

UNIVERSIDADE VILA VELHA-ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**TRATAMENTO COM KEFIR PREVINE A LESÃO ATEROSCLERÓTICA
EM AORTAS DE CAMUNDONGOS LDLr^{-/-})**

ADRIÉLLY FIORESE SANTANNA

VILA VELHA
JUNHO/2015

UNIVERSIDADE VILA VELHA-ES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**TRATAMENTO COM KEFIR PREVINE A LESÃO ATEROSCLERÓTICA
EM AORTAS DE CAMUNDONGOS LDLr^{-/-}**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ADRIÉLLY FIORESE SANTANNA

VILA VELHA

JUNHO/2015

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

S232t Santanna, Adrielly Fiorese.

Tratamento com Kefir previne a lesão aterosclerótica em aortas de camundongos LDLr^{-/-} / Adrielly Fiorese Santanna. – 2015.
39 f.: il.

Orientador: Tadeu Uggere de Andrade.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Vila Velha, 2015.
Inclui bibliografias.

1. Stress oxidativo. 2. Agentes antiinflamatórios. 3. Probióticos. 4. Bacteriologia médica. 5. Citocinas. I. Andrade, Tadeu Uggere de. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 616.014

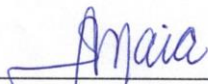
ADRIÉLLY FIORESE SANTANNA

**TRATAMENTO COM KEFIR PREVINE A LESÃO
ATEROSCLERÓTICA EM AORTAS DE CAMUNDONGOS LDLr (-/-)**

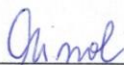
Dissertação apresentada à Universidade
Vila Velha como pré-requisito do
Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas, para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 30 de junho de 2015,

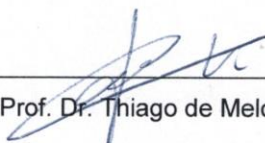
Banca examinadora:



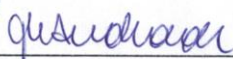
Prof.ª Dra. June Ferreira Maia - UVV



Prof.ª Dra. Nazaré Souza Bissoli - UFES



Prof. Dr. Thiago de Melo Costa Pereira - UVV



Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade - UVV
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar presente em todos os momentos da minha vida e ter me concedido a vitória de ter conseguido chegar até aqui, com muita fé e muito esforço. A minha Santinha Nossa Senhora, pela qual sou devota, confio e recebi inúmeras bênçãos desde muito pequenininha.

A minha família, que sempre me apoiou em todos os meus sonhos, em todas as dificuldades e vitórias que conquistei ao longo desta caminhada. Minha mãe, que é meu exemplo de força, luta e dignidade. Obrigada por todas às vezes que me ligou e me ouviu chorar, e com o coração apertado sempre me disse: - Você é forte, levanta essa cabeça filha! Obrigada mãe, te amo mais que tudo. Aos meus irmãos Everton e Ayrton pelo apoio, amor e ajuda de sempre, vocês são meu porto seguro. A minha cunhada Flávia e minha afilhada Pitty por me acolherem como irmã, amiga e sempre me fazerem sorrir, até mesmo nas horas mais difíceis. Ao meu pai, por ter me incentivado nos estudos quando criança e pela educação no período em que estive comigo. A todos os meus familiares, avô, avó, tios, tias e primos. Amo vocês!

Ao meu orientador, Tadeu Uggere de Andrade, pela oportunidade de vislumbrar uma carreira acadêmica, pelo apoio e por me ajudar a construir minha carreira profissional e realização de um sonho, mesmo eu sendo aquela menina tão 'doidinha' do início do mestrado. Espero que tenha orgulho do que me tornei e das responsabilidades que criei, e que não tenha se decepcionado. Muito obrigada por tudo Fofô!!

Ao meu co-orientador, Thiago de Mello Costa Pereira, por todos os momentos em que estive junto comigo no laboratório, por cada experimento, procedimento, dúvidas e esclarecimentos que me ajudaram de todas as formas a concluir esta etapa da minha vida. Você é exemplo de fé e bondade, de força de vontade e boa vontade. Muito obrigada por tudo o que fez e faz por mim, do fundo do meu coração!

Agora, vamos à parte mais feliz e legal do laboratório... Minhas companheiras de todos os dias, Placielle e Gabriela. Obrigada fofozinhas, por todos os momentos que passamos juntas no lab 29, pela ajuda nos experimentos, no biotério, ou pelo apoio

dado nos momentos de desespero e chororô. Minhas tardes no laboratório não seriam as mesmas sem vocês duas, sem nossas histórias, nossa parceria, nossos risos, sem vocês eu não teria chegado até aqui. Obrigada pela amizade que criamos, adoro vocês! Aos meus amigos do laboratório, Cacá, Renata, Ketheley, Ana Cláudia, Alegna, Paola, Fernanda, Girlandia, Ewelyne, obrigada por todo apoio e ajuda.

Ao laboratório de Fisiologia Translacional, no departamento de Ciências Fisiológicas – CCS da Universidade Federal do Espírito Santo, em especial a Doutoranda Marcella Leite Porto pela análise das minhas amostras com tanta atenção.

Ao aluno de iniciação científica, Jean Louzada, pela ajuda na análise do material nos laboratórios da UVV, pela amizade e simpatia.

A todos os professores do programa que de alguma forma colaboraram para a conclusão deste trabalho, em especial a prof. Iêda Carneiro Kalil, pela ajuda e contribuição.

A todas as pessoas que colaboraram para o término deste trabalho, todos os alunos de iniciação científica do laboratório, Bruno, Lucas, Mariele, Thaís, Avila, Mahira.

Aos Leonardo Socolott Alvarenga e Aline Garcia, pelas fotos realizadas das minhas amostras de aorta.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo – FAPES, pela bolsa de estudos e financiamento deste trabalho. A Universidade de Vila Velha – UVV por proporcionar conhecimentos e estrutura necessários para realização deste trabalho.

