza et al., 2000), como os PPAR (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor*), que são fatores críticos no metabolismo de lipídios no fígado e tecido adiposo (Taylor & Zahradka, 2004).

Outra forma de prevenir ou reverter a formação de placas ateromatosas nas artérias tem sido a utilização de exercícios físicos semanais para o condicionamento cardiovascular (Lakka et al., 2001; Maeda et al., 2003; Das, 2004). Mesmo quando realizados com baixa freqüência, ou seja, 2 a 3 vezes por semana, numa intensidade moderada (40% a 60% do VO₂max), têm demonstrado ser eficazes na redução das doenças coronarianas (Willians et al., 2003).

Estudos têm-se realizados para a comprovação dos efeitos benéficos da atividade física aeróbica na redução e prevenção de doenças coronarianas (Meilhac et al, 2001; Cal & Figueiredo, 2002; Maeda et al., 2003), utilizando-se tanto humanos quanto animais. Cal & 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% dos pesquisados. Em um estudo feito com mulheres pedalando 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, como diminuição da pressão arterial e do colesterol total (Maeda et al., 2003).

Resultados semelhantes aos anteriores foram constatados em estudos com animais (Meilhac et al., 2001; Napoli et al., 2004). Por exemplo, Napoli et al. (2004) submeteram camundongos *Knockout* para o receptor de 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 sérico no desenvolvimento da aterosclerose.

O avanço das pesquisas abordando o CLA e o Exercício Físico como possível modulador do processo aterogênico é satisfatório, porém é necessário esclarecer o seu papel na prevenção e controle desta doença crônica. Sendo assim, pesquisas devem ser conduzidas com enfoque voltado para as situações que ocorrem no cotidiano dos indivíduos suscetíveis às doenças crônicas.

Referências Bibliográficas

1. Kritaharides L, Stocker R. The use of antioxidant supplements em coronary heart disease. *Atheroscl.* 2002; 164: 211-219.
2. Petrovan RJ, Kaplan CD, Reisfeld RA, Curtiss LK. DNA vaccination against VEGF receptor 2 reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27(5): 1095-100.
3. Jackson CL et al. Assessment of Unstable Atherosclerosis in Mice. *Am H Assoc.* 2007; 27(4): 714-720.
4. Toomey S, Roche H, Fitzgerald D, Belton o. Regression of pre-established atherosclerosis in apoE -/- mouse by conjugated linoleic acid. *Bioch Soc Trans.* 2003;31:1075-1079.
5. Pariza MW, Park Y, Cook M. Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. *Proc Soc Exp Bio Med.* 2000; 223: 8-13.
6. Parodi PW. Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. *Journal of Dairy Science.* 1999; 82: 1339-1349.
7. Bhattacharya A, Banu J, Rahman M, Causey J, Fernandes G. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *J Nutr Biochem.* 2006; 17(12): 789-810.
8. Kritchevsky DST, Tepper SA, Wright S, Czarnechi SK. Influence of graded levels of conjugated linoleic acid (CLA) on experimental atherosclerosis in rabbits. *Nutr Res.* 2002; 22: 1275-9.
9. Mitchell PL, Langille MA, Currie DL, McLeod RS. Effect of conjugated linoleic acid isomers on lipoproteins and atherosclerosis in the Syrian Golden hamster. *Biochim Biophys Acta* 2005;1734:269–76.
10. Taylor CG, Zahradka P. Dietary conjugated linoleic acid and insulin sensitivity and resistance in rodent models. *Am J Nutr* 2004; 79: 1164s – 1168.
11. Das UN. Anti-Inflammatory Nature of Exercise. *Nutr* 2004; 20: 323–326.
12. Maeda S. et al. Aerobic exercise training reduces plasma endothelin-1 concentration in older women. *J Appl Physiol* 2007; 95: 336–341.
13. Lakka TA, Laukkanen JA, Salonen R, Lakka HM, Kaplan GA, Salonen JT. Cardiorespiratory fitness and the progression of carotid atherosclerosis in middle-age men. *Ann Int Med* 2001;134:12–20.

14. Williams JK, Kaplan JR, 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.
15. Cal RGR, Figueiredo LF. Poli de. Tipo e intensidade de exercício em relação a doença coronariana. *Rev Assoc Med Br.* 2002; 48(4): 275-96.
16. 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.* 2001; 21(10): 1681-8.
17. Napoli C, Williams-Ignarro S, Nigris F, Lerman LO, Rossi L, Guarino C, Mansueto G, Tuoro F, Pignalosa O, Rosa G, Sica V, Ignarro L. Long-term combined beneficial effects of physical training and metabolic treatment on atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Proc Natl Acad Sci.* 2004; 101: 8797 – 8802.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a interação da dieta hiperlipídica, do ácido linoleico conjugado e do exercício físico no metabolismo lipoproteico de camundongos geneticamente modificados para aterosclerose.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos do ácido linoleico conjugado (CLA) associado à dieta hiperlipídica sobre as lipoproteínas plasmáticas e ganho de peso de camundongos Apo E ^(-/-) exercitados;
- Avaliar os efeitos do exercício físico associado a dieta hiperlipídica sobre o colesterol total, LDL e ganho de peso de camundongos Knockout para a Apo E suplementados com ácido linoleico conjugado.
- Avaliar os efeitos da combinação de exercício físico e ácido linoleico conjugado na progressão de aterosclerose de camundongos knockout para o gene da Apo E alimentados com dietas normo e hiperlipídica.

3. ARTIGO DE REVISÃO

Aterosclerose: mudanças associadas à alimentação, suplementação com ácido linoleico conjugado e exercício físico.

Resumo

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre. Condutas como, mudanças no estilo de vida do paciente, uso de medicamentos antihipertensivos e drogas para baixar o colesterol, cirurgias ou angioplastias, têm sido utilizadas no tratamento da aterosclerose. No entanto, em alguns casos, estes tipos de tratamentos não têm sido efetivos na cura ou na regressão da aterosclerose e, até mesmo na prevenção das patologias relacionadas ao sistema cardiovascular. A redução da quantidade de gorduras na dieta e o tipo de gordura ingerida está diretamente ligado às doenças coronarianas, estando cada vez mais claro que o efeito dessas na saúde humana depende da fonte e natureza dos ácidos graxos. O CLA pode modular a resposta celular do fator de necrose tumoral alfa, influenciando negativamente a expressão desses genes pró-inflamatórios. O consumo de CLA, também tem demonstrado efeito benéfico sobre o perfil lipídico e anti-aterogênico em diferentes modelos experimentais, como coelhos, camundongos e hamsters. Exercícios físicos semanais para o condicionamento cardiovascular, também têm sido utilizados como forma de prevenir ou reverter a formação de placas ateromatosas nas artérias. Mesmo quando realizados com baixa freqüência, ou seja, 2 a 3 vezes por semana, numa intensidade moderada, são eficazes na redução das doenças coronarianas.

Palavras-chaves: Dislipidemia; Suplementação, Atividade Física; Ômega 3;

3.1 Introdução

A aterosclerose tem sido a causa principal de doenças coronarianas. É causada por uma inflamação progressiva na parede dos vasos sanguíneos, resultado da acumulação de lipoproteínas, devido um aumento desta no plasma e turbulências hemodinâmicas. Devido a uma ativação endotelial ocorre um recrutamento de leucócitos no local onde as lipoproteínas se acumularam e, com isso inicia-se um centro de desenvolvimento e progressão de placas aterogênicas que poderá causar complicações clínicas (Petrovan et al., 2007). Para o estudo desta doença, vários avanços têm ocorrido, principalmente, com o uso de camundongos geneticamente modificados. Alguns destes animais possuem um gene deletado para a expressão da apolipoproteína E (apoE) (responsável pelo transporte do LDL plasmático até o fígado) ou para o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL) (receptor responsável pela captação da LDL no fígado). Desta forma, ocorre um aumento da LDL no plasma, desenvolvendo lesões ateroscleróticas espontaneamente em muitos locais nas artérias. Em ambos os modelos experimentais, o desenvolvimento da lesão é acelerado quando estes são conduzidos a uma dieta com alto teor de gordura saturada (Jackson et al., 2007).

A redução da quantidade de gorduras na dieta é recomendada por várias instituições, incluindo a Organização Mundial da Saúde (OMS), Associação Americana do Coração (AHA) e a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC), como forma de tratamento profilático para diferentes desordens relativas ao metabolismo lipídico. Outro aspecto a ser levado em consideração, é o tipo de gordura ingerida (gorduras saturadas e insaturadas), estando cada vez mais claro que o efeito dessas na saúde humana depende da fonte e natureza dos ácidos graxos (Madsen et al., 2005).

Condutas como, mudanças no estilo de vida do paciente, medicamentos antihipertensivos, aspirina (para diminuir o potencial de coagulação sanguínea), drogas para baixar o colesterol (Sinvastatinas e Lovastatinas), cirurgias ou angioplastias, têm sido utilizadas no tratamento da aterosclerose (Toomey et al., 2003). No entanto, em alguns casos, estes tipos de tratamentos não têm sido efetivos na cura ou na regressão da aterosclerose e, até mesmo na prevenção das patologias relacionadas ao sistema cardiovascular.

Pariza et al. (2000), mostraram que o CLA pode modular a resposta celular do fator de necrose tumoral alfa, influenciando negativamente a expressão desses genes pró-inflamatórios. O consumo de CLA, também tem demonstrado efeito benéfico sobre

o perfil lipídico e anti-aterogênico em diferentes modelos experimentais, como coelhos (Lee, Kritchevsky e Pariza, 1994), camundongos (Munday, Thompson e James, 1999) e hamsters (Wilson et al., 2000).

Exercícios físicos semanais para o condicionamento cardiovascular também têm sido utilizados como forma de prevenir ou reverter a formação de placas ateromatosas nas artérias (Lakka et al., 2001; Maeda et al., 2003; Das, 2004). Mesmo quando realizados com baixa freqüência, ou seja, 2 a 3 vezes por semana, 30 minutos por sessão, numa intensidade moderada (40% a 60% do VO₂max), são eficazes na redução das doenças coronarianas e eventos associados (Willians et al., 2003). A comprovação dos efeitos benéficos da atividade física na redução e prevenção de doenças coronarianas pode ser observada no estudos de Meilhac et al. (2001), Cal e Figueiredo (2002) e Maeda et al. (2003).

Para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na gênese da aterosclerose e sua associação com o ácido linoleico conjugado na dieta aliada ao exercício físico, fez-se uma ampla revisão dos dados disponíveis na literatura nos últimos 10 anos.

3.2 Considerações gerais sobre aterosclerose, alimentação, ácido linoleico conjugado e exercício físico.

3.2.1 Processo aterosclerótico

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007). A formação da placa aterosclerótica inicia-se com a agressão ao endotélio vascular devida a fatores de risco como elevação das lipoproteínas aterogênicas (LDL, IDL, VLDL, remanescentes de quilomícrons), hipertensão arterial, tabagismo e sedentarismo (Santos et al., 2008). Como consequência, a disfunção endotelial aumenta a permeabilidade da íntima às lipoproteínas plasmáticas favorecendo a retenção destas no espaço subendotelial. Retidas, as partículas de LDL sofrem oxidação, causando a exposição de diversos neo-epítópos, tornando-as imunogênicas (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007). O depósito de lipoproteínas na parede arterial, processo-chave no início da aterosclerose, ocorre de maneira proporcional à concentração dessas lipoproteínas no plasma (Petrovan et al., 2007).

Além do aumento da permeabilidade dos vasos, outra manifestação da disfunção endotelial é o surgimento de moléculas de adesão leucocitária na sua superfície, processo estimulado pela presença de LDL oxidada (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007). As moléculas de adesão são responsáveis pela atração de monócitos e linfócitos para a parede arterial. Induzidos por proteínas quimiotáticas, os monócitos migram para o espaço subendotelial onde se diferenciam em macrófagos, que por sua vez captam as LDL oxidadas (Sanz & Fayad, 2008). Os macrófagos repletos de lípides são chamados células espumosas e são o principal componente das estrias gordurosas, lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose (Santos et al., 2008). Mediadores da inflamação estimulam a migração e proliferação das células musculares lisas da camada média arterial para a íntima. Estas, ao migrarem para a íntima, passam a produzir não só citocinas e fatores de crescimento, como também matriz extracelular que formará parte da capa fibrosa da placa aterosclerótica (Sanz & Fayad, 2008).

Nos últimos anos, tem-se evidenciado o papel da inflamação na fisiopatogenia da aterosclerose e ocorrência de eventos aterotrombóticos como determinantes nas doenças arteriais coronarianas (DAC) (Ridker et al., 1998). Observou-se ainda que esse processo pode aparecer no início da vida, devido às fatores genéticos, inatividade física e alimentação rica em gorduras. As estrias gordurosas na aorta podem se desenvolver na infância, e as placas fibrosas podem ser observadas antes dos 20 anos de idade (Rabelo, 2001). A placa aterosclerótica plenamente desenvolvida é constituída por elementos celulares, componentes da matriz extracelular e núcleo lipídico (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007). Estes elementos formam na placa aterosclerótica, um núcleo lipídico rico em colesterol e a capa fibrosa, rica em colágeno (Santos et al., 2008).

As placas estáveis caracterizam-se pela presença de colágeno, organizado em capa fibrosa espessa, escassas células inflamatórias e núcleo lipídico de proporções menores (Rabelo, 2001). As instáveis, apresentam atividade inflamatória intensa, especialmente nas suas bordas laterais, com grande atividade proteolítica, núcleo lipídico proeminente e capa fibrótica tênue (Santos et al., 2008). A ruptura desta capa expõe material lipídico altamente trombogênico, levando à formação de um trombo sobrejacente (Ridker et al., 1998). Este processo, também conhecido por aterotrombose, é um dos principais determinantes das manifestações clínicas da aterosclerose.

Os fatores que contribuem para o desenvolvimento da aterosclerose são a hiperlipoproteinemia, o aumento da agregação plaquetária, a diminuição das células endoteliais vasculares e o aumento da proliferação de células lisas. Os leucócitos,

monócitos e macrófagos estão presentes na lesão aterosclerótica, sugerindo processo inflamatório ao longo do seu desenvolvimento (Sanz & Fayad, 2008).

3.2.2 Alimentação e saúde

A alimentação rica em gordura é comprovadamente um dos fatores indutores da obesidade, tanto em animais experimentais como em humanos (Feoli et al., 2003; Jen et al., 2003), ainda que não seja acompanhada por ingestão hipercalórica. Isso ocorre porque o tipo de gordura influencia as funções metabólicas e leva a mudanças no peso e/ou composição corporal (Gaíva et al., 2003). Além de induzir a obesidade, a ingestão excessiva de gorduras também favorece o aparecimento de todas as co-morbidades relacionadas a ela, como a hipertensão arterial, o diabetes mellitus, as hiperlipidemias e as doenças cardiovasculares (Feoli et al, 2003).

A gordura abdominal visceral observada entre os obesos mostra-se como tecido metabolicamente ativo, apresentando uma alta taxa de renovação (Calle, 1999). O tecido gorduroso visceral mostra-se muito sensível à ação lipolítica das catecolaminas e dos ácidos graxos livres (AGL) resultantes da lipólise que chegam ao fígado pelo sistema portal. O maior aporte hepático de AGL tem como consequências uma redução na captação e degradação da insulina, aumento na neoglicogênese e maior produção hepática de glicose.

Ácidos graxos livres e triglicerídeos, em maiores quantidades na circulação sistêmica, alcançam o músculo esquelético e reduzem a captação de glicose induzida pela insulina, favorecendo a elevação dos níveis glicêmicos que por sua vez estimulam a produção de insulina. A hiperinsulinemia, atuando no sistema nervoso central, age aumentando a atividade do sistema nervoso simpático, gerando um estado hiperadrenérgico que promove vasoconstrição na musculatura e contribui para a elevação dos níveis da pressão arterial. Além disso, tanto a insulina quanto o aumento da atividade simpática podem estimular a reabsorção renal de sódio, que também contribuirá para a elevação da pressão arterial (Reaven et al., 1996; Hall, 2000).

A insulina pode atuar como um hormônio vasodilatador, induzindo aumento do fluxo sanguíneo para a musculatura esquelética, um efeito que parece ser mediado pelo óxido nítrico. Entretanto, estes efeitos são acentuadamente diminuídos em pacientes obesos e hipertensos, portadores de resistência à insulina. Além deste possível comprometimento da vasodilatação, que poderia contribuir ainda mais para a elevação da pressão arterial, o decréscimo do fluxo sanguíneo para a musculatura esquelética

poderia, também determinar uma redução no aproveitamento periférico de glicose, agravando o estado de resistência à insulina (Carneiro et al., 2003).

A terapia nutricional deve, portanto, ser adotada na prevenção e no tratamento das doenças coronarianas, onde o plano alimentar deverá contemplar questões culturais, regionais, sociais e econômicas, devendo ser agradável ao paladar e visualmente atraente. O paciente deverá receber também orientações relacionadas à seleção, quantidade, técnicas de preparo e substituições dos alimentos. Para reduzir a ingestão de colesterol, deve-se diminuir o consumo de alimentos de origem animal, em especial as vísceras, leite integral e seus derivados, embutidos, frios, pele de aves e frutos do mar (camarão, ostra, marisco, polvo, lagosta). Para diminuir o consumo de ácidos graxos saturados, aconselha-se a redução da ingestão de gordura animal (carnes gordurosas, leite e derivados), de polpa e leite de coco e de alguns óleos vegetais, como os de dendê (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007).

3.2.3 Ácido linoleico conjugado (CLA) como nutriente funcional

Em 1987, o grupo de Michael Pariza da Universidade de Wisconsin (Madison) fez uma observação sobre o CLA, onde misturas de posições de isômeros dienoícos de ácido linoleico isolado da carne de boi grelhada inibiu quimicamente a neoplasia induzida na pele de camundongos (Ha et al., 1987). Esta descoberta conduziu o grupo à várias pesquisas, examinando os efeitos do CLA no câncer, função imune, aterosclerose, ganho de peso pela ingestão de alimentos ricos no composto e avaliação das alterações da composição corporal.

CLA é a denominação comum de um grupo heterogêneo de ácidos graxos de uma cadeia de 18 carbonos com duas duplas ligações, formadas através da biohidrogenação e oxidação por processos naturais (Bocca et al., 2007). Na molécula não há nenhum grupo metileno separando as duplas ligações como ocorre no ácido linoléico. Ao invés disso, há uma dupla ligação conjugada (as duplas ligações estão separados por uma ligação simples) com configuração em cis (c) ou trans (t), onde as mais estudadas são apresentadas em posições c9, t11 e t10, c12. (Bhattacharya et al., 2006).

O CLA é encontrado naturalmente em produtos animais, especialmente, animais ruminantes, onde é sintetizado por bactérias do rúmen. Também pode ser sintetizado em animais não ruminantes e encontrado na carne destes (Whigham et al., 2000). As

principais fontes dietéticas de CLA são 3-4 mg/g em carne de boi e 5-7 mg/g em leite e manteiga. Pode, também, ser encontrado em óleos de semente (açafrão e girassol), com concentração de 0,01 a 0,12% dos ácidos graxos totais (Alasnieri et al., 2002).

Em uma revisão feita por Bhattacharaya et al. (2006), foram demonstrados vários estudos relacionando os efeitos do CLA na doença cardiovascular, composição corporal, medula óssea, resistência à insulina, mediadores de respostas inflamatórias e diferentes tipos de câncer. Os efeitos retratados nesta revisão são divergentes, pois alguns estudos demonstraram efeitos benéficos e outros demonstraram efeitos maléficos do CLA nos indivíduos. Pesquisas com CLA têm demonstrado que somente os isômeros c9, t11 e t10, c12 podem trazer algum tipo de benefício à saúde da população, porém alguns estudos ainda não são conclusivos.

3.2.4 Exercício físico e prevenção de doenças

Inatividade física é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, câncer de cólon e mama, obesidade, hipertensão, osteoporose e depressão (Warburton et al., 2006). Em um estudo foi observado que mulheres que não faziam exercício físico tinham o risco aumentado de morte por doenças coronarianas comparadas com outras que praticavam atividade física regularmente, independente de outros fatores de risco (Hassan et al., 2004).

Foi observado em outro estudo que, pessoas fisicamente ativas tinham concentrações mais baixas de algumas citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 6 (IL-6); proteína C reativa (CRP) e outros marcadores da inflamação (fibrinogênio e glóbulos brancos). Além disso, neste mesmo estudo, o exercício físico crônico atenuou o processo inflamatório, reduzindo concentrações circulantes de citocinas pró-inflamatórias (Nicklas et al., 2004).

O exercício físico regular está associado com um decréscimo na incidência de eventos cardiovasculares (Hakkin et al., 1998; Manson et al., 2002). O treinamento físico melhora a função endotelial e a capacidade física de pacientes com DAC (Benardinelli et al., 2001), melhora a insuficiência cardíaca crônica (Hambrecht et al., 1998) e melhora a doença arterial periférica (Stewart et al., 2002). Além disso, a atividade física está associada com melhora no humor, manutenção ou perda de peso corporal, manutenção ou diminuição da pressão arterial e aumento da sensibilidade à insulina (Wannamethee et al., 2002).

Com relação aos exercícios de intensidade alta, é verificado um aumento muito expressivo na formação de radicais livres, com isso favorecendo uma peroxidação lipídica e não atenuação da lesão arterial aterogênica. Sendo assim, há uma associação inversa entre intensidade da atividade física e o risco de eventos coronarianos (Napoli et al., 2004).

3.3 A relação da Aterosclerose com a alimentação

O aumento da ingestão de alimentos com elevada densidade energética e elevado conteúdo de gordura são fatores comuns ao estilo de vida ocidental. Desta forma, alguns efeitos indesejáveis podem ocorrer à saúde, tais como as dislipidemias. Estas se caracterizam por alterações dos níveis sanguíneos dos lipídeos circulantes, podendo levar à aterosclerose, que é uma alteração nas paredes das artérias de médio e grande calibres, onde ocorre espessamento da camada íntima com a perda da elasticidade e posterior calcificação devido à deposição da LDL (Shils et al., 2005).

Os fatores de risco para aterosclerose como o tabagismo, hipertensão arterial sistêmica, baixos níveis de HDL, altos níveis de LDL, história familiar de doença cardiovascular prematura e idade superior a 45 anos nos homens e 55 nas mulheres, influenciam e podem acelerar fortemente o início de lesões ateroscleróticas (Fuster et al., 1996). Níveis elevados de triglicerídos, se não forem fator de risco isolado para aterosclerose, prejudicam os reais efeitos da LDL e HDL no plasma (Austin, 1999).

Um importante aspecto a ser levado em consideração, é o tipo de gordura que deve ser ingerida (gorduras saturadas ou insaturadas). No entanto, é cada vez mais claro que o efeito dessas na saúde humana depende da fonte e natureza dos ácidos graxos (Madsen et al., 2005). Os ácidos graxos mono e poliinsaturados (PUFA) relacionam-se com a melhoria do perfil lipídico, sendo utilizados, portanto, no tratamento e prevenção de várias doenças (Lehninger, Nelson e Cox, 2002).

Pesquisas e investigações clínicas têm estudado o metabolismo dos ácidos graxos poliinsaturados e, em particular, dos ácidos graxos n-3. Atualmente, sabe-se que estes apresentam um papel importante e efeito benéfico na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, aterosclerose, trombose, hipertrigliceridemia, hipertensão, diabetes, artrite, doenças auto-imunes e câncer (Salem, 1999; Uauy & Valenzuela, 2000). O consumo elevado de alimentos ricos em PUFA n-3, entretanto, pode levar ao consumo inadequado de gorduras totais e também de PUFA n-6. A maioria dos alimentos que contém PUFA n-3 também apresenta grandes quantidades de PUFA n-6,

os quais têm atividades que favorecem a exacerbação de processos inflamatórios (Murray et al., 2002).

Os efeitos hipotrigliceridêmicos e hipocolesterolêmicos dos ácidos graxos poliinsaturados n-3 e n-6 se devem à redução da atividade de enzimas hepáticas relacionadas com a síntese de ácidos graxos, como ácido graxo sintase, glicose-6-fosfato desidrogenase e lipase triacilglicerol (Iritani, 1998; Ikeda, 1998) e com o aumento da atividade relacionada com a oxidação dos ácidos graxos, como da enzima carnitina-palmitoil-transferase hepática (Yoshida et al., 1999). Esses achados benéficos dos PUFAs têm feito com que a ingestão de gorduras, principalmente de origem animal, seja reduzida; sendo substituídas pelo consumo das gorduras de origem vegetal, representadas pelos ácidos graxos mono e poliinsaturados (NCEP, 2001).

As dietas do Ocidente apresentam a razão n-6/n-3 de aproximadamente 20 a 30:1, valores muito elevados quando comparados com aqueles considerados ideais, que seriam de 5 a 10:1 (Simopoulos et al., 1999). Os elevados valores da razão n-6/n-3 geram um desbalanceamento de ácidos graxos no organismo humano e, provavelmente, contribuem para o desenvolvimento de processos inflamatórios, desordem do sistema imune, hipertensão e disfunções neurológicas (Kinsella, 1986; Ross, 2003).

O consumo excessivo da classe n-6 na dieta pode levar a alterações fisiológicas que propiciam a exacerbação de quadros inflamatórios. Isso acontece devido à formação exagerada de eicosanóides pró-inflamatórios e devido à supressão das funções imunológicas como a produção de anticorpos (Sijben et al., 2001; Pasqualini et al., 2005).

3.4 Ácido linoleico conjugado e o tratamento da aterosclerose

O ácido linoleico conjugado (CLA) é investigado pelos seus efeitos benéficos na prevenção e tratamento de doenças em uma variedade de modelos experimentais, incluindo obesidade, diabetes tipo 2, câncer e doenças cardiovasculares (Pariza et al., 2000; Parodi, 1999). Observou-se que o CLA pode diminuir a extensão da aterosclerose, como foi demonstrado em modelos experimentais (Kritchevsky et al., 2002; Toomey et al., 2003; Bhattacharya et al., 2006).

Segundo o estudo de Toomey et al. (2003), a administração do isômero cis 9 e trans 11 de CLA em camundongos *Knockout* para o gene da ApoE, com lesões ateroscleróticas pré-estabelecidas, não só retardou a progressão, como também induziu à regressão de lesões na aorta. O mecanismo potencial para explicar este efeito do CLA

na aterosclerose é a habilidade em alterar o metabolismo hepático dos lipídios e lipoproteínas (Mitchell et al., 2005).

Devido às suas características físicas, semelhantes aos ácidos graxos insaturados, há especulações de que o CLA pode operar como um ligante de vários receptores nucleares (Pariza et al., 2000), como os PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptor), que são fatores críticos no metabolismo de lipídios no fígado e tecido adiposo (Taylor e Zahradka, 2004).

Num estudo de Kritchevsky et al. (2002), foram verificados efeitos na diminuição da severidade da lesão da artéria aorta de coelhos alimentados com 0,05, 0,075, 0,1 e 0,5% de CLA por um período de 90 dias. De acordo com Toomey et al. (2006), o CLA induz a redução da aterosclerose por regular negativamente a expressão de genes pró-inflamatórios, como o PPAR alfa e o PPAR gama, e induzir apoptose nas lesões ateroscleróticas.

Como foi retratado anteriormente, estudos com animais têm demonstrados efeitos positivos do uso de ácido linoleico conjugado na regressão da aterosclerose. Estudos com humanos são escassos, devido a dificuldade de controlar variáveis como prática de atividade física e padrões alimentares. No entanto, de acordo com Benito et al. (2001), a ingestão de 3,9 g de CLA por dia pode melhorar o perfil lipídico, reduzindo ou mantendo os níveis de lipoproteínas aterogênicas. Porém, no estudo de Smedman & Vessby (2001), não foi verificado efeitos nas concentrações de lipoproteínas plasmáticas em indivíduos que ingeriram 4,2 g de CLA por dia durante 12 semanas. Sendo assim, se faz necessário realizar estudos que pesquisem, não só a quantidade de CLA que deve ser ingerido, como também, por quanto tempo esta suplementação deve ser feita para poder ser efetiva na regressão da aterosclerose.

3.5 Exercício físico e sua relação com a aterosclerose

A atividade física regular constitui medida auxiliar para o controle das dislipidemias e tratamento da doença arterial coronariana. A prática de exercícios físicos aeróbios promove redução dos níveis plasmáticos de triglicerídeos (TG), aumento dos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL), porém sem alterações significativas sobre as concentrações de LDL. O nível elevado de HDL atua, positivamente, sobre os níveis de LDL, diminuindo a quantidade desta no plasma, levando a uma diminuição na formação de placas ateroscleróticas, bem como ajudando a estabilizar as já existentes (Williams et al., 2002).

A Associação Americana do Coração estabelece então que, a partir dos 2 anos de idade, o incentivo à adoção de um estilo de vida ativo deve ser iniciado e mantido por toda a adolescência até a vida adulta. E, como orientação geral, as crianças saudáveis devem ser encorajadas a praticar atividade física, de forma prazerosa, no lazer ou sob a forma de exercícios físicos programados ou em atividades esportivas, no mínimo trinta minutos por dia, três a quatro vezes por semana, para adquirir aptidão física (Williams et al., 2002; Kavey et al., 2003).

Nas atividades aeróbias, recomenda-se como intensidade a zona alvo situada entre 60 e 80% da freqüência cardíaca máxima (FCmax.), estimada em teste ergométrico. Na vigência de medicamentos que modifiquem a FCmax., como os betabloqueadores, a zona alvo permanecerá 60 a 80% da FCmax. obtida no teste em vigência do tratamento (Barter, 2005). Quando estiver disponível avaliação ergoespirométrica, a zona alvo deverá ser definida pela FC situada entre o limiar anaeróbio (limiar 1) e o ponto de compensação respiratória (limiar 2).

Caso não seja possível estimar a FCmax. em teste ergométrico convencional ou os limiares 1 e 2 na ergoespirometria, as atividades devem ser controladas pela escala subjetiva de esforço, devendo ser caracterizadas como leves ou moderadas. O componente aeróbio das sessões de condicionamento físico deve ser acompanhado por atividades de aquecimento, alongamento e desaquecimento. Exercícios de resistência muscular localizada podem ser utilizados, com sobrecargas de até 50% da força de contração voluntária máxima, porém como complemento ao treinamento aeróbio.

Como o sedentarismo é um importante fator de risco para a aterosclerose, o exercício físico regular é de grande relevância na prevenção e no controle das doenças cardiovasculares (DCV), influenciando quase todos os seus fatores de risco, como a obesidade, as dislipidemias, o diabete melito e a hipertensão arterial (Jenkins, 1988). Os benefícios associados ao estilo de vida ativo incluem o controle do peso corporal, a menor pressão arterial e a predisposição para manutenção da atividade física na idade adulta, fatores que estão relacionados com o aumento da expectativa de vida e menor risco de desenvolvimento das DCV.

Em uma revisão feita por Prado e Dantas (2002), observou-se que a maior parte dos estudos tem demonstrado modificações benéficas nos níveis do HDL e LDL após um programa de exercícios aeróbios, com diferentes intensidades, durações e freqüências, realizados por indivíduos de variadas faixas etárias e níveis de aptidão cardiorrespiratória. Corroborando esses achados, Matsudo et al. (2005), em sua revisão,

apontaram que a prática regular de atividade física aumenta o HDL, diminui triacilgliceróis e LDL e, ainda, aumenta a sensibilidade à insulina. Ainda têm se demonstrado efeitos favoráveis de treinamento aeróbico sobre a atividade da lipase lipoprotéica que explicaria o melhor retorno da lipoproteína rica em triglicerídeo.

O treinamento aeróbio regular intensifica a perda de gordura, mas não impede a perda de massa magra, enquanto o treinamento resistido parece minimizar essa perda. Sendo assim, a combinação do trabalho aeróbio ao treinamento de força parece, então, garantir uma concomitante perda de gordura e manutenção de massa magra e, consequentemente, minimizar as possíveis reduções nas taxas metabólicas (Matsudo et al., 2005).

Como é sabido, o processo aterosclerótico antecede as manifestações clínicas das DCV por anos, até mesmo décadas, e que a prática regular de atividade física diminui a incidência de morbidade e mortalidade pelas DCV, parece ser prudente minimizar ou reduzir os fatores de risco para DCV conhecidos para o adulto. Além disso, a atividade física parece ser um fator protetor importante para a prevenção e controle das DCV, por influenciar quase todos os seus fatores de risco (Williams et al., 2002).

Indivíduos com disfunção ventricular, em recuperação de eventos cardiovasculares ou cirurgias, ou mesmo aqueles que apresentem sinais e sintomas com baixas ou moderadas cargas de esforço, devem ingressar em programas de reabilitação cardiovascular supervisionado, de preferência em equipe multidisciplinar. Para isto, deve ocorrer uma avaliação clínica, além de teste ergométrico ou teste cardiorespiratório em esforço (ergoespirometria) para determinação da capacidade física individual e da intensidade de treinamento a ser preconizada. O programa de treinamento físico, para a prevenção ou para a reabilitação, deve incluir exercícios aeróbios, tais como, caminhadas, corridas leves, ciclismo, natação e, se possível aliá-los a um treinamento resistido com até 50% da carga máxima para evitar as possíveis perdas de massa magra.

3.6 Considerações Finais

Há muito tem-se demonstrado que o aumento do consumo de gordura associa-se à elevação da concentração plasmática de colesterol e à maior incidência de atherosclerose coronária e aórtica. A terapia nutricional deve, portanto, ser adotada na prevenção e no tratamento das dislipidemias, onde o plano alimentar deverá contemplar questões culturais, regionais, sociais e econômicas, devendo ser agradável ao paladar e

visualmente atraente. O paciente deverá receber também orientações relacionadas à seleção, quantidade, técnicas de preparo e substituições dos alimentos.

De maneira geral, o exercício aeróbico e o ácido linoleico conjugado, pode atuar tanto na prevenção, quanto no tratamento da aterosclerose. Em relação ao exercício, ainda não há consenso de qual intensidade levaria à melhores resultados no processo aterosclerótico. Já em relação ao CLA, a administração de 3 a 6 gramas por dia do isômero cis 9 e trans 11 têm sido mais efetivo na prevenção da aterosclerose, porém mais estudos devem ser feitos para comprovar seus efeitos. Porém, nada destes tratamentos são efetivos se a alimentação não for de qualidade, ou seja, com uma diminuição na ingestão de gorduras saturadas, além de um equilíbrio entre os ácidos graxos n-6 e n-3 e consumo de fibras e alimentos funcionais. A Sociedade Brasileira de Cardiologia (2007) tem sugerido a ingestão de 50 a 60% de carboidratos, cerca de 15% de proteínas, e 25 a 35% de lipídios, sendo estes divididos em uma ingestão inferior a 7% de gorduras saturadas, menos de 10% de ácidos graxos e, menos de 20% de ácidos graxos poliinsaturados.

Apesar de diferentes metodologias, algumas evidências parecem estar claras. De maneira aguda, o exercício físico de alta intensidade pode elevar o aumento do risco coronariano primário, aumentando o stress oxidativo, diminuindo a função vasodilatadora do organismo, aumentando inflamação e agregação plaquetária. Portanto, podendo ser contra-indicado em pessoas com aterosclerose. Cronicamente, a atividade física de baixa a moderada intensidade, têm demonstrado efeitos benéficos e, algumas vezes malefícios desses fatores. Sendo assim, é necessário mais estudos, tanto em humanos quanto em modelos animais, para melhor elucidar qual a intensidade ideal do treinamento aeróbico e, qual a quantidade diária de suplementação de CLA para que ocorram os possíveis efeitos na prevenção, na progressão e até mesmo na regressão da aterosclerose.