Aos meus amigos, por terem entendido minha ausência, e pelo apoio e amizade de cada um de vocês, em especial, minhas amigas Débora e Jéssica.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho, meu muito obrigada.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Cortes representativos de cada grupo experimental demonstrando a deposição lipídica avaliada pela coloração com Oil-Red e resultado da percentagem da área de deposição lipídica em aortas de camundongos *knockout* para receptor de LDL-C (LDLr^{-/-}) com dieta normal (DN) ou tratados com dieta hipercalórica (DH) e leite (DH Leite) ou Kefir (DH Kefir).....18
- Figura 2** Gráficos de barras mostrando os parâmetros de colesterol total, HDL colesterol (HDL-C) e colesterol não HDL-C (nHDL-C) de camundongos LDLr^{-/-} tratados com DN ou com DH, DH Leite ou DH Kefir.....19
- Figura3** Gráficos de barras mostrando a concentração de IL-6 no soro de camundongos *knockout* para receptor de LDL-C (LDLr^{-/-}) com dieta normal (DN) ou tratados com dieta hipercalórica (DH) eleite (DH Leite) ou Kefir (DH Kefir).....20
- Figura 4** Gráficos de barras mostrando a concentração de IL-10 no soro de camundongos *knockout* para receptor de LDL-C (LDLr^{-/-}) com dieta normal (DN) ou tratados com dieta hipercalórica (DH) eleite (DH Leite) ou Kefir (DH Kefir).....21
- Figura 5** Gráficos de barras mostrando a concentração de TNF-α no soro de camundongos *knockout* para receptor de LDL-C (LDLr^{-/-}) com dieta normal (DN) ou tratados com dieta hipercalórica (DH) eleite (DH Leite) ou kefir (DH Kefir).....21
- Figura 6** Gráfico de barras mostrando a relação TNF-α/IL-10, em pg/mL, no soro de camundongos *knockout* para receptor de LDL-C (LDLr^{-/-}) com dieta normal (DN) ou tratados com dieta hipercalórica (DH) eleite (DH Leite) ou kefir (DH Kefir).....22

Figura 7	Níveis de produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) no fígado de camundongos <i>knockout</i> para receptor de LDL-C (LDLr ^{-/-}) com dietanormal (DN) ou tratados com dieta hipercalórica (DH) leite (DH Leite) ou kefir (DH Kefir).....	23
Figura 8	Gráficos de barras mostrando a concentração de IL-12 no soro de camundongos <i>knockout</i> para receptor de LDL-C (LDLr ^{-/-}) com dieta normal (DN) ou tratados com dieta hipercalórica (DH) leite (DH Leite) ou kefir (DH Kefir).....	35
Figura 9	Gráficos de barras mostrando a concentração de IFN-γ no soro de camundongos <i>knockout</i> para receptor de LDL-C (LDLr ^{-/-}) com dieta normal (DN) ou tratados com dieta hipercalórica (DH) leite (DH Leite) ou kefir (DH Kefir).....	35
Figura 10	Gráficos de barras mostrando a concentração de MCP-1 no soro de camundongos <i>knockout</i> para receptor de LDL-C (LDLr ^{-/-}) com dieta normal (DN) ou tratados com dieta hipercalórica (DH) leite (DH Leite) ou kefir (DH Kefir).....	36

RESUMO

SANTANNA, Adrielly Fiorese, M.Sc., Universidade Vila Velha - ES, junho de 2015. **Tratamento com kefir previne a lesão aterosclerótica em aortas de camundongos LDLr^{-/-}**. Orientador: Tadeu Uggere de Andrade. Co-orientador: Thiago de Melo Costa Pereira.

As doenças crônicas não-transmissíveis possuem alto impacto na saúde pública, dentre as quais se destacam as doenças cardiovasculares (DCV) por serem a principal causa de morte por doença no mundo e no Brasil. Modificações no estilo de vida e dietas vem sendo propostas para prevenção e tratamento de DCV. Adicionalmente, alimentos funcionais que atenuam a progressão dessas doenças vêm sendo estudados. O kefir é um probiótico que vem sendo proposto como adjuvante no tratamento das DCV, uma vez que tem sido reportada sua potente ação antioxidante e anti-inflamatória. O presente estudo investigou os efeitos da fração solúvel do leite fermentado por grãos de kefir no desenvolvimento da aterosclerose. Foram utilizados camundongos *knockout* para receptores de LDL colesterol (LDLr^{-/-}), alimentados com dieta hipercalórica e tratados por 30 dias com a fração solúvel do Kefir ou leite por meio de gavagem. Após a eutanásia, o sangue foi recolhido por punção cardíaca para análise de citocinas e perfil lipídico, foi realizada hepatectomia total após indução da morte para análises de AOPP e extração da aorta total para quantificação de deposição lipídica por *en face*. Os resultados mostraram que no grupo kefir houve uma significativa redução da progressão da placa aterogênica em comparação com o grupo que só recebeu dieta hipercalórica (DH) (8±1 vs. 22±2 %, respectivamente. p<0,05). Não houve redução de colesterol total nos animais tratados com kefir em relação do grupo DH. Na análise de citocinas, o kefir foi capaz de reduzir os níveis da IL-6 em relação ao grupo DH (137±12 vs. 236±26 pg/mL), aumentar os níveis de IL-10 (943±101 pg/mL; p<0,05) e reduzir a razão TNF-α/IL-10 em relação aos grupos DH e DN (0,6±0,1 vs. 1,5±0,2 e 1,5±0,2 pg/mL, respectivamente). Os níveis de AOPP foram reduzidos nos animais tratados com o kefir e com leite em relação aos grupos DN e DH (140±36 e 166±19 vs. 700±56 e 724±134 μmol/L/mg de proteína, respectivamente). Portanto, pode-se considerar que o leite fermentado por grãos de kefir exerce efeito na diminuição e prevenção do desenvolvimento da placa aterogênica em camundongos LDLr^{-/-}, sem afetar os níveis de lipídios plasmáticos, através de seu efeito anti-inflamatório e antioxidante.

Palavras-chave: estresse oxidativo, anti-inflamatório, probióticos, citocinas, AOPP.

ABSTRACT

SANTANNA, Adrielly Fiorese M.Sc., Universidade Vila Velha – ES, junho de 2015.
Treatment with Kefir prevents atherosclerotic lesions in aortas of mice LDLr^{-/-}.
Orientador: Tadeu Uggere de Andrade. Co-orientador: Thiago de Melo Costa Pereira

The chronic non-communicable diseases have a high impact on public health, among which stand out cardiovascular disease (CVD) for being the leading cause of death by disease in the world and in Brazil. Changes in lifestyle and diet have been proposed for prevention and treatment of CVD. Additionally, functional foods that reduce the progression of these diseases have been studied. Kefir is a probiotic that has been proposed as an adjunct in the treatment of CVD, since it has been reported its potent antioxidant action and anti-inflammatory. The present study investigated the effects of the soluble fraction of milk fermented by kefir grains in the development of atherosclerosis. *Knockout* mice were used for receptors LDL cholesterol (LDLr^{-/-}), fed a hypercaloric diet (HD) for 30 days and treated with the soluble fraction of milk kefir or by gavage. After euthanasia, blood was collected by cardiac puncture for analysis of cytokines and lipid profile, the total hepatectomy was performed after induction of death for AOPP analysis and extraction of total aortic for quantification of lipid deposition *en face*. The results showed that in the kefir group there was a significant reduction in progression of atherogenic plaque compared with the group that only received hypercaloric diet (8 ± 1 vs $22 \pm 2\%$, respectively. $p < 0.05$). There was not reduction of total cholesterol in animals treated with kefir in relation to the HD group. In cytokines analysis, kefir was able to reduce IL-6 levels compared to the DH group (137 ± 12 vs. 236 ± 26 pg/mL), increased IL-10 (943 ± 101 pg/mL; $p < 0.05$) levels and reducing the ratio TNF- α /IL-10 in compared to HD and normal diet (ND) groups ($0,6 \pm 0,1$ vs. $1,5 \pm 0,2$ and $1,5 \pm 0,2$ pg/mL, respectively). AOPP levels were reduced in animals treated with milk and kefir in relation to ND and HD groups (140 ± 36 and 166 ± 19 vs. 700 ± 56 and 724 ± 134 $\mu\text{mol/L}$ / mg of protein, respectively). Therefore, it can be considered that the fermented milk for kefir grains have an effect on the decreasing and prevention of the development of atherogenic plaque in LDLr^{-/-} mice, without affecting plasma lipid levels, through their anti-inflammatory and antioxidant effect.