Referências Bibliográficas

1. Petrovan RJ, Kaplan CD, Reisfeld RA, Curtiss LK. DNA vaccination against VEGF receptor 2 reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27(5): 1095-100.
2. Jackson CL, Bennett MR, Biessen EAL, Jason L, Krams R. Assessment of Unstable Atherosclerosis in Mice. *Am H Assoc.* 2007; 27(4):714-720.
3. Madsen L, Petersen RK, Kristiansen K. Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta.* 2005 v. 1740, p. 266-286.
4. Toomey S, Roche H, Fitzgerald D, Belton o. Regression of pre-established atherosclerosis in apoE $-/-$ mouse by conjugated linoleic acid. *Bioch Soc Trans.* 2003;31:1075-1079.
5. Pariza MW, Park Y, Cook M. Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. *Proc Soc Exp Bio Med.* 2000; 223:8-13.
6. Lee KN, Kritchevsky D, Pariza MW. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 1994;108:19–25.
7. Munday JS, Thompson KG, James KA. Dietary conjugated linoleico acids promote fatty streak formation in the C57BL/6 mouse atherosclerosis model. *Br J Nutr* 1999;81:251– 5.
8. Wilson TA, Nicolosi RJ, Chrysam M, Kritchevsky D. Conjugated linoleic acid reduces early aortic atherosclerosis greater than linoleic acid in hypercholesterolemic hamsters. *Nutr Res* 2000;20:1795–805.
9. Das UN. Anti-Inflammatory Nature of Exercise. *Nutrition.* 2004; 20: 323–326.
10. Lakka TA, Laukkanen JA, Salonen R, Lakka HM, Kaplan GA, Salonen JT. Cardiorespiratory fitness and the progression of carotid atherosclerosis in middle-age men. *Ann Int Med* 2001;134:12–20.
11. Maeda S, Tanabe T, Miyauchi T, Sugawara J, Iemitsu M, Kuno S, Ajisaka R, Matsuda M. Aerobic exercise training reduces plasma endothelin-1 concentration in older women. *J Appl Physiol.* 2003; 95: 336–341.
12. Williams JK, Kaplan JR, 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.

13. Cal RGR, Figueiredo LF. Tipo e intensidade de exercício em relação a doença coronariana. *Rev Assoc Med Bras.* 2002; 48(4): 275-96.
14. 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.* 2001; 21(10): 1681-8.
15. Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arqu Bras Cardiol.* 2007, 88: 2-19, s1.
16. Santos MG, Pegoraro M, Sandrini M Macuco EC. Fatores de Risco no Desenvolvimento da Aterosclerose na Infância e Adolescência. *Arq Bras Cardiol* 2008; 90(4): 301-309.
17. Sanz J, Fayad ZA. Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature.* 2008; 451 (21): 953-957.
18. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. *Circulation.* 1998; 97: 425-8.
19. Rabelo LM. Fatores de risco para doença aterosclerótica na adolescência. *J Pediatr.* 2001; 2: 153-64.
20. Quintão E, Nakandakare ER. Manual de Referência em Dislipidemias. Novartis, São Paulo:106p. 1997.
21. Van Ree JH, Van Den Broek WJAA, Dahlmans VEH, Groot PHE, Vidgeon-Hart M, Frants RR, Wieringa B, Havekes LM, Hofker MH. Diet induced hipercholesterolemia and atherosclerosis in heterozygous apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis;* 111: 25-37.1994.
22. Jen KLC, Buisson A, Pellizzon M, Ordiz Jr. F, Ana LS, Brown J. Differential Effects of Fatty Acids and Exercise on Body Weight Regulation and Metabolism in Female Wistar Rats. *Exp Biol Med.* 2003; 228(7):843-9.
23. Feoli AM, Roehrig C, Rotta LN, Kruger AH, Souza KB, Kessler AM, et al. Serum and lliver lipids in rats and chicks fed with diets containing different oils. *Nutrition* 2003; 19(9):789-93.
24. Gaíva MH, Couto RC, Oyama LM, Couto GEC, Silveira VLF, Ribeiro EB, et al. Diets rich in polyunsaturated fatty acids: effect on hepatic metabolism in rats. *Nutrition.* 2003; 19(2):144-9.
25. Calle EE, Thun MJ, Petrelli JM, Rodriguez C, Heath CW Jr. Body mass index and

- mortality in a prospective cohort of US adults. *N Engl J Med.* 1999; 341(15): 1097-105.
26. Reaven GM, Lithell H, Landsberg L. Hypertension and associated metabolic abnormalities—the role of insulin resistance and the sympathoadrenal system. *N Engl J Med* 1996; 334: 374-81.
 27. Hall JE. Pathophysiology of obesity hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2000; 2:139-47.
 28. Carneiro G, Faria AN, Ribeiro Filho FF, Guimarães A, Lerário D, Ferreira SRG. Influence of body fat distribution on the prevalence of arterial hypertension and other cardiovascular risk factors in obese patients. *Rev Assoc Med Bras* 2003; 49(3): 306-311.
 29. Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 1987;8: 1881– 7.
 30. Bocca C, Bozzo F, Gabriel L, Miglietta A. Conjugated linoleic acid inhibits Caco-2 cell growth via ERK-MAPK signaling pathway. *J Nutr Biochem.* 2007 May;18(5):332-40.
 31. Bhattacharya A, Banu J, Rahman M, Causey J, Fernandes G. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *J Nutr Biochem.* 2006; 17(12):789-810.
 32. Whigham LD, Cook ME, Atkinson RL. Conjugated linoleic acid: implications for human health. *Pharmacol Res.* 2000 Dec;42(6):503-10.
 33. Alasnier C, Berdeaux O, Chardigny JM, Sebedio JL. Fatty acid composition and conjugated linoleic acid content of different tissues in rats fed individual conjugated linoleic acid isomers given as triacylglycerols small star, filled. *J Nutr Biochem.* 2002 Jun;13(6):337-45.
 34. Bhattacharya A, Banu J, Rahman M, Causey J, Fernandes G. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *J Nutr Biochem.* 2006; 17; 789– 810.
 35. Warburton DER, Nicol CW, Bredin SSD. Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ.* 2006;14:801 – 809.
 36. Hassan W, Fawzy M. Moving? With Coronary Artery Disease: Just Keep onFitness and Quality of Life in Older Women Exercise Training Improves Overall Physical. *Chestjournal.*2004;126:1009 – 1010.
 37. Nicklas BJ, Barbara J, Ambrosius W, Messier SP, Miller GD, Gary D, Penninx BWJH, Loeser RF, Palla S, Bleeker E, Pahor M. Diet-induced weight loss,

- exercise, and chronic inflammation in older, obese adults: a randomized controlled clinical trial. *Am J Clin Nutr.* 2004;79: 544 – 551.
38. Manson JE, Greenland P, Lacouroux AZ, Stefanick ML, Monton CP, Oberman A, Perri MG, Sheps DS, Pettinger MB, Sicovick DS. Walking compared with vigorous exercise for the prevention of cardiovascular events in women. *N Engl J Med.* 347 (10): p716-725, 2002.
39. Hakkin AA, Petrovitch H, Burchfiel CM, Ross GS, Rodriguez BL, Hhite LR, Yano K, Kurb JD, Abbott RD. Effects of walking on mortality among nonsmoking men. *N Engl J Med.* 1998; 338 (2):94-99.
40. Benardineli R, Paolini I, Cianci G, Piva R, Georqiou D, Purcaro A. Exercise training intervention after coronary angioplasty: the ETICA trial. *J Am Coll Cardiol.* 2001; 37 (7):1891-1900.
41. Hambrecht R, Fiehn E, Weigl C, Gielen S, Hamann C, Kaiser R, Yu J, Adams V, Niebauer J, Schuler G. Regular Physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Circulation.* 1998; 98 (24): 2709-2715.
42. Stwart KJ, Hiatt WR, Regensteiner JG, Rirsch AT. Exercise training for claudication. *N Engl J Med.* 2002; 347(24): 1941-1951.
43. Wannamethee SG, Lowe GD, Whincup PH, Rumbley A, Alker M, Lenon L. Physical Activity and hemostatic and inflammatory variables in elderly men. *Circulation.* 2002; 105 (15): 1785-1790.
44. Napoli C et al. Long-term combined beneficial effects of physical training and metabolic treatment on atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *PNAS*, v. 101, p. 8797 – 8802, 2004.
45. Shils ME, Shike M, Olson JA. *Modern Nutrition In Health and Disease.* 10 ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
46. Fuster V, Gotto AM, Libby P, Loscalzo J, McGill HC. 27th Bethesda Conference: matching the intensity of risk factor management with the hazard for coronary disease events. Task Force 1. Pathogenesis of coronary disease: the biologic role of risk factors. *J Am Coll Cardiol.* 1996; 27(5):964-76.
47. Austin MA. Epidemiology of hypertriglyceridemia and cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 1999; 83(9B):13F-16F.

48. Madsen L, Petersen RK, Kristiansen K. Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1740:266-286.
49. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Lehninger: princípios de bioquímica*. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975p.
50. Salem Jr N. Introduction to polyunsaturated fatty acids. *Backgrounder* 1999; 3(1): 1-8.
51. Uauy R, Valenzuela, A. Marine oils: the health benefits of n-3 fatty acids. *Nutrition*. 2000; 16(7-8):680-84.
52. Iritani N, Komiya M, Fukuda H, Sugimoto T. Lipogenic enzyme gene expression is quickly suppressed in rats by a small amount of exogenous polyunsaturated fatty acids. *J Nutr*. 1998; 128(6): 967-72.
53. Ikeda I, Cha JY, Yanagita T, Nakatani N, Oogami K, Imaizumi K, et al. Effects of dietary a-linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on hepatic lipogenesis and b-oxidation in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1998; 62(4): 675-80.
54. Yoshida H, Mawatani M, Ikeda I, Imaizumi K, Seto A, Tsuji H. Effect of dietary seal and fish oils on triacylglycerol metabolism in rats. *J Nutr Sci Vitaminol*. 1999; 45(4): 411-21.
55. NCEP 2001. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *J Am Medic Assoc*. 2001; 285:2486-96.
56. Murray RK, Granner DL, Mayes PA, Rodwell VW. *Harper: Bioquímica* São Paulo: Atheneu, 2002. 919p.
57. Simopoulos AP, Leaf A, Salem Jr N. Essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. *Ann Nutr Metab*. 1999; 43(2):127-130.
58. Kinsella JE. Food components with potential therapeutic benefits: the n-3 polyunsaturated fatty acids of fish oils. *Food Technol*. 1986; 40: 89-97.
59. Ross BM. Phospholipid and eicosanoid signaling disturbances in schizophrenia. *Prostagl Leukot Essent Fat Ac*. 2003; 69(6): 407–12.

60. Sijben JW, Nieuwland MG, Kemp B, Parmentier HK, Scrama JW. Interactions and antigen dependence of dietary n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids on antibody responsiveness in growing layer hens. *Poult Sci*. 2001; 80(7):885-93.
61. Pasqualini ME, Berraa MA, Calderon RO, Cremonezzia DC, Giraudo C, Eynarda AR. Dietary lipids modulate eicosanoid release and apoptosis of cells of a murine lung alveolar carcinoma. *Prostagl Leukot Essent Fat Ac* 2005; 72(4):235–40.
62. Parodi PW. Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. *Journal of Dairy Science*. 1999;82:1339-1349.
63. Bhattacharya A, Banu J, Rahman M, Causey J, Fernandes G. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *J Nutr Biochem*. 2006 Dec;17(12):789-810.
64. Kritchevsky DST, Tepper SA, Wright S, Czarnechi SK. Influence of graded levels of conjugated linoleic acid (CLA) on experimental atherosclerosis in rabbits. *Nutr Res*. 2002;22:1275-9.
65. Toomey S, Harhen B, Roche HM, Fitzgerald D, Belton O. Profound resolution of early atherosclerosis with conjugated linoleic acid. *Atherosclerosis* 2006.
66. Mitchell PL et al. Effect of conjugated linoleic acid isomers on lipoproteins and atherosclerosis in the Syrian Golden hamster. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1734:269-279.
67. Taylor CG, Zahradka P. Dietary conjugated linoleic acid and insulin sensitivity and resistance in rodent models. *Am J Nutr*. 2004; 79: 1164s – 1168.
68. Benito P, Nelson GJ, Kelley DS, Bartolini G, Schmidt PC, Simon V. The effect of conjugated linoleic acid on plasma lipoproteins and tissue fatty acid composition in humans. *Lipids* 2001;36:229– 36.
69. Smedman A, Vessby B. Conjugated linoleic acid supplementation in humans — metabolic effects. *Lipids* 2001;36:773– 81.
70. Williams CL, Chairman MPH, Hayman LL, Daniels SR, Robinson TN, Steinberger J, et al. Cardiovascular health in childhood: a statement for health professionals from the committee on atherosclerosis, hypertension, and obesity in the young (AHOY) of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, American Heart Association. *Circulation*. 2002; 106: 143-60.
71. Kavey REW, Daniels SR, Lauer RM, Atkins DL, Hayman LL, Taubert K. American Heart Association Guidelines for Primary Prevention of Atherosclerotic Cardiovascular Disease Beginning in Childhood. *Circulation*. 2003; 107: 1562-6.

72. Barter P. The inflammation: Lipoprotein cycle. *Atherosclerosis*. 2005; 6 15-20.
73. Jenkins RR: Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Med*: 5: 156–170, 1988.
74. Prado ES, Dantas EHM. Efeitos dos exercícios físicos Aeróbio e de Força nas Lipoproteínas HDL, LDL e Lipoproteína(a). *Arq Bras Cardiol*. 2002; 79 (4): 429-33.
75. Matsudo VKR, Matsudo SMM, Araujo TL, Ribeiro MA. Dislipidemias e a promoção da atividade física: uma revisão na perspectiva de mensagens de inclusão. *R Br C Mov*. 2005; 13 (2): 161-70.

4. ARTIGO ORIGINAL “I”

Ácido linoleico conjugado associado à dieta hiperlipídica aumentou o colesterol total e o LDL plasmático e elevou o ganho de peso de camundongos *knockout* para a Apo E exercitados.

Resumo

Objetivo: Avaliar os efeitos do ácido linoleico conjugado (CLA) associado à dieta hiperlipídica sobre as lipoproteínas plasmáticas e ganho de peso de camundongos *knockout* para o gene da Apo E exercitados. **Métodos:** Um total de 32 camundongos foram divididos e submetidos à dieta normo e hiperlipídica suplementadas ou não com 1% de CLA, com todos realizando exercício físico em esteira, durante 12 semanas. Utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis para grupos independentes ao nível de significância de 5%. **Resultados:** Os animais que ingeriram dieta hiperlipídica com CLA aumentou o colesterol total e o LDL, comparado com os animais alimentados com dieta normolipídica associada ou não ao CLA. Foi também observado aumento no ganho de peso dos camundongos que ingeriram dieta hiperlipídica associada ao CLA, comparado com os animais normolipídicos suplementados com CLA. **Conclusões:** A dieta hiperlipídica associada ao CLA aumentou o colesterol total, LDL e o ganho de peso corporal dos camundongos. E, a suplementação com CLA na concentração de 1% não alterou nenhum dos parâmetros analisados, independente da dieta, e não foi protetora contra os efeitos da dieta hiperlipídica.

Palavras-chaves: Aterosclerose; Composição corporal; Exercício físico; Apolipoproteína E

4.1 Introdução

O aumento da ingestão de alimentos com elevada densidade energética e elevado conteúdo de gordura associado à falta da prática de exercícios físicos são características comuns do estilo de vida ocidental, o que pode levar ao desenvolvimento de doenças, tais como aterosclerose, obesidade, hipertensão, hiperlipidemias e outras (Bhattacharya et al., 2005). A aterosclerose tem sido a causa principal de doenças coronarianas, sendo causada por uma inflamação progressiva na parede dos vasos sanguíneos pelo acúmulo de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), em consequência do aumento do colesterol total no plasma. Este processo é devido a uma ativação endotelial a partir da qual ocorre um recrutamento de leucócitos e, com isso, inicia-se um centro de desenvolvimento e progressão de placas aterogênicas causando complicações clínicas (Petrovan et al., 2007).

CLA é a denominação dada a um grupo heterogêneo de ácidos graxos com 18 carbonos, com duas duplas ligações, formadas através de biohidrogenação e oxidação por processos naturais (Bocca et al., 2007). Na molécula não há nenhum grupo metileno separando as duplas ligações como ocorre nos ácidos linoleicos. Ao invés disso, há uma dupla ligação conjugada com configuração em *cis* (c) ou *trans* (t), onde, predominantemente, é apresentada nas posições c9, t11 e t10, c12 (Bhattacharya et al., 2006). Encontrado naturalmente em muitos produtos animais, o CLA é sintetizado por bactérias do rúmen, embora possa ser sintetizado em menor quantidade por animais não ruminantes (Whigham et al., 2000). As principais fontes dietéticas de CLA são: carne bovina (3-4 mg/g), leite e manteiga (5-7 mg/g), e, em menor proporção, óleos de sementes de açafrão e girassol (0,01 a 0,12% dos ácidos graxos totais) (Alasnier et al., 2002). O consumo de ácido linoleico conjugado (CLA) tem demonstrado efeito positivo sobre o perfil lipídico e antiaterogênico em coelhos (Kritchevsky et al., 2002) e sobre a composição corporal, com redução da massa gorda e aumento da massa magra, além da diminuição do ganho de peso em camundongos BALB/C machos (Bhattacharya et al., 2005).

O CLA tem sido usado como suplemento, pois eleva a atividade da lípase hormônio sensível e, consequentemente, da lipólise em adipócitos, elevando a oxidação de ácidos graxos, tanto no músculo esquelético quanto no tecido adiposo (Park et al., 1997) em função da elevação dos ácidos graxos livres. É importante ressaltar ainda que

alguns efeitos indesejáveis relacionados ao uso do ácido linoleico conjugado foram encontrados, tanto em estudos com humanos quanto em animais. Há relatos de aumento da resistência à insulina e aumento da glicose e insulina de jejum (Smedman & Vessby, 2001); elevação da peroxidação lipídica (Riserus et al., 2001) e, redução do HDL em humanos obesos tratados com CLA (Steck et al., 2007).

Exercícios físicos com intensidade moderada, tem sido utilizado para prevenir ou reverter a formação de placas ateromatosas nas artérias, podendo alterar o perfil lipídico das lipoproteínas e diminuir o colesterol total (Meilhac et al., 2001). Além disso, o exercício físico pode afetar a composição corporal, diminuindo a massa gorda e aumentando a massa magra (Thomson et al., 2008). Entretanto, o impacto da prática habitual de atividade física no perfil lipídico e na composição corporal depende da qualidade da alimentação feita pelo indivíduo.