Key-words: oxidative stress, anti-inflammatory, probiotics, cytokines, AOPP.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
Introdução.....	10
Metodologia.....	13
Resultados.....	18
Discussão.....	24
Referências.....	29
Apêndice – Resultados complementares ao trabalho.....	35
Anexos – Parecer CEUA	37

INTRODUÇÃO

A aterosclerose é a patogênese fundamental da Doença Arterial Coronariana (DAC) (Skalen et al., 2002; Scott, 2004; Mizuno; Jacob; Mason., 2011; Efentakis et al., 2015) e é responsável por mais de 50% do total de todas as mortes nos países ocidentais (Libby e Theroux, 2005). Ela é considerada uma doença multifatorial, onde a inflamação e o estresse oxidativo desempenham importante papel (Efentakis et al., 2015).

O processo aterogênico inicia-se quando há níveis elevados de lipoproteína de baixa densidade (LDL) no sangue e perda da integridade endotelial, facilitando a retenção de LDL na parede arterial e sua migração para o espaço subendotelial, onde poderá sofrer oxidação por espécies reativas de oxigênio (ERO), modificando sua estrutura (Steffens e Mach, 2004) e formando as LDL oxidadas (LDLox) (Libby e Theroux, 2005).

As LDLox, por sua vez, ativam a síntese de moléculas quimiotáticas para monócitos (MCP1) e a expressão de moléculas de adesão celular como P-Selectina, E-selectina, molécula de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM), molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) e molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1) que atraem monócitos para a camada subendotelial que se diferenciam em macrófagos e fagocitam as LDLox por meio dos receptores *scavengers* formando células espumosas que liberam citocinas, quimiocinas e ERO agravando o quadro inflamatório e resultando em estria gordurosa, que é o primeiro quadro da lesão aterosclerótica (Manning-Tobin et al., 2009).

Ocorre também migração de células musculares lisas da camada média para a subendotelial, sintetizando colágeno, elastina e proteoglicanos, favorecendo o desenvolvimento de uma placa aterosclerótica madura com uma capa fibrosa (Steffens e Mach, 2004; Hansson e Libby, 2006), que separa o líquido lipídico pró-trombótico do fluxo sanguíneo luminal, chamada de ateroma (Steffens e Mach, 2004).

A ruptura dessa placa é o estágio mais grave da aterogênese, podendo levar a um quadro agudo de isquemia, infarto agudo do miocárdio ou

acidente vascular cerebral (Croce e Libby, 2007). Dessa forma, a procura por fármacos e modificações no estilo de vida e na alimentação, se torna importantíssima para a prevenção e controle da aterosclerose. Sendo assim, a utilização de alimentos que atenuam a dislipidemia, a inflamação e o estresse oxidativo, bem como a formação de placas ateroscleróticas, são de grande relevância.

Nos últimos anos, devido à necessidade de encontrar alternativas terapêuticas que possam substituir ou contribuir com as terapias convencionais, várias investigações concentraram-se sobre os efeitos dos alimentos funcionais, como os prebióticos e probióticos, e seus possíveis papéis na prevenção e tratamento de diversas doenças crônicas (Pimentel et al., 2005).

Um probiótico muito eficaz e ainda pouco conhecido no Brasil é o kefir. O kefir é uma bebida láctea fermentada semelhante ao iogurte, originária das montanhas do Cáucaso, região da antiga União Soviética. Apresenta aspecto viscoso e um leve sabor azedo e alcoólico (Farnworth, 2005; de Oliveira Leite et al., 2013; Ebner et al., 2015), e são formados por uma complexa mistura de bactérias e leveduras encapsuladas em uma matriz de polissacarídeo, as quais são responsáveis pelo aroma, sabor e textura específicos (Marquina et. al., 2002).

Dentre as várias espécies de bactérias estão os *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Acetobactere*, *Leuconostoc* e leveduras dos gêneros *Kluyveromyces*, *Cândida*, *Torula* e *Saccharomyces* (Otles; Cagindi; Akcicek, 2003; Farnworth, 2005; Jascolka et al., 2013). Tem sido reportada a presença de quantidades significativas de piridoxina, vitamina B₁₂, ácido fólico e biotina no kefir produzido a partir do leite de vaca, além de determinados aminoácidos como valina, leucina, lisina e serina (liberados durante o processo de fermentação), e quantidades elevadas do aminoácido alanina quando comparadas ao leite que não foi submetido ao processo de fermentação (Farnworth, 2005).

Diversos estudos vêm sugerindo diferentes propriedades funcionais atribuídas ao kefir, incluindo redução dos sintomas de intolerância à lactose, estimulação do sistema imune, efeito anti-hipertensivo, antimutagênico, anticarcinogênico, hipoalergênico, antimicrobiano, regulador do trato

gastrointestinal, cicatrizante, hipocolesterolêmico, antioxidante e anti-inflamatório (Liu et al., 2002; Farnworth, 2005; Lee et al., 2007; Ribic et al., 2005; Liu et al., 2006; Jасolka et al., 2013).

Recentemente, Ebner et al. (2015) isolaram vários peptídeos presentes nos grãos de kefir, como o Casecidin 17, que possui efeito multifuncional exercendo atividade antimicrobiana, inibitória da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), imunomoduladora, antioxidante e antitrombótico, e por ser um dos peptídeos mais abundantes presentes no kefir, se espera que seja de grande importância para a promoção dos efeitos antiaterogênicos do kefir.