O acompanhamento de indivíduos praticantes de atividade física em academias tem demonstrado que o exercício físico tem sido uma estratégia para perda de peso e, prevenção ou reversão da formação de placas ateromatosas nas artérias. Estes indivíduos também fazem uso de recursos ergogênicos, como o ácido linoléico conjugado, para maximizar a perda de peso, porém, não atentam para o controle da dieta, consumindo muita gordura e excesso de calorias.

Como forma de constatar os efeitos de uma dieta rica em gordura e da efetividade do CLA nas doenças cardiovasculares, modelos animais, como camundongos *knockout* para o gene da apolipoproteína E (Apo E), apolipoproteína responsável pela remoção da LDL no plasma, tem sido utilizados em estudos envolvendo a gênese da aterosclerose e das dislipidemias (Cooper et al. 2008). Estes camundongos e os seres humanos possuem, com poucas exceções, o mesmo conjunto de genes que controlam o metabolismo de lipoproteínas (Hofker et al., 1998). Segundo Neuzil et al. (1998), existe uma semelhança entre a composição lipídica de VLDL extraída do plasma de camundongos deficientes do gene responsável pela expressão da Apo E, e a VLDL extraída do plasma de humanos com placas ateroscleróticas avançadas. Este fato reforça a validade do modelo de camundongos deficiente em Apo E para o estudo experimental de doenças coronarianas.

O propósito deste trabalho foi simular a condição de indivíduos que fazem exercício físico, mas consomem dieta rica em gordura e fazem suplementação com ácido linoléico conjugado. Desta forma, objetivou-se avaliar os efeitos do ácido

linoleico conjugado (CLA) associado à dieta hiperlipídica sobre as lipoproteínas plasmáticas e ganho de peso de camundongos Apo E (^{-/-}) exercitados.

4.2 Métodos

4.2.1 Animais de Experimentação

Foram utilizados 32 camundongos *knockout* para o gene que expressa a Apo E, com doze semanas de vida. Os animais foram divididos em quatro grupos: N (dieta normolipídica) (n=8), H (dieta hiperlipídica) (n=8), NCLA (dieta normolipídica com 1% de CLA) (n=8), e HCLA (dieta hiperlipídica com 1% de CLA) (n=8). Estes foram alocados em gaiolas coletivas de polipropileno e mantidos em ambiente com temperatura média de 21°C, com alternância de período de 12 horas claro/escuro. Todos receberam água e dieta *ad libitum* e, fizeram corrida em esteira com intensidade moderada. O período do experimento foi de doze semanas e antes da eutanásia todos foram colocados em jejum por 12 horas.

Após a eutanásia com CO₂, o sangue foi coletado por punção na região abdominal, sendo imediatamente centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos. O soro foi congelado e mantido em freezer a -20°C até a análise. Todas as vísceras foram retiradas, separando a carcaça vazia (músculos e ossos) para as determinações de água, gordura, proteínas e cinza.

Os camundongos foram procedentes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Viçosa. Os procedimentos empregados no estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética do Departamento de Veterinária desta universidade (processo nº. 13/2008) (em anexo), estando de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.2.2 Dietas, controle peso e ingestão alimentar.

A dieta hiperlipídica foi elaborada conforme *Association of Official Analytical Chemistry* - A.O.A.C (1989), e a dieta normal conforme AIN-93M (Reeves et al., 1993), sendo elaboradas manualmente e mantidas congeladas e protegidas da luz até o momento da utilização. A concentração de CLA (mistura de isômeros) na dieta foi de 1% do total desta. Substituiu-se dez gramas de óleo de soja por dez gramas de CLA em cada quilo de dieta nas dietas dos grupos NCLA e HCLA (Tabela 1).

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

Ingredientes	N	NCLA	H	HCLA
Caseína	140	140	200	200
Maltodextrina	155	155	-	-
Sacarose	100	100	500	500
Óleo de soja	40	30	10	-
Celulose	50	50	50	50
Mistura mineral	35	35	50	50
Mistura vitamínica	10	10	10	10
L-cistina	1,8	1,8	-	-
Bitartarato de colina	2,5	2,5	10	10
Colesterol	-	-	10	10
Gordura hidrogenada	-	-	150	150
Amido de milho	465,692	465,692	-	-
CLA	-	10	-	10
Total (cal/kg dieta)	4002,8	4002,8	4530	4530

Legenda: N – dieta normolipídica sem CLA; NCLA – dieta normolipídica com CLA; H – dieta hiperlipídica; HECLA – dieta hiperlipídica com CLA. Grupo N e NCLA (dieta preparada segundo AIN-93M, Reeves et al., 1993); grupo H e HCLA (dieta preparada segundo a Association of Official Analytical Chemistry, 1989).

O peso corporal e a ingestão alimentar foram monitorados semanalmente para controle de peso e consumo de dieta.

4.2.3 Protocolo de atividade física

Todos os camundongos foram submetidos a um programa progressivo de corrida na esteira (*INSITH®*, Equipamentos Científicos, Ribeirão Preto – SP, Brasil), cinco dias por semana, 30 min/dia, a uma velocidade de 15 metros por minutos, por 12 semanas consecutivas (segundo MEILHAC et al., 2001). A progressão da carga do exercício está demonstrada na tabela 2.

Tabela 2. Programa de corrida utilizado no treinamento dos camundongos Apo E^(-/-)

Semanas	Velocidade (metros/minuto)	Tempo (minutos/dia)	Freqüência (dias/semana)
1 a 2 (progressão diária)	10 a 15	10 a 30	5
3 a 12	15	30	5

4.2.4 Concentração de água, proteína e gordura corporal

O percentual hídrico das carcaças dos animais foi avaliado pelo método gravimétrico com emprego de calor baseado na evaporação da água em estufa a 105°C por 24 horas. O percentual de gordura foi determinado pelo processo gravimétrico com emprego do aparelho de Soxhlet usando-se éter etílico como solvente na extração por 8 horas. O percentual de proteína foi calculado pelo método primário de Kjeldahl, por meio da determinação do nitrogênio empregando o fator N x 6,25 (AOAC, 1998).

4.2.5 Concentração de Colesterol total, HDL e LDL

As determinações de colesterol total, TG e o HDL foram realizadas baseando-se no método enzimático colorimétrico, utilizando kit enzimático KATAL (Fossati & Prencipe 1982). A concentração de LDL no plasma foi calculada baseando-se na fórmula de Friedewald, citado por Warnick et al. (1990).

$$\text{LDL} = (\text{colesterol total} - \text{HDL}) - (\text{TG} \times 0,20)$$

4.2.6 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada utilizando o software *Sigma Statistic® for Windows*, versão 3.0, sendo utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis para grupos independentes. O teste de Dunn's foi empregado para análise de múltipla comparação *post-hoc*, quando necessário. O nível de rejeição da hipótese de nulidade foi de P<0,05 ou 5%.

4.3 Resultados

4.3.1 Colesterol total, HDL e LDL

Foram identificadas alterações estatisticamente significativas (p<0,05) entre os grupos para o colesterol total e LDL. Pode-se verificar que os animais do grupo HCLA apresentaram maiores valores de colesterol total e LDL, quando comparado com os

animais dos grupos NCLA e N. No entanto, os valores desses parâmetros não diferiram do grupo H. Em relação à concentração de HDL, não foram observadas alterações significativas entre os grupos ($p>0,05$). Os dados destas análises estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Conteúdo de colesterol total, HDL e LDL nos camundongos Apo E (-/-)

Grupos	Colesterol Total (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)
N (n=8)	378 (199,25 - 415) ^{bc}	20,5 (16,25 - 29,75) ^a	340,7 (157,45 - 387,5) ^{bc}
H (n=8)	775 (737,5 - 975) ^{ac}	13,75 (12,5 - 20) ^a	755,5 (722,5 - 958) ^{ac}
NCLA (n=8)	399,5 (371,5 - 445) ^{bc}	25 (24,5 - 30) ^a	350,7 (334 - 403,5) ^{bc}
HCLA (n=8)	850 (599 - 1156,25) ^a	16,25 (12,5 - 23,25) ^a	832,75 (568,25 - 1138,75) ^a

Legenda: N – grupo com dieta normolipídica sem CLA; H – grupo com dieta hiperlipídica sem CLA; NCLA – grupo com dieta normolipídica e CLA; HCLA – grupo com dieta hiperlipídica e CLA. Dados: mediana (mínimo – máximo). Significância ($P<0,05$): valores com letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa ($P>0,05$) ao teste de Dunn's.

4.3.2 Peso Corporal (inicial e final) e Ganho de Peso.

Não foi observada diferença estatística entre o peso corporal inicial e final dos animais dos grupos experimentais ($p > 0,05$) (Tabela 4). Todavia, os animais do grupo HCLA apresentaram maior ganho de peso, quando comparado com os camundongos do grupo NCLA. No entanto, os valores desse parâmetro não diferiram com os demais grupos (Tabela 4).

Tabela 4. Peso corporal e ganho de peso dos camundongos Apo E^(-/-)

Grupos	Peso Corporal (g)		Ganho de Peso (g)
	1 ^a semana	12 ^a semana	
N (n=8)	19,35 (18,5 - 22,45) ^a	24 (22,63 - 25,06) ^a	3,63 (1,8 - 4,72) ^{ab}
H (n=8)	19,35 (18,1 - 22,55) ^a	25 (24,25 - 26,75) ^a	5 (3,23 - 5,77) ^{ab}
NCLA (n=8)	20,75 (18 - 21,05) ^a	22,63 (22 - 23,5) ^a	2,95 (2,15 - 4) ^b
HCLA (n=8)	19,65 (19 - 20,85) ^a	25,15 (23,22 - 28) ^a	5,5 (4,25 - 6,75) ^a

Legenda: N – grupo com dieta normolipídica sem CLA; H – grupo com dieta hiperlipídica sem CLA; NCLA – grupo com dieta normolipídica e CLA; HCLA – grupo com dieta hiperlipídica e CLA. Dados: mediana (mínimo – máximo). Significância (P<0,05): valores com letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa (P>0,05) ao teste de Dunn's.

4.3.3 Composição Corporal

Não foi verificada diferença estatística para o peso da carcaça vazia e os respectivos valores percentuais de água, gordura, proteína e cinzas entre os grupos experimentais (p>0,05) (Tabela 5).

Tabela 5 - Composição corporal dos camundongos Apo E^(-/-)

Grupos	Água	Gordura	Proteínas	Cinzas
	(%)	(%)	(%)	(%)
N (n=8)	64,64 (62,81 - 66,09) ^a	5,66 (4,78 - 7,14) ^a	18,64 (18,40 - 19,32) ^a	1,35 (1,23 - 1,46) ^a
H (n=8)	65,56 (64,65 - 66,59) ^a	5,04 (4,14 - 6,36) ^a	19,68 (18,60 - 19,91) ^a	1,31 (1,28 - 1,37) ^a
NCLA (n=8)	64,2 (62,77 - 64,93) ^a	5,84 (4,11 - 7,28) ^a	20,60 (18,95 - 21,2) ^a	1,45 (1,4 - 1,53) ^a
HCLA (n=8)	66,34 (65,71 - 66,75) ^a	4,22 (1,95 - 6,13) ^a	20,35 (19,38 - 21,09) ^a	1,21 (1,11 - 1,37) ^a

Legenda: N – grupo com dieta normolipídica sem CLA; H – grupo com dieta hiperlipídica sem CLA; NCLA – grupo com dieta normolipídica e CLA; HCLA – grupo com dieta hiperlipídica e CLA. Dados: mediana (mínimo – máximo). Significância (P<0,05): valores com letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa (P>0,05) ao teste de Dunn's.

4.4 Discussão

No presente estudo todos os animais foram exercitados com o intuito de simular a condição de indivíduos que fazem atividade física, mas consomem dieta rica em gordura e fazem suplementação com ácido linoléico conjugado (CLA). Foi utilizado uma dieta hiperlipídica com 1% de colesterol e 15% de gordura hidrogenada, comparada com a normal, onde não se utiliza estes compostos. Já em relação ao suplemento, utilizou-se 1% de CLA sobre o consumo total da dieta (normal e hiperlipídica), com duração de 12 semanas. A discussão a respeito da dieta hiperlipídica é conclusiva no que diz respeito às alterações das lipoproteínas plasmáticas, peso e composição corporal, porém os questionamentos em relação à suplementação com CLA tem sido acirrada frente aos efeitos fisiológicos reportados por muitos grupos de pesquisa nos últimos anos. Os estudos que tratam da suplementação deste composto variam de 0,05 a 4% de CLA sobre o consumo total de dieta de animais (coelhos, ratos e camundongos), com tempo de experimentação variando de 2 a 12 semanas. O uso da dieta hiperlipídica com 1% de CLA foi em função da hipótese de que o CLA acrescido a dieta proporciona alterações na composição corporal e melhora no perfil lipídico do plasma.

Os dados do presente estudo mostram que a dieta hiperlipídica foi um fator prejudicial para os camundongos, pois demonstrou-se que quando estes exercitaram e consumiram dieta hiperlipídica, o exercício não foi um fator protetor, comparado com os que tiveram uma dieta normolipídica. Outro ponto que deve ser levado em consideração é a quantidade de caloria da dieta hiperlipídica, pois a maior concentração de colesterol total e LDL nos animais alimentados com esta dieta, pode ser, também, devido à maior densidade calórica (Tabela 1).

A monitoração quanto à prática habitual de exercícios físicos tem recebido grande notoriedade no campo da saúde, não apenas por sua ação isolada na prevenção e no controle das doenças cardiovasculares (Paffenbarger et al., 2001), mas também por induzir alterações desejáveis nos níveis de lipídeos plasmáticos (Miller & Dunstan, 2004). Entretanto, no presente estudo, pode-se deduzir que para se ter uma vida, livre de doenças cardiovasculares, não basta só fazer exercícios físicos, a alimentação também deve ser um fator a ser observado, principalmente no que diz respeito à quantidade de gordura e caloria da dieta.

Em relação ao suplemento, o consumo de CLA não demonstrou efeito significativo no colesterol total e LDL. Entretanto, no estudo de Botelho et al. (2007),

foi verificado diminuição do colesterol total quando ratos foram suplementados com 4% de CLA na dieta, aumento do colesterol com suplementação de 1% de CLA e manutenção dos níveis de colesterol quando os animais foram suplementados com 2% de CLA, por 21 dias. Nos trabalhos de Steck et al. (2007), com humanos obesos suplementados com 3,4 g/dia de CLA ou 6,4 g/dia de CLA por 12 semanas consecutivas, não foram observados aumentos do LDL. Resultado semelhante foi apresentado por Raff et al. (2008) com humanos jovens suplementados com 5,5 g/dia de CLA por 5 semanas. Estes efeitos podem ser explicados pelo declínio da produção de colesterol, assim como de sua secreção pelo fígado (Sakono et al., 1999), e pela redução da síntese de triacilgliceróis, associada ao aumento de sua oxidação (Rahman et al., 2001).

No presente estudo, a diferença na HDL plasmática entre os grupos não era esperada, uma vez que todos os grupos foram exercitados, igualando assim o efeito do exercício sobre esta lipoproteína. Apesar dos grupos alimentados com dieta hiperlipídica terem apresentado menores concentrações de HDL, estes não demonstraram diferenças estatísticas (Tabela 3). Da mesma forma, Nicolosi et al. (1997) trabalharam com Hamsters hipercolesterolemicos suplementados com 0,06%, 0,11% e 1,1% de CLA durante 11 semanas e não observaram diferenças significantes na HDL. Gavino et al. (2000), também trabalharam com hamster alimentados com dieta rica em gordura e suplementados com 1% de CLA durante seis semanas, não verificando diferenças significantes no HDL. Humanos jovens, todos suplementados com 5,5 g/dia de CLA durante 5 semanas, também não apresentaram diferenças significantes nesta lipoproteína (Raff et al., 2008). Contudo, no trabalho de Steck et al. (2007), foi verificado diminuição do HDL em humanos obesos suplementados com 3,4 g/dia de CLA ou 6,4 g/dia de CLA por um período de 12 semanas.

O aumento do ganho de peso nos animais alimentados com dieta hiperlipídica e suplementados com CLA, comparado com os animais alimentados com dieta normolipídica e suplementado com CLA (Tabela 4), pode ser devido à maior quantidade de gordura e densidade calórica da dieta (Tabela 1). Neste caso, vale ressaltar que ambos os grupos fizeram exercício físico e foram suplementados com CLA, isto indica que a qualidade e quantidade de calorias da alimentação deve ser levada em consideração. Para efeito do CLA, não foram observados diferenças estatísticas no ganho de peso, quando comparado com os animais que não ingeriram CLA. Sugere-se que, a quantidade de CLA utilizada não foi suficientemente adequada

para alterar o ganho de peso dos animais suplementados. Mirand et al. (2004), trabalharam com ratos suplementados com 1% de CLA, por seis semanas e submetidos a exercício aeróbico em esteira e, também, não observaram diminuição do ganho de peso corporal em relação aos não suplementados sedentários. Da mesma forma, Steck et al. (2007), não encontraram diferenças significativas na perda de peso em humanos que ingeriram 3,4 g ou 6,4 g por dia de CLA por 12 semanas. Contudo, Hargrave et al. (2004) observaram diminuição do ganho de peso em camundongos suplementados com 1% de CLA, por um período de 14 dias, assim como Yang et al. (2003), em ratas ZDF suplementadas com 0,5% de CLA durante seis semanas.

Neste estudo, os animais que foram suplementados com 1% de CLA não demonstraram modificações nos percentuais de água, gordura, proteína e cinzas, quando comparados com os demais grupos. O possível mecanismo para explicar este resultado pode ser que 1% de CLA não é suficiente para alterar o metabolismo lipídico e, até mesmo protéico de camundongos com o gene deficiente para expressão da Apo E. Mirand et al. (2004), trabalharam com ratos Wistar adultos suplementados com 1% ou 2% de CLA combinado com atividade física moderada por seis semanas, e também não verificarem diferenças significativas na composição corporal. Porém, resultados contrários aos nossos foram encontrados por Bhattacharya et al. (2005), quando estudaram camundongos BALB/C alimentados com dieta rica em gordura, suplementados com 0,4% de CLA e submetidos a exercício moderado em esteira, eles observaram diminuição de gordura e aumento de massa magra nos camundongos. Risérus et al. (2001), também encontraram resultados diferentes deste estudo quando trabalharam com humanos obesos que ingeriram 4,2 g de CLA/dia durante quatro semanas, estes indivíduos apresentaram uma diminuição do percentual de gordura.

Concluiu-se que, a dieta hiperlipídica é um fator prejudicial, pois mesmo suplementada com CLA, aumentou o colesterol total, LDL e elevou o ganho de peso dos camundongos knockout para o gene da apoE exercitados.

Os dados do presente estudo não possibilitam especificar os mecanismos responsáveis pela não alteração da composição corporal nos animais suplementados com CLA. Todavia, é possível que 1% de CLA não tenha alterado a atividade da lípase hormônio sensível, não aumentando o gasto energético, assim como, não alterando a atividade das enzimas carnitina palmitoil transferase e lipase lipoprotéica (Granlund et al., 2003). Sugere-se que novos trabalhos sejam feitos para analisar a atividade da lípase

hormônio sensível e, conseqüentemente, da lipólise em adipócitos em um desenho experimentação como o deste trabalho.

Referências bibliográficas

1. Bhattacharya A, Rahman MM, Sun D, Lawrence R, Mejia W, McCarter R, et al. The combination of dietary conjugated linoleic acid and treadmill exercise lowers gain in body fat mass and enhances lean body mass in high fat-fed male Balb/C mice. *J Nutr.* 2005 May;135(5):1124-30.
2. Petrovan RJ, Kaplan CD, Reisfeld RA, Curtiss LK. DNA vaccination against VEGF receptor 2 reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 May;27(5):1095-100.
3. Bocca C, Bozzo F, Gabriel L, Miglietta A. Conjugated linoleic acid inhibits Caco-2 cell growth via ERK-MAPK signaling pathway. *J Nutr Biochem.* 2007;18(5):332-40.
4. Bhattacharya A, Banu J, Rahman M, Causey J, Fernandes G. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *J Nutr Biochem.* 2006 Dec;17(12):789-810.
5. Whigham LD, Cook ME, Atkinson RL. Conjugated linoleic acid: implications for human health. *Pharmacol Res.* 2000 Dec;42(6):503-10.
6. Alasnier C, Berdeaux O, Chardigny JM, Sebedio JL. Fatty acid composition and conjugated linoleic acid content of different tissues in rats fed individual conjugated linoleic acid isomers given as triacylglycerols small star, filled. *J Nutr Biochem.* 2002;13(6):337-45.
7. Kritchevsky DST, Tepper SA, Wright S, Czarnechi SK. Influence of graded levels of conjugated linoleic acid (CLA) on experimental atherosclerosis in rabbits. *Nutr Res.* 2002;22:1275-9.
8. Park Y, Albright KJ, Liu W, Storkson JM, Cook ME, Pariza MW. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids.* 1997 Aug;32(8):853-8.
9. Smedman A, Vessby B. Conjugated linoleic acid supplementation in humans--metabolic effects. *Lipids.* 2001 Aug;36(8):773-81.
10. Risérus U, Berglund L, Vessby B. Conjugated linoleic acid (CLA) reduced abdominal adipose tissue in obese middle-aged men with signs of the metabolic syndrome: a randomised controlled trial. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001 Aug;25(8):1129-35.

11. Steck SE, Chalecki AM, Miller P, Conway J, Austin GL, Hardin JW, et al. Conjugated linoleic acid supplementation for twelve weeks increases lean body mass in obese humans. *J Nutr.* 2007 May;137(5):1188-93.
12. 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.* 2001 Oct;21(10):1681-8.
13. Thomson RL, Buckley JD, Noakes M, Clifton PM, Norman RJ, Brinkworth GD. The effect of a hypocaloric diet with and without exercise training on body composition, cardiometabolic risk profile, and reproductive function in overweight and obese women with polycystic ovary syndrome. *J Clin End Metab.* 2008 Sep;93(9):3373-80.
14. Cooper MH, Miller JR, Mitchell PL, Currie DL, Mcleod RS. Conjugated linoleico acid isomers no effect on atherosclerosis and adverse effects on lipoprotein and liver lipid metabolism in apoE^{-/-} mice fed a high-cholesterol diet. *Atherosclerosis.* 2008
15. Hofker MH, van Vlijmen BJ, Havekes LM. Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1998 Mar;137(1):1-11.
16. Neuzil J, Christison JK, Iheanacho E, Fragonas JC, Zammit V, Hunt NH, et al. Radical-induced lipoprotein and plasma lipid oxidation in normal and apolipoprotein E gene knockout (apoE^{-/-})mice: apoE^{-/-} mouse as a model for testing the role of tocopherol-mediated peroxidation in atherogenesis. *J Lip Res.* 1998 Feb;39(2):354-68.
17. 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.
18. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. 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. *J Nutr.* 1993 Nov;123(11):1939-51.
19. AOAC. Official methods of analysis. . AOAC – Association of Official Analytical Chemists ed. Washington, D.C. 1998.
20. Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem.* 1982 Oct;28(10):2077-80.
21. Warnick GR, Knopp RH, Fitzpatrick V, Branson L. Estimating low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald equation is adequate for classifying

- patients on the basis of nationally recommended cutpoints. *Clin Chem.* 1990 Jan;36(1):15-9.
22. Paffenbarger RS Jr, Blair SN, Lee IM. A history of physical activity, cardiovascular health and longevity: the scientific contributions of Jeremy N Morris, DSc. DPH, FRCP. *Int J Epidemiol* 2001;30:1184-92.
23. Miller YD, Dunstan DW. The effectiveness of physical activity interventions for the treatment of overweight and obesity and type 2 diabetes. *J Sci Med Sport* 2004;7(suppl 1):52-9.
24. Botelho AP, Santos-Zago LF, Reis SMPM, Oliveira AC. O efeito da suplementação com ácido linoléico conjugado sobre o perfil lipídico sérico em ratos. . *Rev Bras Tecnol Agroind.* 2007;1(1):1-7.
25. Raff M, Tholstrup T, Basu S, Nonboe P, Sorensen MT, Straarup EM. A diet rich in conjugated linoleic acid and butter increases lipid peroxidation but does not affect atherosclerotic, inflammatory, or diabetic risk markers in healthy young men. *J Nutr.* 2008 Mar;138(3):509-14.
26. Sakono M, Miyanaga F, Kawahara S, Yamauchi K, Fukuda N, Watanabe K, et al. Dietary conjugated linoleic acid reciprocally modifies ketogenesis and lipid secretion by the rat liver. *Lipids.* 1999 Sep;34(9):997-1000.
27. Rahman SM, Wang Y, Yotsumoto H, Cha J, Han S, Inoue S, et al. Effects of conjugated linoleic acid on serum leptin concentration, body-fat accumulation, and beta-oxidation of fatty acid in OLETF rats. *Nutrition.* 2001 May;17(5):385-90.
28. Nicolosi RJ, Rogers EJ, Kritchevsky D, Scimeca JA, Huth PJ. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery.* 1997;22(5):266-77.
29. Gavino VC, Gavino G, Leblanc MJ, Tuchweber B. An isomeric mixture of conjugated linoleic acids but not pure cis-9, trans-11-octadecadienoic acid affects body weight gain and plasma lipids in hamsters. *J Nutr.* 2000 Jan;130(1):27-9.
30. Mirand PP, Arnal-Bagnard MA, Mosoni L, Faulconnier Y, Chardigny JM, Chilliard Y. Cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid isomers do not modify body composition in adult sedentary or exercised rats. *J Nutr.* 2004 Sep;134(9):2263-9.
31. Hargrave KM, Meyer BJ, Li C, Azain MJ, Baile CA, Miner JL. Influence of dietary conjugated linoleic acid and fat source on body fat and apoptosis in mice. *Obes Res* 2004;12:1435– 44.

32. Yang M, Cook ME. Dietary conjugated linoleic acid decreased cachexia, macrophage tumor necrosis factor-alpha production, and modifies splenocyte cytokines production. *Exp Bio Med*. 2003 Jan;228(1):51-8.
33. Granlund L, Juvet LK, Pedersen JI, Nebb HI. Trans10, cis12-conjugated linoleic acid prevents triacylglycerol accumulation in adipocytes by acting as a PPARgamma modulator. *J Lip Res*. 2003 Aug;44(8):1441-52.

5. ARTIGO ORIGINAL “II”

Exercício físico associado à dieta hiperlipídica aumenta colesterol total e LDL sérico e, eleva o ganho de peso de camundongos knockout para o gene da Apo E suplementados com CLA.

Resumo

Objetivo: Avaliar os efeitos do exercício físico associado a dieta hiperlipídica sobre o colesterol total e LDL sérico e ganho de peso de camundongos Knockout para a Apo E suplementados com ácido linoleico conjugado (CLA). **Métodos:** Um total de 32 camundongos foram divididos e submetidos à exercício físico e sedentarismo associados à dietas normo e hiperlipídica suplementadas com 1% de CLA, durante 12 semanas. Utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis para grupos independentes ao nível de significância de 5%. **Resultados:** Pode-se verificar que os animais alimentados com dieta hiperlipídica exercitado apresentaram maiores valores de colesterol total e LDL, quando comparado com os animais que ingeriram dieta normolipídica exercitado ou sedentário. Os animais alimentados com dieta hiperlipídica demonstraram, também, elevação no ganho de peso, independente da prática do exercício físico, comparado com os animais exercitados alimentados com dieta normolipídica. **Conclusões:** O exercício físico associado a uma dieta hiperlipídica aumenta o colesterol total, o LDL e o ganho de peso de camundongos Knockout para o gene que expressa a apolipoproteína E suplementados com CLA.

Palavras-chaves: Lipoproteína Plasmática, Inatividade física, Massa corporal magra, Ácido linoleico conjugado;

5.1 Introdução

Dietas ricas em gorduras e inatividade física podem ser fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, câncer de cólon e mama, obesidade, hipertensão, osteoporose e depressão (Warburton et al., 2006). Estes fatores geram problemas de saúde pública e reforça a necessidade de desenvolver novos métodos para o tratamento dessas doenças (Bhattacharya et al., 2005).

Estratégias têm sido utilizadas para a prevenção de doenças cardiovasculares e aumento de peso. Pode-se citar o uso de alimentos funcionais em função dos seus efeitos benéficos para a saúde humana (Bell et al., 2002). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (1999), a alegação de propriedade funcional é relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente exerce no organismo humano. Desta forma, pode-se evidenciar a utilização de ácido linoleico conjugado (CLA). Este tem sido utilizado pelas pessoas como alimento funcional, pois acompanhamentos com indivíduos que utilizam CLA têm demonstrado que a suplementação deste composto tem sido útil para perda de peso e, até mesmo, prevenção de doenças coronarianas.

CLA é a denominação dada a um grupo heterogêneo de ácidos graxos com 18 carbonos, com duas duplas ligações, formadas através da biohidrogenação e oxidação por processos naturais (Bocca et al., 2007). Na molécula não há nenhum grupo metíleno separando as duplas ligações, como ocorre nos ácidos linoleicos. Ao invés disso, há uma dupla ligação conjugada com configuração em *cis* (c) ou *trans* (t), onde, predominantemente, é apresentada nas posições c9, t11 e t10, c12 (Bhattacharya et al., 2006). Encontrado naturalmente em muitos produtos animais, é sintetizado por bactérias do rúmen, embora possa ser sintetizado em menor quantidade por animais não ruminantes (Whigham et al., 2000). As principais fontes dietéticas de CLA são: carne bovina (3-4 mg/g), leite e manteiga (5-7 mg/g), e, em menor proporção, óleos de sementes de açafrão e girassol (0,01 a 0,12% dos ácidos graxos totais) (Alasnier et al., 2002).

Pode-se verificar que só a suplementação com CLA não tem sido o bastante para se ter os possíveis benefícios de sua utilização. Desta forma, se faz necessário ter uma alimentação equilibrada e se possível fazer exercícios físicos regularmente. Os riscos da ingestão de alimentos com alto teor de gordura na saúde têm sido conclusivo, porém estudos têm sido feitos para a comprovação dos efeitos benéficos do exercício físico aeróbio associado à dieta (Meilhac et al., 2001; Maeda et al., 2003).

O exercício físico pode alterar o perfil lipídico das lipoproteínas e diminuir o colesterol total (Meilhac et al., 2001). Além disso, pode afetar a composição corporal, diminuindo a massa gorda e aumentando a massa magra (Thomson et al., 2008). Em um estudo recente foi observado que mulheres sedentárias tinham risco aumentado de morte por doenças coronarianas comparadas com outras que praticavam exercício físico regularmente, independente de outros fatores de risco (Hassan et al., 2004).

Modelos animais, como camundongos *knockout* para o gene da apolipoproteína E (Apo E), também têm sido utilizados em estudos envolvendo a gênese da aterosclerose e dislipidemias, pois esses camundongos e seres humanos possuem, com poucas exceções, o mesmo conjunto de genes que controlam o metabolismo de lipoproteínas (Hofker et al., 1998). Este fato reforça a validade do modelo de camundongos deficiente em Apo E para o estudo experimental de doenças coronarianas.

Têm-se demonstrado que animais alimentados com CLA reduzem a gordura corporal (Bhattacharya et al., 2005). Comparados à quantidade de estudos conduzidos em modelos animais que investigaram mudanças na composição corporal, trabalhos em humanos ainda são limitados e discordantes. Porém, algumas evidências sugerem que a suplementação de CLA possa gerar mudanças favoráveis na composição corporal e no perfil de lipoproteínas plasmáticas de algumas pessoas. Com o intuito de simular uma condição de indivíduos que fazem suplementação de CLA como alimento funcional, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do exercício físico associado a dieta hiperlipídica sobre o colesterol total, LDL e ganho de peso de camundongos *Knockout* para o gene que expressa a Apo E suplementados com CLA.

5.2 Métodos

5.2.1 Animais de Experimentação

Foram utilizados 32 camundongos *knockout* para o gene que expressa a Apo E, com doze semanas de vida. Estes foram divididos em quatro grupos: NS (dieta normolipídica com 1% de CLA e sedentário) (n=8), HS (dieta hiperlipídica com 1% de CLA e sedentário) (n=8), NE (dieta normolipídica com 1% de CLA e exercício) (n=8), e HE (dieta hiperlipídica com 1% de CLA e exercício) (n=8). Estes foram alojados em gaiolas coletivas de polipropileno e mantidos em ambiente com temperatura média de 21°C, com alternância de período de 12 horas claro/escuro. Todos receberam água e dieta *ad libitum* e, foram suplementados com 1% CLA. O período do experimento foi de doze semanas e antes da eutanásia todos foram colocados em jejum por 12 horas.

Após a eutanásia com CO₂, o sangue foi coletado por punção na região abdominal, sendo imediatamente centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos. O soro foi congelado e mantido em freezer a -20°C até a análise. Todas as vísceras foram retiradas, separando a carcaça vazia (músculos e ossos) para as determinações de água, proteínas e gordura da carcaça.

Os camundongos foram procedentes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Viçosa. Os procedimentos empregados no estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética do Departamento de Veterinária desta universidade (processo nº. 13/2008) (em anexo), estando de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

5.2.2 Dietas, controle de peso e ingestão alimentar

A dieta hiperlipídica foi elaborada baseando-se na proposta da *Association of Official Analytical Chemistry* - A.O.A.C (1998), e a dieta normal seguindo a proposta da AIN-93M (Reeves et al., 1993), sendo confeccionadas manualmente, mantidas congeladas e protegidas da luz até o momento da utilização. A concentração de CLA (mistura de isômeros) na dieta foi de 1% do total desta. Substituiu-se dez gramas de óleo de soja por dez gramas de CLA em cada quilo de dieta (Tabela 1).

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

Ingredientes	Normolipídica	Hiperlipídica
Caseína	140	200
Maltodextrina	155	-
Sacarose	100	500
Óleo de soja	30	-
Celulose	50	50
Mistura mineral	35	50
Mistura vitamínica	10	10
L-cistina	1,8	-
Bitartarato de colina	2,5	10
Colesterol	-	10
Gordura hidrogenada	-	150
Amido de milho	465,692	-
CLA	10	10
Total (cal/kg dieta)	4002,8	4530

Fonte: Dieta Normolipídica (AIN-93M; Reeves et al., 1993). Dieta Hiperlipídica (Association of Official Analytical Chemistry; 1989).

O peso corporal e a ingestão alimentar foram monitorados semanalmente para controle de peso e consumo de dieta.

5.2.3 Protocolo de atividade física

Os camundongos foram submetidos a um programa progressivo de corrida na esteira (*INSITH*[®], Equipamentos Científicos, Ribeirão Preto – SP, Brasil), cinco dias por semana, 30 min/dia, a uma velocidade de 15 metros por minutos, por 12 semanas consecutivas (adaptado de Meilhac et al., 2001). A progressão da carga do exercício está demonstrada na Tabela 2.

Tabela 2. Progressão da carga no programa de corrida em esteira

Semanas	Velocidade (metros/minuto)	Tempo (minutos/dia)	Freqüência (dias/semana)
1 a 2 (progressão diária)	10 a 15	10 a 30	5
3 a 12	15	30	5

5.2.4 Concentração da água, proteína e gordura corporal

O percentual hídrico das carcaças dos animais foi avaliado pelo método gravimétrico com emprego de calor baseado na evaporação da água em estufa a 105°C por 24 horas. O percentual de gordura foi determinado pelo processo gravimétrico com emprego do aparelho de Soxhlet usando éter etílico como solvente na extração por 8 horas. O percentual de proteína foi calculado pelo método primário de Kjeldahl, por meio da determinação do nitrogênio empregando o fator N x 6,25 (AOAC 1998).