Os camundongos sem o gene para o receptor de LDL-C, chamados de *knockout* para receptores de LDL colesterol (LDLr^{-/-}) exibem um nível plasmático ligeiramente elevado de colesterol quando mantidos com uma dieta de ração padrão, desenvolvendo lentamente o processo aterogênico. Entretanto, quando tratados com uma dieta rica em colesterol apresentam níveis elevados de colesterol plasmáticos, desenvolvendo rapidamente a aterosclerose. Os camundongos LDLr^{-/-} possuem o perfil de lipoproteína do plasma semelhante aos humanos, pelo fato de o colesterol estar confinado principalmente pela fração de LDL (Zadelaar et al., 2007) por isso se torna uma excelente opção para o presente estudo.

Portanto, considerando o destaque que a aterosclerose possui na saúde pública e que o desenvolvimento de alternativas terapêuticas seguras e de menor custo é importante para sua prevenção/tratamento, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da fração solúvel do leite fermentado por grãos de kefir no desenvolvimento da aterosclerose, particularmente sobre seu efeito antioxidante e anti-inflamatório na formação de placa aterogênica em camundongos LDLr^{-/-}.

METODOLOGIA

Animais experimentais

Foram utilizados camundongos machos LDLr^{-/-} com peso entre 21-25 g. Esses animais foram obtidos do Biotério de Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP/SP e mantidos pelo Biotério de Pesquisa da Universidade Vila Velha. Os animais foram mantidos em ambiente com iluminação artificial (ciclo claro-escuro de 12h) e temperatura de 22° C de acordo com o recomendado pelos biotérios de pesquisa. As gaiolas individuais permitiam o livre acesso dos animais à ingestão de água e ração (ração Probiotério, Moinho Primor, S.A) e ração hipercalórica (dieta aterogênica, RHOSTER LTDA) *ad libitum*.

Grupos e tratamento

Os animais foram separados nos seguintes grupos experimentais: DN= animais LDLr^{-/-} que receberam dieta normal ; DH= animais LDLr^{-/-} que receberam dieta hipercalórica (Dieta Aterogênica: Amido de milho, DL-Metionina, caseína, banha de porco, carbonato de cálcio, celulose, colesterol, premix mineral AJN-76, premix vitamínico AJN-93, sacarose, tert-butilhidroquinona, RHOSTER LTDA); DH Leite= animais LDLr^{-/-} com dieta hipercalórica e que receberam tratamento com a fração solúvel do leite (22 mL/kg) e DH Kefir= animais LDLr^{-/-} com dieta hipercalórica tratados com a fração solúvel do leite fermentado pelos grãos de kefir (22 mL/kg), sendo que cada grupo experimental foi constituído por 8 camundongos. Os animais receberam tratamento via gavagem por um período de 30 dias. Os animais dos grupos DN e DH foram submetidos ao mesmo estresse da gavagem, porém foi administrado somente água.

Preparo do kefir

O kefir (bebida teste) foi preparado no Laboratório de Técnica e Dietética da Universidade Vila Velha – UVV, a partir dos grãos de kefir

gentilmente cedidos pela professora Célia L. L. F. Ferreira da Universidade Federal de Viçosa – UFV. Os grãos de kefir foram adicionados em leite integral pasteurizado, posteriormente inoculado com 4% dos grãos de kefir e incubado à temperatura de 20-23°C, durante aproximadamente 24 horas, até a formação de um fino coágulo. Após a coagulação, os grãos foram recuperados por meio de filtração. O filtrado foi mantido sob refrigeração (aproximadamente 15°C) e, após 24 horas de incubação, o produto estava pronto para ser utilizado no experimento (Ferreira, 1995).

Separação da fração protéica solúvel do leite fermentado por grãos de kefir

A separação da fração solúvel do leite fermentado por kefir foi feita de acordo com Tsai et al. (2008), com modificações: O leite fermentado após 24h de incubação foi aquecido à 98°C durante 10 minutos, o material insolúvel foi removido por centrifugação a 9000g à 4°C por 10 minutos. Após a centrifugação retirou-se o sobrenadante que foi armazenado a uma temperatura de -80°C até o momento de uso. O referido procedimento foi repetido para o controle, leite integral pasteurizado e o pH do leite foi ajustado para 4, com acético ácido glacial.

Protocolo experimental

Ao final do período de tratamento, os animais foram eutanasiados e amostras de sangue foram retiradas por meio de punção cardíaca para análises bioquímicas, de citocinas e quimiocinas. Foi realizada hepatectomia total, após indução da morte para as análises de avaliação dos produtos proteicos de oxidação avançada (AOPP) e extração da aorta total para quantificação de deposição lipídica.

Análises bioquímicas

O sangue foi retirado por meio de punção cardíaca em tubos secos, e o soro separado e mantido a -20°C para as análises bioquímicas. Colesterol total (CT), HDL-C foram determinados usando Kits comerciais (LABTEST, Rio de Janeiro, Brasil). Colesterol não HDL-C (nHDL-C) foi calculado como a

diferença entre CT e HDL-C. O nHDL-C representa um índice único de todas as lipoproteínas aterogênicas contendo apoB: LDL (Lipoproteína de baixa densidade), VLDL (Lipoproteína de muito baixa densidade), IDL (Lipoproteína de densidade intermediária) e lipoproteína (a) (Daleprane et al., 2012).

Preparação “en face”

A aorta foi dissecada livremente desde o ponto inicial da aorta ascendente até a bifurcação ilíaca e armazenada em solução de PBS-formol 10% à 15°C. A completa retirada da camada adventícia foi cuidadosamente realizada no dia seguinte. Em seguida, o corte inicial foi realizado através da curvatura aórtica menor e estendido até a bifurcação ilíaca. O segundo corte foi feito simetricamente ao longo da curvatura maior até o nível da artéria subclávia. Durante todo o processo tomou-se o cuidado para não deslocar lesões ateroscleróticas da superfície intimal. A padronização da dissecação é importante para manter intactas as regiões com lesão conforme descrito previamente por Paigen et al. (1987) e pormenorizado por Daugherty e Rateri (2006). Após o corte, as aortas foram presas em superfície de Etil Vinil Acetato (EVA) com pinos de aço para manter sempre o tecido na sua posição plana e horizontal.

Deposição lipídica vascular

As amostras previamente submetidas à preparação *en face* foram coradas com *Oil-Red* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para visualização de acúmulos de lipídeos (coloração vermelha).

Todas as amostras foram submersas em solução alcoólica com o *Oil-Red* à 0,3% por 1 minuto e em seguida lavadas em uma cuba com água até retirar todo o excesso do corante vermelho. A análise da deposição lipídica foi realizada por meio da intensidade e extensão da coloração vermelha cujas imagens foram adquiridas usando uma câmera digital de alta resolução (Canon T5 18-55) e posteriormente digitalizadas para análise morfométrica pelo software “Image J” (domínio público –National Institute of Health, USA). Essa análise foi realizada por pesquisador cego para os grupos experimentais.

Avaliação de citocinas e quimiocinas inflamatórias

As citocinas, interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), interferon- γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-12p70 (IL-12p70) e a quimiocina proteína tipo 1 quimiotática de monócitos (MCP-1) foram simultaneamente quantificadas com o auxílio do kit comercial *Cytometric Bead Array Mouse*. Neste teste, seis microesferas (*beads*) com diferentes intensidades de fluorescência são revestidas (capturadas) com anticorpos específicos para as proteínas descritas acima. Dessa forma, em um mesmo tubo são colocados os *beads*, anticorpos de detecção conjugados à *ficoeritrina* (PE) e controles padrão ou a amostra de interesse (Menezes et al., 2012). A análise foi realizada no plasma dos animais. Brevemente, 50 μ L da suspensão de partículas de captura (*beads*) foram adicionados aos tubos e agitados e, em seguida, foram adicionados 50 μ L da amostra a ser analisada e também o reagente de detecção de PE. Os tubos foram incubados por 2 horas, à temperatura ambiente, protegidos da luz. Decorrido este tempo, em cada tubo foi adicionado 1mL de tampão para lavar o excesso do fluorocromoficoeritrina, seguido de centrifugação a 300 *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 300 μ L de tampão para ser analisado em citômetro de fluxo. Os mesmos procedimentos foram realizados para os controles. As amostras foram analisadas no FACSCanto II com auxílio dos *softwares* FACSDiva e FCAPArray (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Curvas padrão foram realizadas para cada citocina supracitada, utilizando solução do kit. A concentração de cada citocina e quimiocina foi determinada pela interpolação com a curva padrão correspondente e as concentrações foram fornecidas em pg/mL.

Avaliação dos produtos proteicos de oxidação avançada (AOPP)

As análises do conteúdo de AOPP foram realizadas de acordo com Witko-Sarsat et al. (1996). Os AOPP são criados em situações de estresse oxidativo e analisados em comparação às reações de agentes oxidantes clorinados como as cloraminas. Para tanto, foram utilizados 200mg do fígado, diluído em 1:5 de solução tampão fosfato salino (PBS) e 10 μ L de KI (1,16 M) foram adicionados em cada tubo. Logo após 20 μ L de ácido acético foram

adicionados por 2 minutos. A absorbância da reação foi imediatamente lida em 340 nm contra o branco contendo 200µL de PBS, 20µL de ácido acético e 10µL de KI. O conteúdo de AOPP foi calculado com base numa curva padrão de 0 a 100 µM realizadas com equivalentes de cloramina T. Os resultados são expressos em µmol de equivalentes de cloramina T/L/mg proteína. A quantificação de proteína foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Nessa medida, as amostras precisaram ser diluídas em 1:10.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). Para análise estatística das variáveis do experimento, as mesmas foram submetidas à análise de variância de uma via (ANOVA). A significância da diferença entre as médias foi determinada por um teste *post hoc* pelo método de *Tukey*, ajustado para múltiplas comparações, com significância aceita acima de 5% ($p < 0,05$). Para análise estatística e apresentação gráfica dos resultados foi empregado o *Prism software* (Prism6, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

Aspectos éticos

O trabalho com os animais ocorreram de acordo com as regras do guia para o cuidado e uso de animais de laboratório publicado pelo Instituto Nacional de Saúde dos EUA (NHI Publication N 85-23, revised in 1996). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UVV, Protocolo nº 338/2014).

RESULTADOS

Análise de deposição lipídica vascular

A análise morfométrica pelo software “Image J” mostra que o tratamento crônico com kefir na dose de 22 mL/kg foi capaz de reduzir a progressão de deposição lipídica nestes animais quando comparado com o grupo que só recebeu dieta hipercalórica (8 ± 1 vs. 22 ± 2 %, respectivamente; Figura 1) ou com o grupo DH Leite (25 ± 2 %). Não houve diferença entre os grupos DH Kefir e DN.

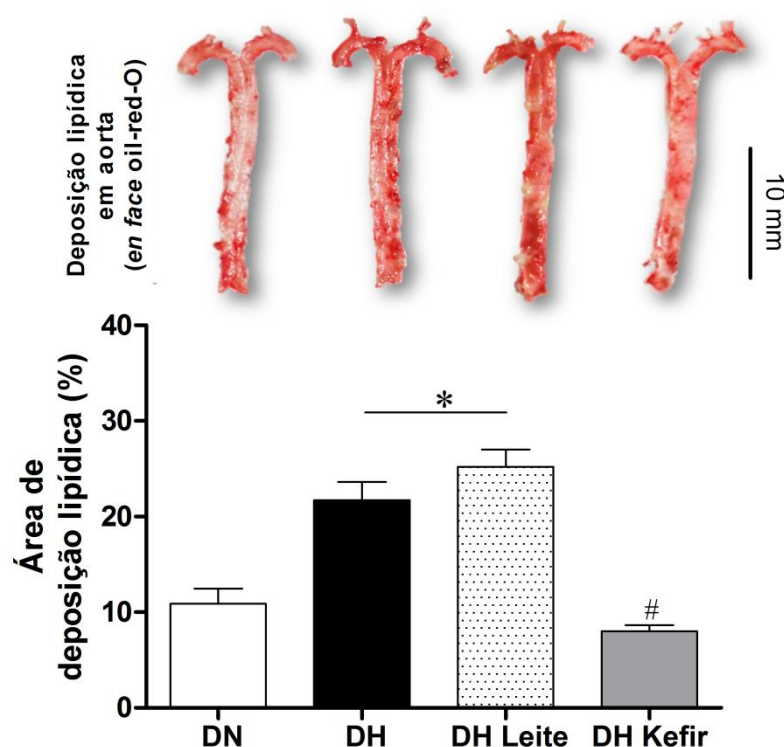


Figura 1. Análise da deposição lipídica. Painel superior: corte representativos de cada grupo experimental demonstrando a deposição lipídica avaliada pela coloração com *Oil-Red*. Painel inferior: gráficos de barras mostrando a percentagem da área de deposição lipídica em aortas de camundongos *knockout* para receptor de LDL-C (LDLr^{-/-}) com dieta normal (DN) ou tratados com dieta hipercalórica (DH) e leite (DH Leite) ou kefir (DH Kefir). Os resultados estão expressos como média ± E.P.M. * $p < 0,05$ em relação ao grupo DN e # $p < 0,05$ em relação ao grupo DH Leite.