5.2.5 Concentração de Colesterol total, TG e frações

As determinações de colesterol total, TG e HDL foram realizadas baseando-se no método enzimático colorimétrico, utilizando kit enzimático KATAL (Fossati & Prencipe 1982). A concentração de LDL no plasma foi calculada baseando-se na fórmula de Friedewald citado por Warnick et al. (Warnick et al., 1990).

$$\text{LDL} = (\text{colesterol total} - \text{HDL}) - (\text{TG} \times 0,20)$$

5.2.6 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada utilizando o software *Sigma Statistic® for Windows*, versão 3.0, sendo utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis para grupos independentes. O teste de Dunn's foi empregado para análise de múltipla comparação *post-hoc*, quando necessário. O nível de rejeição da hipótese de nulidade foi de P<0,05 ou 5%.

5.3 Resultados

5.3.1 Colesterol total, HDL e LDL

Foram identificadas alterações estatisticamente significativas ($p<0,05$) entre os grupos para o colesterol total e LDL. Pode-se verificar que os animais do grupo HE apresentaram maiores valores de colesterol total e LDL, quando comparado com os animais dos grupos NE e NS. No entanto, os valores desses parâmetros não diferiram do grupo HS. Em relação à concentração de HDL, não foram observadas alterações significativas entre os grupos ($p>0,05$). Os dados destas análises estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Conteúdo de colesterol total, HDL e LDL nos camundongos Apo E ^(-/-)

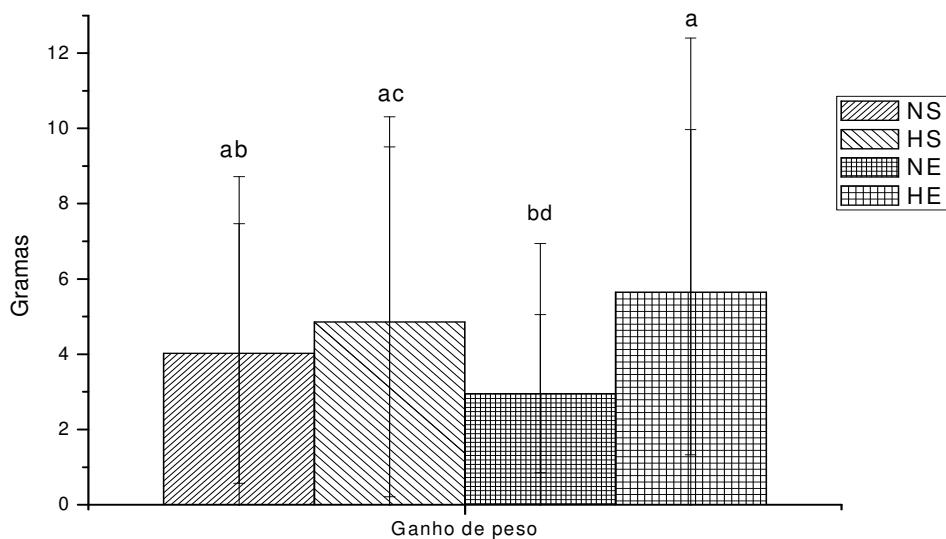
Grupos	Colesterol Total (mg/dL)	HDL-c (mg/dL)	LDL-c (mg/dL)
NS (n=8)	436 (331,25 - 481,5) ^{bc}	26,25 (22,5 - 27,5) ^a	390,25 (290,65 – 435) ^{bc}
HS (n=8)	497,5 (381 - 658,75) ^{ac}	20 (17,25 - 24,5) ^a	459,45 (347,6 - 635,75) ^{ac}
NE (n=8)	399,5 (371,5 – 445) ^{bc}	25 (24,5 – 30) ^a	350,7 (334 - 403,5) ^{bc}
HE (n=8)	850 (599 - 1156,25) ^a	16,25 (12,5 - 23,25) ^a	832,75 (568,25 - 1138,75) ^{ab}

Legenda: NS – grupo com dieta normolipídica sedentário; HS – grupo com dieta hiperlipídica sedentário; NE – grupo com dieta normolipídica exercitado; HE – grupo com dieta hiperlipídica exercitado. Dados: mediana (mínimo – máximo). Significância ($P<0,05$): valores com letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa ($P>0,05$) ao teste de Dunn's.

5.3.2 Ganho de Peso

Não foi observada diferença estatística entre o peso corporal inicial e final dos animais dos grupos experimentais ($p > 0,05$) (Tabela 4). Todavia, os animais do grupo HE e HS apresentaram maior ganho de peso, quando comparado com os camundongos do grupo NE. No entanto, os valores desse parâmetro não diferiram com o grupo NS (Figura 1).

Figura 1. Ganho de peso de camundongos Apo E^(-/-)



Legenda: NS – grupo com dieta normolipídica sedentário; HS – grupo com dieta hiperlipídica sedentário; NE – grupo com dieta normolipídica exercitado; HE – grupo com dieta hiperlipídica exercitado. Dados: mediana (mínimo – máximo). Significância ($P<0,05$): valores com letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa ($P>0,05$) ao teste de Dunn's.

5.3.3 Composição Corporal

Foram identificadas alterações estatisticamente significativas ($p<0,05$) entre os grupos para o percentual de água. Pode-se verificar que os animais do grupo HE apresentaram maiores valores na concentração de água na carcaça, quando comparado com os animais do grupo HS. No entanto, os valores desses parâmetros não diferiram dos demais grupos. Em relação à concentração do percentual de gordura, proteína e cinzas, não foram observadas alterações significativas entre os grupos ($p>0,05$). Os dados destas análises estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição corporal dos camundongos ApoE^(-/-)

Grupos	Água (%)	Gordura (%)	Proteínas (%)	Cinzas (%)
NS (n=8)	64,61 (60,68 - 65,63) ^{ab}	4,41 (2,75 - 6,37) ^a	20,82 (20,59 - 21,11) ^a	1,28 (1,25 - 1,34) ^a
HS (n=8)	64,23 (63,14 - 64,64) ^b	6,79 (4,97 - 7,67) ^a	19,3 (18 - 20,27) ^a	1,27 (1,18 - 1,4) ^a
NE (n=8)	64,2 (62,77 - 64,93) ^{ab}	5,85 (4,11 - 7,29) ^a	20,61 (18,96 - 21,21) ^a	1,45 (1,4 - 1,53) ^a
HE (n=8)	66,34 (65,71 - 66,76) ^a	4,22 (1,95 - 6,13) ^a	20,36 (19,38 - 21,1) ^a	1,21 (1,11 - 1,37) ^a

Legenda: NS – grupo com dieta normolipídica sedentário; HS – grupo com dieta hiperlipídica sedentário; NE – grupo com dieta normolipídica exercitado; HE – grupo com dieta hiperlipídica exercitado. Dados: mediana (mínimo – máximo). Significância (P<0,05): valores com letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa (P>0,05) ao teste de Dunn's.

5.4 Discussão

No presente estudo foi utilizada uma dieta hiperlipídica com 1% de colesterol e 15% de gordura hidrogenada comparada com a normolipídica, onde não se utiliza estes compostos e, a única fonte lipídica é o óleo de soja. Já em relação ao suplemento, utilizou-se 1% de CLA sobre o consumo total da dieta (normal e hiperlipídica) em todos os grupos e, apenas dois grupos foram submetidos ao exercício físico moderado, com duração de 12 semanas.

A discussão a respeito da dieta hiperlipídica é conclusiva no que diz respeito às alterações das lipoproteínas plasmáticas, peso e composição corporal, porém os questionamentos em relação ao efeito desta em indivíduos que praticam atividade física têm sido acirrados frente aos efeitos fisiológicos relatados por muitos grupos de pesquisa nos últimos anos. Os estudos que tratam dos efeitos da atividade física sobre o organismo variam de acordo com o volume (tempo e freqüência) e intensidade do esforço (leve, moderado e intenso) e, também, do tipo de atividade física (natação, salto e corrida), envolvendo ratos e camundongos, com tempo de experimentação variando de 2 a 12 semanas.

Em relação ao ácido linoleico conjugado, a monitoração quanto à sua suplementação tem recebido grande notoriedade no campo da saúde, não apenas por sua

ação isolada na prevenção e no controle das doenças cardiovasculares (Toomey et al., 2003; Battacharya et al., 2006), mas devido às suas características físicas serem semelhantes aos ácidos graxos insaturados. Há especulações de que o CLA pode operar como um ligante de vários receptores nucleares (Pariza et al., 2000), como os PPAR (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor*), que são fatores críticos no metabolismo de lipídios no fígado e tecido adiposo (Taylor & Zahradka, 2004).

Dietas hiperlipídicas devem conter 30% ou mais de energia na forma de gordura para aumentar o acúmulo lipídico em roedores (Hill et al., 2000). No entanto, neste trabalho foi utilizado uma dieta hiperlipídica com 1% de colesterol, 15% de gordura hidrogenada e 50% de sacarose, sendo esse último uma quantidade cinco vezes maior que a normolipídica. Sendo assim, a dieta hiperlipídica foi um fator prejudicial para os camundongos, pois demonstrou que quando indivíduos fazem atividade física e tem este tipo de alimentação, o exercício não é um fator protetor, comparado com os que fazem uma alimentação normal.

Com relação aos níveis séricos de colesterol total e LDL, foram verificadas diferenças significativas entre os grupos analisados. Observou-se uma elevação nos grupos exercitados com dieta hiperlipídica em comparação com os grupos de dieta normolipídica sedentário ou exercitado. Bernardes et al. (2004), também verificaram aumento da concentração de colesterol total entre grupos treinados com natação em relação aos sedentários, ambos alimentados com dieta hipercalórica. Eles relatam que a constante utilização de gordura como substrato energético pode acelerar a biossíntese de colesterol. Entretanto, Quiles et al. (2003) mostraram que o exercício físico concomitante ao consumo de dieta composta de fonte lipídica monoinsaturada, como óleo de oliva, reduz os níveis de colesterol plasmáticos. Morais et al. (2003) observaram uma redução significativa dos níveis de colesterol total quando o nível de lipídios da dieta passou de 7 para 14%. Porém, Champe & Harvey (2000) relatam que o nível de colesterol é moderadamente reduzido quando dietas pobres em colesterol são consumidas. A elevação dos níveis de colesterol e LDL entre os animais hiperlipídicos exercitados, observada no presente estudo, pode ser também, devido à maior densidade calórica na dieta hiperlipídica (Tabela 1). No entanto, o fator exercício não demonstrou ser eficiente na redução dessas lipoproteínas plasmáticas.

Apesar dos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica exercitados terem apresentado menores concentrações de HDL, estes não demonstraram diferenças estatísticas (Tabela 3). Os resultados de HDL não apresentaram diferenças significativas

em ambos os tipos de dietas fornecidas, dados corroborados com estudo de Morais et al. (2003). Estes observaram diferenças não significativas no HDL nos animais alimentados com dieta normolipídica à base de óleo de soja, com teores iguais aos utilizados no presente estudo. No entanto, os animais que consumiram a dieta hiperlipídica tiveram aumento dos níveis de HDL, o que não foi observado em nosso estudo.

O exercício físico não mostrou ser eficaz em elevar os níveis de HDL, contrariando os achados de Bernardes et al. (2004) e Couillard et al. (2001). É bem estabelecido que o exercício físico favorece o aumento dos níveis da HDL. Isso se faz importante devido ao fato de a HDL ser a única lipoproteína capaz de realizar o transporte reverso do colesterol, retirando o excesso de colesterol livre não só de membranas celulares como do próprio subendotélio e transportando até o fígado para ser degradado (Shils et al., 2005). O aumento da concentração das HDL pode não ter sido observado em função da freqüência e intensidade do exercício aeróbio. Tal evento advém do estímulo à lipoproteína lipase, considerando-se que a geração de partículas de HDL é um processo inerente ao metabolismo das lipoproteínas ricas em triglicérides (Despres et al., 1999), bem como da redução no catabolismo da apolipoproteína A-I e diminuição da atividade da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) (Ferguson et al., 1998). No entanto, o papel do exercício sobre a elevação da concentração plasmática de HDL parece estar condicionado a diversos fatores, tais como: melhora na resistência à insulina, redução de peso corporal e trigliceridemia, perfil lipídico e polimorfismos genéticos (particularmente neste estudo a Apo E) e proteínas envolvidas no metabolismo da HDL (Ardern et al., 2004). Tais fatores são responsáveis pela grande variabilidade da resposta da HDL frente ao exercício físico.

Em relação ao ganho de peso, pode-se observar que o grupo HE e HS apresentaram maior ganho de peso, quando comparado com o grupo NE. Este fato está diretamente relacionado com o tipo de dieta e, também, com o exercício físico. Os dados de Pellizzon et al. (2002) não corroboram com os nossos, pois mostraram que os ratos alimentados com dieta normolipídica à base de óleo de soja e treinados com natação por seis semanas apresentaram-se mais pesados que ratos com dieta hiperlipídica, supondo que o exercício freqüente de natação foi capaz de elevar a massa muscular dos animais normolipídicos. Sabe-se que a prática de exercício físico regular pode levar a modificações da composição corporal, aumentando a massa muscular e reduzindo a gordura corporal (Thonson et al., 2008). Durante a prática de exercícios

aeróbios, as reservas de glicogênio são utilizadas nos primeiros minutos de atividade e, à medida que o exercício prossegue, há redução na utilização do glicogênio com aumento concomitante na utilização das gorduras (Thomson et al., 2008).

Analizando a composição corporal, não foi verificado alterações nas concentrações de gordura, proteína e cinzas numa análise inter-grupos. O protocolo utilizado em nosso estudo, em que estipulava como tempo de experimento um período de 12 semanas e uma atividade moderada durante 30 minutos, pode ter influenciado na ausência de diferenças relevantes nestes parâmetros, nos diferentes grupos analisados. Entretanto, o grupo HE demonstrou uma alteração significativa da concentração de água na carcaça, comparado com o grupo HS. Este fato pode estar relacionado ao glicogênio muscular, pois os animais do grupo HE apresentaram maior ganho de peso corporal e maior concentração de proteína, apesar de não significativo, que os animais do grupo HS. Bhattacharya et al. (2005), quando estudaram camundongos BALB/C alimentados com dieta rica em gordura, suplementados com 0,4% de CLA e submetidos a exercício moderado em esteira, verificaram diminuição da gordura corporal total e aumento da proteína no músculo.

Os dados do presente estudo não possibilitam especificar os mecanismos responsáveis pelos efeitos da dieta hiperlipídica e do exercício nos percentuais de água da carcaça, fato este que pode estar relacionado com o glicogênio, pois este é capaz de armazenar moléculas de água em suas estruturas (Thonsom et al., 2008). Todavia, a não alteração do percentual de gordura pode estar relacionada uma não modificação na proliferação e diferenciação de pré-adipócitos, a um gasto energético insuficiente para a utilização de gorduras como substrato energético e a não alteração da atividade das enzimas carnitina palmitoiltransferase e lipase lipoprotéica.

Conclui-se que, o exercício físico, na intensidade e volume do presente estudo, associado a uma dieta hiperlipídica aumenta o colesterol total e o LDL sérico e, eleva o ganho de peso de camundongos *Knockout* para o gene que expressa a apoE suplementados com CLA.

Referências bibliográficas

1. Warburton DER, Nicol CW, Bredin SSD. Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ*. 2006;174(8):801 – 809.
2. Bhattacharya A, Rahman MM, Sun D, Lawrence R, Mejia W, McCarter R, et al. The combination of dietary conjugated linoleic acid and treadmill exercise lowers gain in body fat mass and enhances lean body mass in high fat-fed male Balb/C mice. *J Nutr*. 2005;135(5):1124-30.
3. Bell S, Goodrick G. A functional food product for the management of weight. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2002; 42(2):163-78.
4. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais. In: Regulamento técnico. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 1999. Resolução n. 18.
5. Bocca C, Bozzo F, Gabriel L, Miglietta A. Conjugated linoleic acid inhibits Caco-2 cell growth via ERK-MAPK signaling pathway. *J Nutr Biochem*. 2007;18(5):332-40.
6. Bhattacharya A, Banu J, Rahman M, Causey J, Fernandes G. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *J Nutr Biochem*. 2006;17(12):789-810.
7. Whigham LD, Cook ME, Atkinson RL. Conjugated linoleic acid: implications for human health. *Pharmacol Res*. 2000;42(6):503-10.
8. Alasnier C, Berdeaux O, Chardigny JM, Sebedio JL. Fatty acid composition and conjugated linoleic acid content of different tissues in rats fed individual conjugated linoleic acid isomers given as triacylglycerols small star, filled. *J Nutr Biochem*. 2002;13(6):337-45.
9. 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*. 2001;21(10):1681-8.
10. Maeda S, Tanabe T, Miyauchi T, Sugawara J, Iemitsu M, Kuno S, Ajisaka R, Matsuda M. Aerobic exercise training reduces plasma endothelin-1 concentration in older women. *J Appl Physiol*. 2003; 95: 336–341.
11. Thomson RL, Buckley JD, Noakes M, Clifton PM, Norman RJ, Brinkworth GD. The effect of a hypocaloric diet with and without exercise training on body composition, cardiometabolic risk profile, and reproductive function in overweight

- and obese women with polycystic ovary syndrome. *J Clin End Metab.* 2008;93(9):3373-80.
12. Hassan W, Fawzy M. Moving? With Coronary Artery Disease: Just Keep onFitness and Quality of Life in Older Women Exercise Training Improves Overall Physical. *Chestjournal.*2004;126:1009 – 1010.
 13. Hofker MH, van Vlijmen BJ, Havekes LM. Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1998;137(1):1-11.
 14. 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.
 15. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. 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. *J Nutr Biochem.* 1993;123(11):1939-51.
 16. AOAC. Official methods of analysis. . AOAC – Association of Official Analytical Chemists ed. Washington, D.C. 1998.
 17. Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem.* 1982;28(10):2077-80.
 18. Warnick GR, Knopp RH, Fitzpatrick V, Branson L. Estimating low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald equation is adequate for classifying patients on the basis of nationally recommended cutpoints. *Clin Chem.* 1990;36(1):15-9.
 19. Toomey S, Roche H, Fitzgerald D, Belton o. Regression of pre-established atherosclerosis in apoE -/- mouse by conjugated linoleic acid. *Bioch Soc Trans.*2003;31:1075-1079.
 20. Pariza MW, Park Y, Cook MF. Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. *Proc Soc Exp Bio Med,* 2000;223:8-13.
 21. Taylor CG, Zahradka P. Dietary conjugated linoleic acid and insulin sensitivity and resistance in rodent models. *Am J Nutr.*2004;79:1164s – 1168.
 22. Hill JO, Melanson EL, Wyatt HT. Dietary fat intake and regulation of energy balance: implications for obesity. *J Nutr.* 2000; 130(2S Suppl):284S-8S.
 23. Bernardes D, Manzoni MSJ, Sousa CP, Tenório N, Dâmaso AR. Efeitos da dieta hiperlipídica e do treinamento de natação sobre o metabolismo de recuperação ao exercício em ratos. *Rev Bras Educ Fis Esp.* 2004; 18:191-200.