Análises bioquímicas de Colesterol Total

A Figura 2 mostra os resultados das análises bioquímicas de colesterol total, HDL-C e nHDL-C nos animais experimentais. O tratamento com o kefir não foi capaz de reduzir os níveis de CT nos camundongos quando comparado com os que receberam somente a dieta hipercalórica (680 ± 76 vs. 671 ± 66 mg/dL, respectivamente). Curiosamente, o tratamento com leite foi capaz de reduzir a concentração sérica de HDL em comparação ao grupo DH, apresentando assim apenas uma tendência na diminuição da hipercolesterolemia (573 ± 76 mg/dL). Os níveis de nHDL-C foram maiores nos grupos com dieta hipercalórica independente do tratamento (DH = 706 ± 49 mg/dL; DH L = 515 ± 91 e DH K = 617 ± 127) em comparação com o grupo controle (120 ± 7).

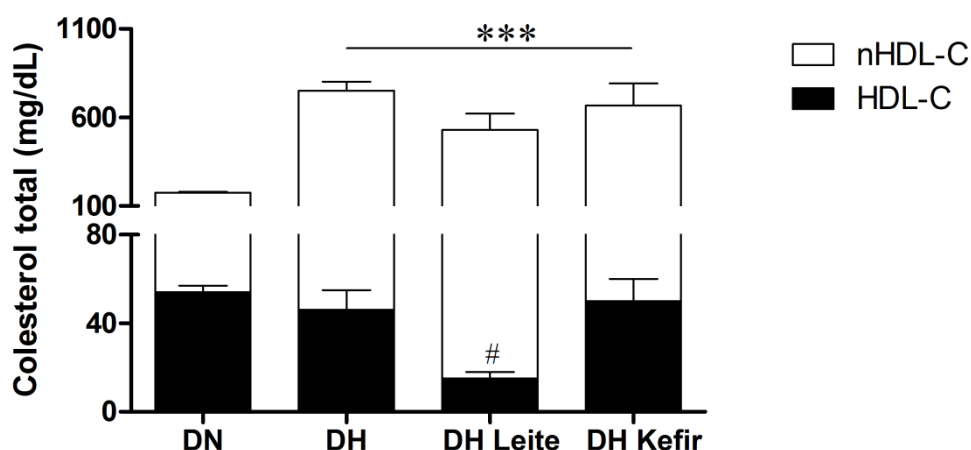


Figura 2. Análise de colesterol. Gráficos de barras mostrando os parâmetros de colesterol total, HDL colesterol (HDL-C) e colesterol não HDL-C (nHDL-C) de camundongos *knockout* para receptor de LDL-C (*LDLr^{-/-}*) com dieta normal (DN) ou tratados com dieta hipercalórica (DH) e leite (DH Leite) ou kefir (DH Kefir). Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. ***p < 0,001 em relação ao grupo DN e #p < 0,05 em relação ao grupo DH Leite.

Análises de citocinas e quimiocinas inflamatórias

A dieta hipercalórica determinou aumento da concentração de IL-6 (236 ± 26 pg/mL), o que foi prevenido pelo tratamento com kefir (137 ± 12 pg/mL; p < 0,05). Os animais do grupo DH Leite (282 ± 48 pg/mL) não tiveram seus

níveis de IL-6 alterados em relação ao grupo DH. Não houve diferença entre os grupos DN (158 ± 17 pg/mL) e DH Kefir (Figura 3).

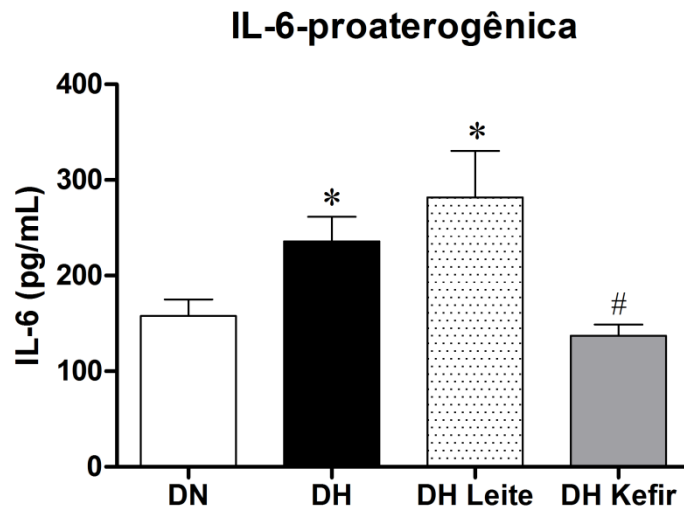


Figura 3. Concentração de IL-6. Gráficos de barras mostrando a concentração de IL-6 no soro de camundongos *knockout* para receptor de LDL-C ($LDLr^{-/-}$) com dieta normal (DN) ou tratados com dieta hipercalórica (DH) e leite (DH Leite) ou kefir (DH Kefir). Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M.* $p < 0,05$ em relação ao grupo DN e # $p < 0,05$ em relação ao grupo DH Leite.

Em relação a IL-10 o tratamento com kefir foi capaz de determinar aumento desta citocina anti-inflamatória (943 ± 101 pg/mL; $p < 0,05$) em relação aos demais grupos experimentais. Não houve diferença entre os grupos DN (471 ± 57 pg/mL), DH (533 ± 64 pg/mL) e DH Leite (540 ± 130 pg/mL) (Figura 4).

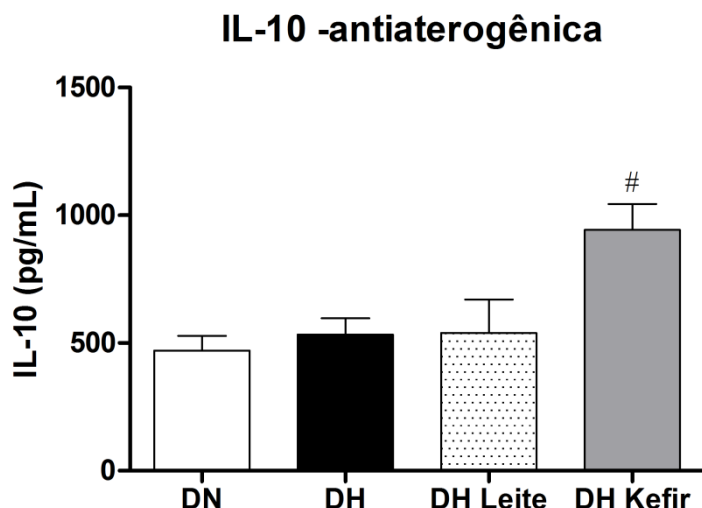


Figura 4. Concentração de IL-10. Gráficos de barras mostrando a concentração de IL-10 no soro de camundongos *knockout* para receptor de LDL-C (LDLr^{-/-}) com dieta normal (DN) ou tratados com dieta hipercalórica (DH) e leite (DH Leite) ou kefir (DH Kefir). Os resultados estão expressos como média±E.P.M. [#]p<0,05 em relação aos demais grupos experimentais.

Em relação ao TNF- α o tratamento com o Leite foi capaz de determinar uma diminuição desta citocina pró-inflamatória (343±22 pg/mL; p<0,05) em relação ao grupo DH (573±37 pg/mL; p<0,05). Não houve diferença entre os grupos DN (480±24pg/mL) e DH kefir (502±22 pg/mL) (Figura 5).

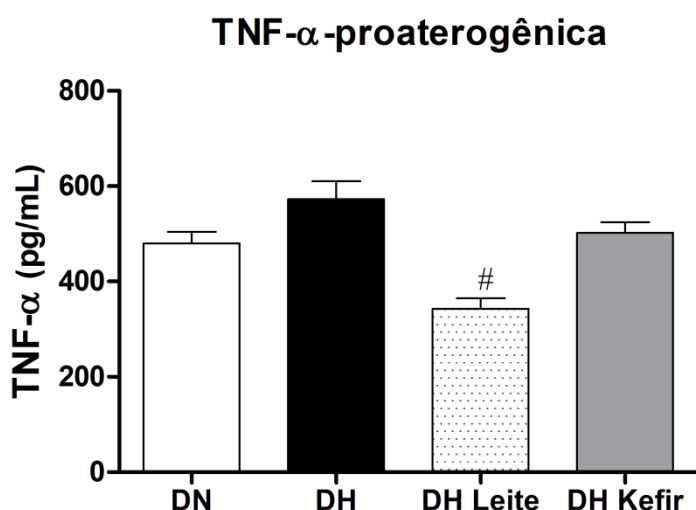


Figura 5. Concentração de TNF- α . Gráficos de barras mostrando a concentração de TNF- α no soro de camundongos *knockout* para receptor de LDL-C (LDLr^{-/-}) com dieta normal (DN) ou tratados com dieta hipercalórica (DH) e leite (DH Leite) ou kefir (DH Kefir). Os resultados estão expressos como média±E.P.M. [#]p<0,05 em relação ao grupo DH.

Não foram observadas diferenças nas concentrações de IL-12 (DN=134±6 pg/mL; DH=187±34pg/mL; DH Leite=215±57pg/mL e DH Kefir=173±29 pg/mL), de IFN-γ (DN=40±2 pg/mL; DH=46±4 pg/mL; DH Leite=38±2 pg/mL e DH Kefir=47±3 pg/mL) e de MCP-1 (DN=253±26 pg/mL; DH=259±34 pg/mL; DH Leite=289±39 pg/mL e DH Kefir=297±25 pg/mL) entre os diferentes grupos experimentais (Figuras 8, 9 e 10, respectivamente).

Razão TNF-α/IL-10

O fator de necrose tumoral (TNF-alfa) é a principal citocina pró-inflamatória encontrada na aterogênese, enquanto a interleucina-10 (IL-10) é a principal citocina anti-inflamatória presente. O tratamento crônico com kefir foi capaz de reduzir a razão TNF-α/IL-10 em relação aos grupos DN e DH (0,6±0,1 vs. 1,5±0,2 e 1,5±0,2 pg/mL, respectivamente), como mostra a Figura 6.

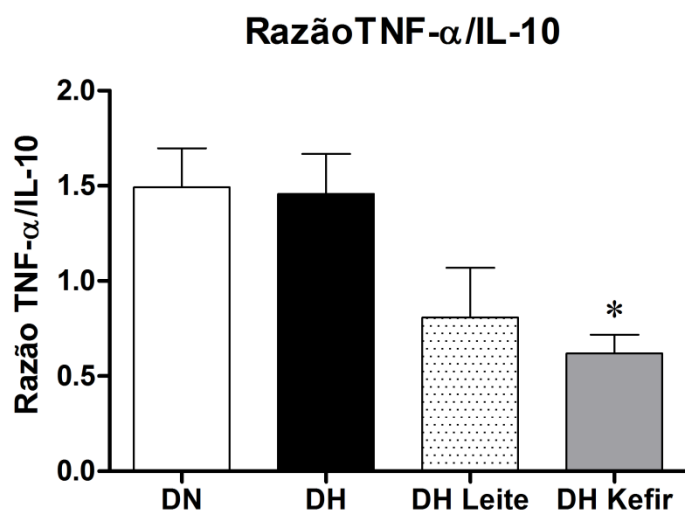


Figura 6. Razão TNF-α/IL-10. Gráfico de barras mostrando a relação TNF-α/IL-10, em pg/mL, no soro de camundongos *knockout* para receptor de LDL-C (LDLr^{-/-}) com dieta normal (DN) ou tratados com dieta hipercalórica (DH) e leite (DH Leite) ou kefir (DH Kefir). Os resultados estão expressos como média±E.P.M.*p<0,05 em relação ao grupo DN e DH.

Avaliação dos produtos proteicos de oxidação avançada (AOPP)

Como pode ser observado na Figura 7, tanto o Leite (166±19 μmol/L/mg de proteína; p<0,05) como o kefir (140±36 μmol/L/mg de proteína;

p<0,05) foram capazes de reduzir os AOPP no fígado em relação aos grupos DN (700 ± 56 μM /L/mg de proteína) e DH (724 ± 134 μM /L/mg de proteína).

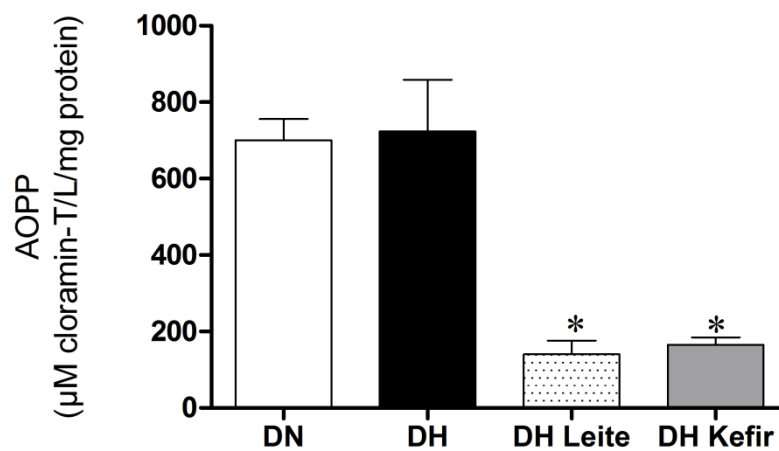


Figura 7. Quantificação de AOPP. Níveis de produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) no fígado de camundongos *knockout* para receptor de LDL-C ($\text{LDLR}^{-/-}$) com dieta normal (DN) ou tratados com dieta hipercalórica (DH) e leite (DH Leite) ou kefir (DH Kefir). Os valores estão expressos como média $\pm$ E.P.M. *p<0,05 em relação aos grupos DN e DH.