24. Quiles JL, Huertas JR, Ochoa JJ, Battino M, Mataix J, Manàs M. Dietary Fat (Virgin Olive Oil or Sunflower Oil) and Physical Training Interactions on Blood Lipids in the Rat. *Nutrition*. 2003; 19(4):363–68.
25. Morais CSN, Barcelos MFP, Sousa RV, Lima HM, Lima AL. Efeitos das fontes e níveis de lipídeos nas dietas de ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) sobre frações lipídicas do sangue. *Cienc Agrotec*. 2003;5:1082-88.
26. Champe PC, Harvey RA. Bioquímica ilustrada. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 446 p.
27. Couillard C, Despres JP, Lamarche B, Bergeron J, Gagnon J, Leon AS, et al. Effects of endurance exercise training on plasma HDL cholesterol levels depend on levels of triglycerides: evidence from men of the health risk factors, exercise training and genetics (HERITAGE) family study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21(7):1226-32.
28. Shils ME, Shike M, Olson JA. Modern Nutrition In Health and Disease. 10 ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
29. Despres JP, Gagnon J, Bergeron J, Couillard C, Leon AS, Rao DC, et al. Plasma post-heparin lipase activities in the HERITAGE Family Study: the reproducibility, gender differences, and associations with lipoprotein levels. *Health, Risk factors, exercise Training and Genetics. Clin Biochem*. 1999; 32(3):157-65.
30. Ferguson MA, Alderson NL, Trost SG, Essig DA, Burke JR, Durstine JL. Effects of four different single exercise sessions on lipids, lipoproteins, and lipoprotein lipase. *J Appl Physiol*. 1998; 85(3):1169-74.
31. Ardern CI, Katzmarzyk PT, Janssen I, Leon AS, Wilmore JH, Skinner JS, et al. Race and sex similarities in exercise-induced changes in blood lipids and fatness. *Med Sci Sports Exerc*. 2004; 36(9):1610-5.
32. Pellizzon M, Buisson A, Ordiz F, Jr LSA, Jen KLC. Effects of Dietary Fatty Acids and Exercise on Body-Weight Regulation and Metabolism in Rats. *Obes Res*. 2002; 10(9):947-55.

6. ARTIGO ORIGINAL “III”

A combinação de exercício físico e CLA não altera a progressão de aterosclerose de camundongos knockout para o gene da Apo E alimentados com dietas normo e hiperlipídica.

Resumo

Objetivo: Avaliar os efeitos da combinação de exercício físico e ácido linoleico conjugado (CLA) na progressão de aterosclerose de camundongos knockout para o gene

da Apo E alimentados com dietas normo e hiperlipídica. **Métodos:** Um total de 26 camundongos foram divididos e submetidos a exercício físico e sedentarismo associados a dietas normo e hiperlipídica suplementadas ou não com 1% de CLA, durante 12 semanas. Utilizou-se ANOVA e Tukey ao nível de significância de 5%.

Resultados: Pode-se verificar que os animais exercitados e alimentados com dieta hiperlipídica suplementada com CLA, apresentaram maiores valores de colesterol total e LDL no plasma e, aumento do fígado, quando comparado com os animais que ingeriram dieta normolipídica, independente do exercício e da suplementação com CLA. Estes, também, demonstraram menor nível de HDL sérica, em relação aos animais que ingeriram dieta hiperlipídica sem CLA e sedentários. A alteração na progressão da aterosclerose não foi identificada em nenhum dos animais dos diferentes grupos. **Conclusões:** A combinação do exercício físico e dieta hiperlipídica suplementada com CLA aumentaram as concentrações de colesterol total e LDL plasmático e o peso do fígado e, diminuíram as concentrações de HDL sérica. E, também, esta combinação, independente do tipo de dieta, não foi eficiente na redução da progressão de aterosclerose de camundongos *Knockout* para o gene que expressa a apolipoproteína E.

Palavras-chaves: Dislipidemia; Apolipoproteína E; Aterogênese; Sedentarismo

6.1 Introdução

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre. A formação da placa aterosclerótica inicia-se com uma agressão ao endotélio vascular devido a diversos fatores de risco como elevação de lipoproteínas aterogênicas, sendo elas: lipoproteína de baixa densidade (LDL), de densidade intermediária (IDL), de densidade muito baixa (VLDL) e remanescentes de quilomícrons, hipertensão arterial e/ou tabagismo (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007).

Quase a totalidade da LDL presente no plasma é originada do metabolismo da VLDL, sendo removida pelo receptor B/E hepático. Desta forma, a presença de um maior número de cópias da Apo E (apoliproteína E), estimulam a interação com o receptor B/E e receptor de partículas remanescentes (ambos no fígado). A apo E, também é uma proteína integrante da HDL (lipoproteína de alta densidade), VLDL, IDL e quilomícrons, além dos produtos de degradação lipolítica, como remanescentes de quilomícrons (Brandão et al., 2004). Essa apolipoproteína, identificada no início da década de 1970, tem sido extensivamente estudada principalmente por sua função no metabolismo dos lipídios e pelo envolvimento no transporte de colesterol em vários tecidos (Shore & Shore, 1973).

O consumo de ácido linoleico conjugado (CLA) tem demonstrado efeito positivo sobre o perfil lipídico do plasma e anti-aterogênico em coelhos (Kritchevsky et al., 2002). CLA é a denominação dada a um grupo heterogêneo de ácidos graxos com 18 carbonos, com duas duplas ligações, formadas através de biohidrogenação e oxidação por processos naturais (Bocca et al., 2007). Na molécula não há nenhum grupo metileno separando as duplas ligações como ocorre nos ácidos linoleicos. Ao invés disso, há uma dupla ligação conjugada com configuração em *cis* (c) ou *trans* (t), onde, predominantemente, é apresentada em posições c9, t11 e t10, c12 (Bhattacharya et al., 2006). Encontrado naturalmente em muitos produtos animais, é sintetizado por bactérias do rúmen, embora possa ser sintetizado em menor quantidade por animais não ruminantes (Whigham et al., 2000). As principais fontes dietéticas de CLA são: carne bovina (3-4 mg/g), leite e manteiga (5-7 mg/g) e, em menor proporção, óleos de sementes de açafrão e girassol (0,01 a 0,12% dos ácidos graxos totais) (Alasnier et al., 2002). É importante ressaltar ainda que alguns efeitos indesejáveis relacionados ao uso do CLA foram encontrados, tanto em estudos com humanos quanto em animais. Há

relatos de aumento da resistência à insulina e aumento da glicose e insulina de jejum (Smedman et al., 2001); elevação da peroxidação lipídica (Riserus et al., 2001) e, redução da HDL em humanos obesos tratados com CLA (Steck et al., 2007).

Exercício físicos aeróbios moderados, também tem sido utilizado como forma de prevenir ou reverter a formação de placas ateromatosas nas artérias, podendo alterar o perfil lipídico plasmático, diminuindo o colesterol total (Meilhac et al., 2001). Entretanto, o impacto da prática habitual de exercícios físicos no colesterol pode não se confirmar com a mesma intensidade dependendo da qualidade da alimentação, ou seja, da ingestão calórica e de gordura além da necessidade diária de cada indivíduo.

Acompanhamento de indivíduos praticantes de exercícios físicos em academias tem demonstrado que a prática deste tem sido uma estratégia para prevenção ou reversão da doença arterial coronariana (DAC) e dislipidemias. Estes indivíduos também fazem uso de recursos ergogênicos como o CLA, tentando a maximização dos efeitos no organismo, porém não se atentando para o controle da dieta, com isso consumindo muita gordura e excesso de calorias. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da combinação de exercício físico e ácido linoleico conjugado na progressão de atherosclerose de camundongos knockout para o gene da Apo E alimentados com dietas normo e hiperlipídica.

6.2 Metodologia

6.2.1 Animais de Experimentação

Foram utilizados 26 camundongos *knockout* para o gene que expressa a Apo E, com doze semanas de vida. Os animais distribuídos em quatro grupos, pesando em média $19,62 \pm 2,62$ gramas: NS (dieta normolipídica e sedentário) ($n=5$), HS (dieta hiperlipídica e sedentário) ($n=5$), NECLA (dieta normolipídica, exercício e suplementação com 1% de CLA) ($n=8$), e HECLA (dieta hiperlipídica, exercício e suplementação com 1% de CLA) ($n=8$).

Cada grupo foi alocado em gaiolas coletivas de polipropileno e mantido em ambiente com temperatura média de 21°C, com alternância de período de 12 horas claro/escuro. Todos receberam água e dieta *ad libitum*. O período do experimento foi de doze semanas e antes da eutanásia todos foram colocados em jejum por 12 horas.

Após a eutanásia em ambiente de CO₂, o sangue foi coletado por punção na região abdominal, sendo imediatamente centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos. O soro foi congelado e mantido em freezer a -20°C até a análise. Todas as vísceras foram

retiradas, separando o fígado para determinação do peso e o coração junto com a aorta para análise da aterosclerose.

Os camundongos foram procedentes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Viçosa. Os procedimentos empregados no estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética do Departamento de Veterinária desta universidade (processo nº. 13/2008) (em anexo), estando de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

6.2.2 Dietas

A dieta hiperlipídica foi elaborada baseando-se na proposta da *Association of Official Analytical Chemistry - A.O.A.C* (1998), e a dieta normal seguindo a proposta da AIN-93M (Reeves et al., 1993), sendo confeccionadas manualmente e mantidas congeladas e protegidas da luz até o momento da utilização. A concentração de CLA (mistura de isômeros) na dieta foi de 1% do total desta. Substituiu-se dez gramas de óleo de soja por dez gramas de CLA em cada quilo de dieta nos grupos: NECLA e HECLA (Tabela 1).

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

Ingredientes	NS	NECLA	HS	HECLA
Caseína	140	140	200	200
Maltodextrina	155	155	-	-
Sacarose	100	100	500	500
Óleo de soja	40	30	10	-
Celulose	50	50	50	50
Mistura mineral	35	35	50	50
Mistura vitamínica	10	10	10	10
L-cistina	1,8	1,8	-	-
Bitartarato de colina	2,5	2,5	10	10
Colesterol	-	-	10	10
Gordura hidrogenada	-	-	150	150
Amido de milho	465,692	465,692	-	-
CLA	-	10	-	10
Total (cal/kg dieta)	4002,8	4002,8	4530	4530

Legenda: NS – dieta normolipídica sem CLA e sedentário; NECLA – dieta normolipídica com CLA e exercício; HS – dieta hiperlipídica sem CLA e sedentário; HECLA – dieta hiperlipídica com CLA e exercício. Grupo NS e NECLA (dieta preparada segundo AIN-93M, Reeves et al., 1993); grupo HS e HECLA (dieta preparada segundo a Association of Official Analytical Chemistry, 1989).

6.2.3 Protocolo de atividade física

Todos os camundongos foram submetidos a um programa progressivo de corrida na esteira (*INSITH*[®], Equipamentos Científicos, Ribeirão Preto – SP, Brasil), cinco dias por semana, 30 min/dia, a uma velocidade de 15 metros por minutos, por 12 semanas consecutivas (segundo MEILHAC et al., 2001). A progressão da carga do exercício está demonstrada na tabela 2.

Tabela 2. Programa de corrida utilizado nos camundongos ApoE ^(-/-)

Semanas	Velocidade (metros/minuto)	Tempo (minutos/dia)	Freqüência (dias/semana)
1 a 2 (progressão diária)	10 a 15	10 a 30	5
3 a 12	15	30	5

6.2.4 Concentração de Colesterol total, HDL e LDL

As determinações de colesterol total e o HDL-c foram realizadas baseando-se no método enzimático colorimétrico, utilizando kit enzimático KATAL (Fossati & Prencipe, 1982). A concentração de LDL-c no plasma foi calculada baseando-se na fórmula de Friedewald citado por Warnick et al. (1990).

$$\text{LDL} = (\text{colesterol total} - \text{HDL}) - (\text{TG} \times 0,20)$$

6.2.5 Peso do fígado

O fígado extraído foi imerso, imediatamente, em solução fisiológica para retirar o excesso de sangue, em seguida foi secado e colocado sobre papel alumínio previamente tarado e pesado em balança digital Gehaka BG2000. Após a aferição do peso o fígado foi descartado.

6.2.6 Análise Histopatológica e Morfométrica

O coração foi retirado em bloco com os vasos da base e a aorta; que foi seccionada na sua porção torácica descendente até a bifurcação renal e, em seguida imerso em solução fisiológica. Para fixação em parafina, o coração foi secado e seccionado transversalmente na base, tendo como referência macroscópica a válvula aórtica. Foram feitos, em média, dez cortes histológicos semi-consecutivos medindo 5 μm de espessura e separados entre si por 5 μm , completando uma amostra de aproximadamente 0,2 mm da raiz aorta, a partir da sua saída. Os cortes histopatológicos foram corados com hematoxilina e eosina (HE).

A análise morfométrica foi desenvolvida usando uma média da área das cinco maiores lesões de cada animal. As secções de artéria foram selecionadas a partir da observação em microscópio óptico Zeiss acoplado a vídeo-câmera, sendo as imagens congeladas utilizando-se um computador.

Foi utilizada a subtração da área entre a luz provável e a luz real da artéria lesada. A luz real foi medida manualmente contornando-se o endotélio e eventuais protuberâncias, como placas ou estrias gordurosas. Já a luz provável da artéria foi obtida através de medida feita manualmente no contorno do limite entre a camada muscular e a camada íntima das artérias. Este resultado é representativo da obstrução para cada caso. Cada medida foi feita com duas repetições, trabalhando-se com a média das mesmas medidas.

6.2.7 Análise estatística

Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) para comparações entre grupos. O teste de Tukey foi empregado para análise de múltipla comparação *post-hoc*, quando necessário. Utilizou-se o *software* Sigma Stat versão 3.0 para as análises estatísticas, empregando o nível de significância estatística de $p<0,05$.

6.3 Resultados

6.3.1 Colesterol total, HDL e LDL

Foi identificada modificação significativa ($p<0,05$) para a variável colesterol total e LDL, com o grupo HECLA apresentando maiores valores que o grupo NECLA e NS. Em relação ao HDL, a diferença estatística só foi apresentada entre o grupo HS e HECLA, sendo o valor do primeiro maior que o segundo ($p=0,019$). O resumo da análise de variância para essas variáveis estão expostos na Tabela 3.

Tabela 3 - Conteúdo de colesterol total, HDL e LDL nos camundongos Apo E ^(-/-)

Grupos	Colesterol Total (mg/dL)	HDL-c (mg/dL)	LDL-c (mg/dL)
NS (n=5)	367,6±88,21 ^{bc}	25,4±3,64 ^{ab}	329,6±86,69 ^{bc}
HS (n=5)	503,5±133,71 ^{ac}	36,75±14,99 ^a	453±132,35 ^{ac}
NECLA (n=8)	433,06±155,2 ^{bc}	28,31±9,59 ^{ab}	388,23±142,03 ^{bc}
HECLA (n=8)	932,68±456,01 ^a	17,75±8,81 ^b	905,37±460,37 ^a

Legenda: NS – grupo com dieta normolipídica sedentário; HS – grupo com dieta hiperlipídica sedentário; NECLA – grupo com dieta normolipídica suplementada com CLA e exercitado; HECLA – grupo com dieta hiperlipídica suplementada com CLA e exercitado. Dados: médias ± DP. Significância ($P<0,05$): valores com letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa ($P>0,05$).

6.3.2 Peso do fígado

Os fígados dos diferentes grupos não apresentaram pesos semelhantes, pois o peso do fígado do animais do grupo HECLA foi significativamente maior que o do NECLA ($p=0,003$). A análise de variância para essas variáveis estão expostas na Tabela 4.

Tabela 4. Efeitos da dieta hiperlipídica e da combinação exercício e CLA sobre o peso dos fígados dos camundongos apoE^(-/-) ao fim de 12 semanas de experimento.

Órgão	Grupos			
	NS	HS	NECLA	HECLA
Fígado (g)	1,04±0,04 ^{ab}	1,13±0,24 ^{ab}	0,95±0,15 ^b	1,29±0,17 ^a

Legenda: NS – grupo com dieta normolipídica sedentário; HS – grupo com dieta hiperlipídica sedentário; NECLA – grupo com dieta normolipídica suplementada com CLA e exercitado; HECLA – grupo com dieta hiperlipídica suplementada com CLA e exercitado. Dados: médias ± DP. Significância ($P<0,05$): valores com letras iguais não apresentam diferença significativa ($P>0,05$).

6.3.3 Lesões Ateroscleróticas

As análises histológicas e morfométricas da aorta após 12 semanas de experimento mostraram lesões ateroscleróticas em todos os grupos (em destaque, fotomicrografia representativa da aorta proximal de quatro camundongos Apo E ^(-/-), com cada um representando seu respectivo grupo, Figura1). No entanto, nenhum deles apresentou diferenças significativas ($p>0,05$) entre as áreas lesadas (Tabela 6).

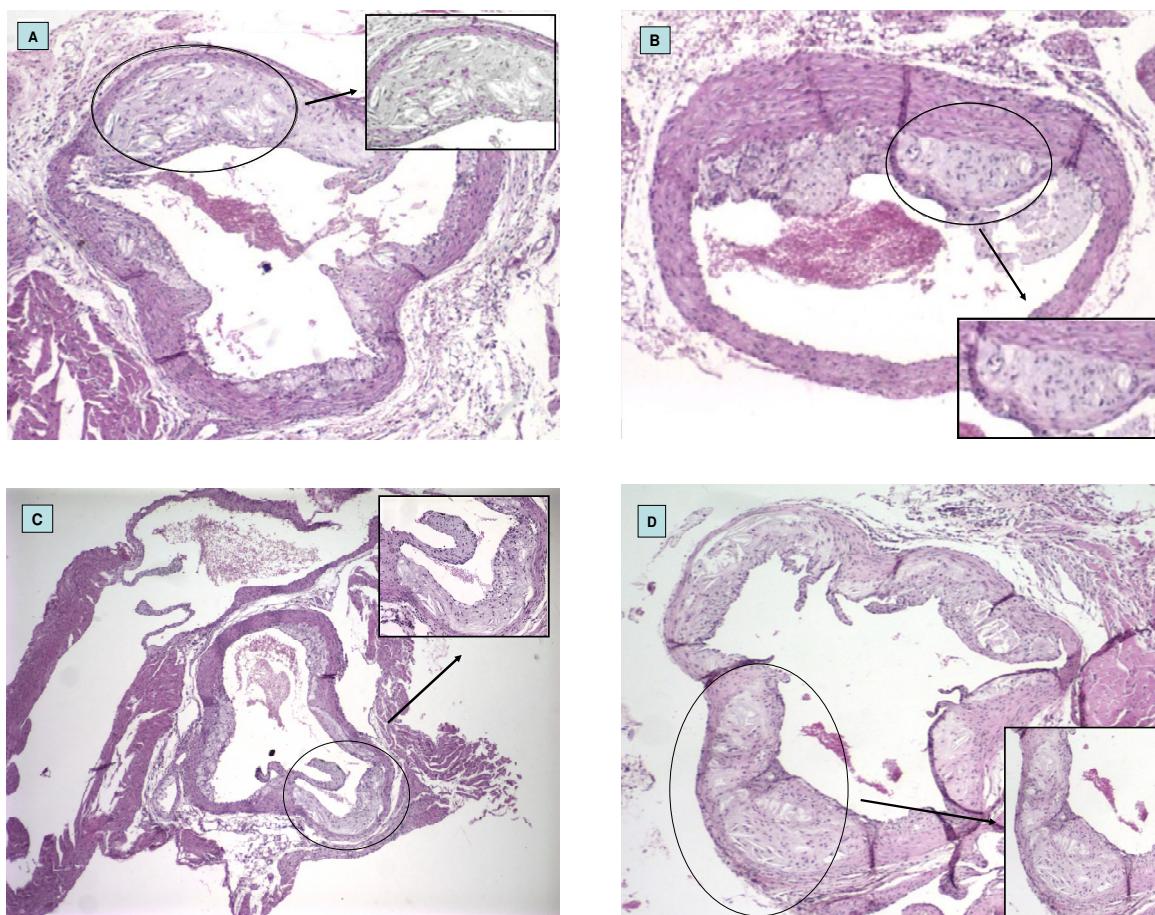


Figura 1. Fotomicrografia (ampliação de 4x) representativa da aorta proximal de camundongos Apo E ^(-/-).

Legenda: Fotomicrografia A, grupo com dieta normolipídica sedentário (NS); Fotomicrografia B, grupo com dieta hiperlipídica sedentário (HS); Fotomicrografia C; grupo com dieta normolipídica suplementada com CLA e exercitado (NECLA); Fotomicrografia D, grupo com dieta hiperlipídica suplementada com CLA e exercitado (HECLA). Círculo, em todas as fotos, destaca formação das lesões. Seta fina indica, em todas as fotos, ampliação da lesão em 20X. Em destaque, aspecto das lesões com capa fibrosa, cristais de colesterol, alterações degenerativo-necróticas e células xantomizadas.

Tabela 6. Área da lesão da aorta (mm^2) dos camundongos Apo E ^(-/-) ao fim de 12 semanas de experimento.

Órgão	Grupos			
	NS	HS	NECLA	HECLA
Coração/Aorta	$2,9 \pm 2,26^{\text{a}}$	$9,81 \pm 8,46^{\text{a}}$	$3,94 \pm 3,12^{\text{a}}$	$6,63 \pm 3,51^{\text{a}}$

Legenda: NS – grupo com dieta normolipídica sedentário; HS – grupo com dieta hiperlipídica sedentário; NECLA – grupo com dieta normolipídica suplementada com CLA e exercitado; HECLA – grupo com dieta hiperlipídica suplementada com CLA e exercitado. Dados: médias \pm DP. Significância ($P < 0,05$): valores com letras iguais não apresentam diferença significativa ($P > 0,05$).

6.4 Discussão

No presente estudo, a dieta hiperlipídica foi um fator prejudicial para a saúde dos camundongos, independentemente da prática de exercícios físicos e suplementação com CLA. Comparando o grupo HECLA com os grupos NECLA e NS observa-se que os níveis de colesterol total e LDL foram aumentados significativamente no grupo HECLA. Este fato pode ser explicado pela alta densidade calórica da dieta hiperlipídica, assim como, pela alta quantidade de gorduras saturadas, comparada com a dieta normolipídica. Estes resultados corroboram com os estudos de Bernardes et al (2004), que verificaram aumento da concentração de colesterol total nos grupos treinados com natação em relação aos sedentários, ambos alimentados com dieta hiperlipídica. Estes relatam que a constante utilização de gordura como substrato energético pode acelerar a biossíntese do colesterol. Entretanto, Quiles et al (2003) mostraram que o exercício físico concomitante ao consumo de dieta composta de fonte lipídica monoinsaturada, como óleo de oliva, reduz os níveis de colesterol plasmáticos. Em relação ao consumo de CLA, Botelho et al (2007) verificaram diminuição do colesterol total quando ratos foram suplementados com 4% de CLA na dieta, aumento do colesterol com suplementação de 1% de CLA e manutenção dos níveis de colesterol quando os animais foram suplementados com 2% de CLA, sendo todas as suplementações ocorridas num período de 21 dias.

Está bem estabelecido que o exercício físico favorece o aumento dos níveis da HDL. Isso se faz importante, pois a HDL é a única lipoproteína capaz de realizar o transporte reverso do colesterol, retirando o excesso de colesterol livre não só de membranas celulares como do próprio subendotélio e transportando até o fígado para

ser degradado (Shils et al, 2005). No entanto, o grupo HS, apesar de sedentário, demonstrou maiores valores ($p<0,05$) da HDL que o grupo HECLA. O aumento da concentração da HDL pode não ter sido observado em função da freqüência e intensidade do exercício aeróbio e, também da interação do exercício e do ácido linoleico conjugado. O papel do exercício físico sobre a elevação da concentração plasmática da HDL parece estar condicionado a fatores como melhora na resistência à insulina, redução de peso corporal e trigliceridemia, perfil lipídico prévio e polimorfismos genéticos de enzimas e proteínas envolvidas no metabolismo da HDL. Tais fatores são responsáveis pela grande variabilidade da resposta do HDL frente ao exercício físico (Ardern et al, 2004).

Em relação à suplementação de CLA, o grupo HS demonstrou maiores valores da HDL do que o grupo HECLA. Resultado semelhante a este estudo foi relatado por Steck et al (2007), que verificaram diminuição da HDL em humanos obesos suplementados com 3,4 ou 6,4 g/dia de CLA por um período de 12 semanas. Contudo, Gavino et al (2000) trabalharam com hamsters alimentados com dieta rica em gordura e suplementados com 1% de CLA durante seis semanas, não verificando diferenças significantes na HDL. Assim como Botelho et al (2007), estudando humanos jovens, todos suplementados com 5,5 g/dia de CLA durante 5 semanas, também não relataram diferenças significantes nesta lipoproteína.

Os animais do grupo HECLA apresentaram maior peso no fígado ($p<0,05$) que o grupo NECLA. Estes resultados estão diretamente relacionados ao consumo de dieta hiperlipídica, pois ambos fizeram atividade física e consumiram CLA. No entanto, não foi encontrado na literatura um desenho experimental semelhante a este estudo para a análise do peso do fígado. Porém, Gaíva et al (2003), utilizando ratos alimentados com dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados advindos da combinação de óleo de soja e óleo de peixe, apresentaram maior peso do fígado que ratos alimentados com dietas que tinham como fonte lipídica apenas o óleo de soja ou o óleo de peixe. Este aumento no peso do fígado dos animais podem estar relacionados a incorporação de ácidos graxos no fígado.

Outro fato a ser destacado é a ocorrência e gravidade das lesões ateroscleróticas. Observa-se que o CLA pode diminuir a extensão da aterosclerose, como foi demonstrado em outros modelos experimentais, como coelhos e camundongos BALB/C (Kritchevsky et al, 2002; Battacharya et al, 2006). Segundo o estudo de Toomey et al (2006), a administração de CLA em camundongos *knockout* para o gene da Apo E, com

lesões ateroscleróticas pré-estabelecidas, não só retardou a progressão, como também induziu à regressão de lesões na aorta. O mecanismo potencial para explicar este efeito do CLA na atherosclerose é a habilidade em alterar o metabolismo hepático dos lipídios e lipoproteínas (Mitchell et al, 2005). De acordo com Toomey et al (2006), o CLA induz a redução da atherosclerose por regular negativamente a expressão de genes pró-inflamatórios, como o PPAR alfa e o PPAR gama, e induzir apoptose nas lesões ateroscleróticas. Porém, no presente estudo foram encontradas lesões ateroscleróticas em todos os grupos (Figura1), e as áreas lesadas não tiveram diferenças significativas numa análise inter-grupos. Controvérsias são ainda encontradas na literatura científica na relação composição lipídica da dieta e atherosclerose em diferentes espécies animais. Há evidências, em humanos e em roedores, de que dietas com grandes quantidades de ácidos graxos saturados promovem maior acúmulo de gordura quando comparadas àquelas ricas em ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados (Ellis et al, 2002).

Estudos têm sido feitos para a comprovação dos efeitos benéficos do exercício físico aeróbico na redução e prevenção de doenças coronarianas. Cal e Figueiredo (2002) prescreveram caminhadas de 30 minutos por dia em um grupo de indivíduos e verificaram uma redução no risco da ocorrência de doenças cardiovasculares em até 18%. Em um estudo feito com mulheres pedalando em um ciclo ergômetro durante 3 meses, 5 vezes por semana, durante 30 minutos a uma intensidade de 80% da freqüência cardíaca máxima, também foi verificado efeitos benéficos no sistema cardiovascular (Maeda et al, 2003). Napoli et al (2004), submeteram camundongos *knockout* para o receptor da LDL, a 60 minutos de natação, duas vezes ao dia, 5 dias por semana e, verificaram, também, que o exercício físico protege contra os efeitos do excesso de colesterol e outros fatores envolvidos no desenvolvimento da atherosclerose.

Concluiu-se que, a combinação do exercício físico e dieta hiperlipídica suplementada com CLA aumentaram as concentrações de colesterol total e LDL plasmático e o peso do fígado e, diminuíram as concentrações de HDL sérica. E, também, esta combinação, independente do tipo de dieta, não foi eficiente na redução da progressão de atherosclerose de camundongos *Knockout* para o gene que expressa a apolipoproteína E.

Referências bibliográficas

1. Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arqu Bras Cardiol 2007;88: 2-19, s1.
2. Brandão AC, Sidney PJ, Marcela AP, Alexandre MA, José MPG, Moacir FG, José ES, Dorotéia RSS. Polimorfismo genético da apolipoproteína E na doença arterial periférica. J Vasc Br 2004, Vol. 3, Nº4.
3. Shore VG, Shore B. Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. Biochemistry 1973;12:502-50.
4. Kritchevsky DST, Tepper SA, Wright S, Czarnechi SK. Influence of graded levels of conjugated linoleic acid (CLA) on experimental atherosclerosis in rabbits. Nutr Res. 2002;22:1275-9.
5. Bocca C, Bozzo F, Gabriel L, Miglietta A. Conjugated linoleic acid inhibits Caco-2 cell growth via ERK-MAPK signaling pathway. J Nutr Biochem. 2007 May;18(5):332-40.
6. Bhattacharya A, Banu J, Rahman M, Causey J, Fernandes G. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. J Nutr Biochem. 2006 Dec;17(12):789-810.
7. Whigham LD, Cook ME, Atkinson RL. Conjugated linoleic acid: implications for human health. Pharmacol Res. 2000 Dec;42(6):503-10.
8. Alasnier C, Berdeaux O, Chardigny JM, Sebedio JL. Fatty acid composition and conjugated linoleic acid content of different tissues in rats fed individual conjugated linoleic acid isomers given as triacylglycerols small star, filled. J Nutr Biochem. 2002 Jun;13(6):337-45.
9. Smedman A, Vessby B. Conjugated linoleic acid supplementation in humans--metabolic effects. Lipids. 2001 Aug;36(8):773-81.
10. Risérus U, Berglund L, Vessby B. Conjugated linoleic acid (CLA) reduced abdominal adipose tissue in obese middle-aged men with signs of the metabolic syndrome: a randomised controlled trial. Int J Obes Relat Metab Disord. 2001 Aug;25(8):1129-35.

11. Steck SE, Chalecki AM, Miller P, Conway J, Austin GL, Hardin JW. Conjugated linoleic acid supplementation for twelve weeks increases lean body mass in obese humans. *J Nutr.* 2007 May;137(5):1188-93.
12. 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. *Arterioscl Thromb Vasc Bio.* 2001 Oct;21(10):1681-8.
13. AOAC. Official methods of analysis. . AOAC – Association of Official Analytical Chemists ed. Washington, D.C. 1998.
14. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. 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. *J Nutr.* 1993 Nov;123(11):1939-51.
15. Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clinic Chem.* 1982 Oct;28(10):2077-80.
16. Warnick GR, Knopp RH, Fitzpatrick V, Branson L. Estimating low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald equation is adequate for classifying patients on the basis of nationally recommended cutpoints. *Clinic Chem.* 1990 Jan;36(1):15-9.
17. Bernardes D, Manzoni MSJ, Sousa CP, Tenório N, Dâmaso AR. Efeitos da dieta hiperlipídica e do treinamento de natação sobre o metabolismo de recuperação ao exercício em ratos. *Rev Bras Educ Fis Esp.* 2004; 18:191-200.
18. Quiles JL, Huertas JR, Ochoa JJ, Battino M, Mataix J, Manàs M. Dietary Fat (Virgin Olive Oil or Sunflower Oil) and Physical Training Interactions on Blood Lipids in the Rat. *Nutrition.* 2003; 19(4):363–68.
19. Botelho AP, Santos-Zago LF, Reis SMPM, Oliveira AC. O efeito da suplementação com ácido linoléico conjugado sobre o perfil lipídico sérico em ratos. . *Rev Bras Tecnol Agroind.* 2007;1(1):1-7.
20. Raff M, Tholstrup T, Basu S, Nonboe P, Sorensen MT, Straarup EM. A diet rich in conjugated linoleic acid and butter increases lipid peroxidation but does not affect atherosclerotic, inflammatory, or diabetic risk markers in healthy young men. *J Nutr.* 2008 Mar;138(3):509-14.
21. Shils ME, Shike M, Olson JA. Modern Nutrition In Health and Disease. 10 ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

22. Ardern CI, Katzmarzyk PT, Janssen I, Leon AS, Wilmore JH, Skinner JS, et al. Race and sex similarities in exercise-induced changes in blood lipids and fatness. *Med Sci Sports Exerc.* 2004; 36(9):1610-5.
23. Nicolosi RJ, Rogers EJ, Kritchevsky D, Scimeca JA, Huth PJ. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery.* 1997;22(5):266-77.
24. Gavino VC, Gavino G, Leblanc MJ, Tuchweber B. An isomeric mixture of conjugated linoleic acids but not pure cis-9, trans-11-octadecadienoic acid affects body weight gain and plasma lipids in hamsters. *J Nutr.* 2000 Jan;130(1):27-9.
25. Gaíva MH, Couto RC, Oyama LM, Couto GEC, Silveira VLF, Ribeiro EB, et al. Diets rich in polyunsaturated fatty acids: effect on hepatic metabolism in rats. *Nutrition.* 2003; 19(2):144-9.
26. Ellis J, Lake A, Hoover-Plow J. Monounsaturated canola oil reduces fat deposition in growing female rats fed a high or low fat diet. *Nutr Res.* 2002; 22:609-21.
27. Toomey S, Harhen B, Roche HM, Fitzgerald D, Belton O. Profound resolution of early atherosclerosis with conjugated linoleic acid. *Atherosclerosis.* 2006.
28. Mitchell PL, Langille MA, Currie DL, McLeod RS. Effect of conjugated linoleic acid isomers on lipoproteins and atherosclerosis in the Syrian Golden hamster. *Biochim Biophys Acta* 2005;1734: 269–76.
29. Cal RGR, Figueiredo LFP. Tipo e intensidade de exercício em relação a doença coronariana. *Rev Assoc Med Bras.*2002;48(4):275-96.
30. Maeda S et al. Aerobic exercise training reduces plasma endothelin-1 concentration in older women. *J Appl Physiol.* 2003;95:336–341.
31. Napoli C, Sharon WI, Filomena N, Lilach OL, Loredana R, Carmen G, Gelsomina M, Francesco T, Orlando P, Gaetano R, Vincenzo S, Louis JI. Long-term combined beneficial effects of physical training and metabolic treatment on atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *PNAS.* 2004;101:8797 – 8802.

7. CONCLUSÕES GERAIS

A dieta hiperlipídica é um fator prejudicial, pois mesmo suplementada com CLA, ela aumenta o colesterol total, LDL e eleva o ganho de peso dos camundongos *Knockout* para o gene da apoE exercitados.

O exercício físico, na intensidade e volume do presente estudo, associado a uma dieta hiperlipídica aumenta o colesterol total e o LDL sérico e, eleva o ganho de peso de camundongos *Knockout* para o gene que expressa a apoE suplementados com CLA.

A combinação do exercício físico e dieta hiperlipídica suplementada com CLA aumentaram as concentrações de colesterol total e LDL plasmático e o peso do fígado e, diminuíram as concentrações de HDL sérica. E, também, esta combinação, independente do tipo de dieta, não foi eficiente na redução da progressão de aterosclerose de camundongos *Knockout* para o gene que expressa a apolipoproteína E.