DISCUSSÃO

O principal achado do presente estudo foi a observação de que o tratamento de animais LDLr^(-/-) com fração solúvel do leite fermentado por grãos de kefir determinou redução do desenvolvimento de placa aterogênica provavelmente, por efeitos anti-inflamatório e antioxidante, demonstrado pela primeira vez, no modelo experimental de aterosclerose utilizado neste estudo.

Trabalhos que avaliaram o efeito dos compostos obtidos a partir de diferentes formas de fermentação do leite sobre a aterosclerose têm sido reportados. Nakamura et al. (2013), ao avaliarem o efeito de peptídeos derivados de leite fermentado, Val-Pro-Pro (VPP) e Ile-Pro-Pro (IPP), sobre a aterosclerose em camundongos ApoE^(-/-), verificaram que houve redução da razão entre a área da íntima e da média nas aortas (razão I/M), reduzindo a formação de placas. Considerando a solubilidade de VPP e IPP, os mesmos poderiam estar presentes na fração solúvel do kefir utilizado neste trabalho, ajudando a explicar os efeitos observados na redução da progressão da placa.

Outro importante composto bioativo obtido do kefir é o kefirano, um exopolissacarídeo produzido pelo *Lactobacillus kefiranofaciens*, o qual é isolado dos grãos do kefir (Maeda et al., 2004). Uchida et al. (2010) ao tratarem com kefirano, coelhos brancos neozelandeses, previamente alimentados com uma dieta rica em colesterol 0,5%, observaram uma redução do tamanho das lesões ateroscleróticas em comparação com os coelhos alimentados somente com a dieta hipercalórica, via efeitos anti-inflamatório e antioxidante.

Entretanto, Jascolka et al. (2013) ao avaliarem o efeito do kefir sobre a aterosclerose não observaram redução da placa aterogênica. A diferença de resultado desse estudo, para o atual, pode ser atribuída ao fato de os autores terem utilizado kefir cultivado em água com açúcar mascavo, o que pode mudar completamente o conteúdo de compostos bioativos e/ou as bactérias lácteas existentes. De fato, os autores observaram que não houve a presença predominante do *Lactobacillus kefiranofaciens*, que possui efeitos imunorreguladores e antioxidante. Adicionalmente, quando o kefir é fermentado em meio aquoso, não se espera a presença de peptídios antiaterogênicos.

Outra explicação poderia ser o modelo animal de aterosclerose diferente, onde foi usado camundongo *Knockout* para apolipoproteína E [ApoE^(-/-)]. Esses animais apresentam um perfil de desenvolvimento de dislipidemia e de placa de aterosclerose diferente dos animais LDLr^(-/-), sendo mais rápido e atingindo níveis mais elevados de colesterol (Zadelaar et al., 2007).

Uma possível explicação para a ação do kefir no presente estudo poderia ser pela redução dos níveis de colesterol plasmáticos nestes animais. Porém, não obtivemos resultado de redução dos níveis de CT nos camundongos tratados com kefir. Nakamura et al. (2013), avaliaram o efeito de peptídeos derivados do leite fermentado, Val-Pro-Pro (VPP) e Ile-Pro-Pro (IPP) sobre a aterosclerose em camundongos deficientes da apolipoproteína E [ApoE^(-/-)], e também não observaram diferença entre CT, triglicerídeos, HDL-C e glicose comparado ao grupo controle.

Porém, vários artigos citam o efeito hipocolesterolêmico dos probióticos *in vivo*. Xie et al. (2011) avaliaram o efeito de *Lactobacillus plantarum* 9-41-A e *Lactobacillus fermentum* M1-16 presentes no kefir em ratos Sprague-Dawley tratados com uma dieta hipercalórica e obtiveram significativa redução de colesterol nestes animais. Eles também avaliaram as concentrações de colesterol e ácido biliar fecal, e foi observada uma maior excreção fecal de ácidos biliares nas fezes dos ratos tratados com bactérias de ácido láctico (BAL). Em relação aos nossos resultados de CT, por não encontrarmos diferença entre os grupos, esse resultado poderia ser justificado pela ausência destes *Lactobacillus*, uma vez que no processo de obtenção da fração solúvel, o leite fermentado com Kefir é aquecido à 98° C e os mesmos não sobrevivem a essa temperatura.

Alguns trabalhos têm proposto que os diferentes resultados obtidos em estudos humanos e em animais sobre o efeito hipocolesterolêmico de BAL poderia ser devido à variação de diferentes estirpes de bactérias e lactobacilos utilizados na fermentação (Agerbaek et al., 1995), variando características clínicas dos pacientes e animais, doses e tempo de tratamento (Wang et al., 2009). Entretanto, é importante ressaltar que diversas outras hipóteses têm sido relatadas, e que o real efeito dos probióticos na hipercolesterolemia ainda não é totalmente elucidado (Lourens-Hattingh, Viljoen, 2001).

Desta forma, outros possíveis mecanismos para a redução do desenvolvimento de placa aterogênica através da fração solúvel do kefir foram investigados no presente estudo. A fração solúvel apresentou importante aumento da concentração da IL-10 (figura 4), citocina anti-inflamatória, além de redução da concentração da IL-6 (figura 3), citocina inflamatória, e da razão TNF- α /IL-10 (figura 6); o que indica que, apesar de não ter ocorrido alteração das concentrações das demais citocinas inflamatórias, houve um desvio do equilíbrio dessas citocinas para o braço anti-inflamatório. *Lactobacillus kefiranofaciens* M1 é uma das BAL predominantes em kefir e vários estudos indicaram a utilidade desta nova bactéria como um probiótico devido ao seu potencial de imunomodulação e anti-alérgico (Hong et al., 2010). Chen et al. (2012) investigaram os efeitos de *Lactobacillus kefiranofaciens* M1 nas células epiteliais do intestino *in vivo*, tratados com dextrano sulfato de sódio (DSS) que induz colite, e observaram que o *Lb. kefiranofaciens* M1 inibiu significativamente a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α induzida por DSS, e aumentou a produção da citocina anti-inflamatória e reguladora IL-10 em comparação com o grupo que só recebeu DSS. A Ação anti-inflamatória dos peptídeos presentes no kefir vem sendo comprovada em estudos recentes, onde foram identificados 236 peptídeos originados exclusivamente do leite fermentado pelos grãos de kefir, e não do leite puro, indicando que o processo de fermentação e separação da fração solúvel aumenta a atividade proteolítica e também a fração de peptídeos em relação ao leite não fermentado (Ebner et al., 2015).

TNF- α é uma citocina pró-inflamatória com atividade antitumoral, e está associada à disfunção endotelial em níveis elevados, através da produção de ERO. A lesão de células endoteliais pode ser induzida por apoptose celular ou por deficiência no relaxamento dependente do endotélio, causada em grande parte pela diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO). A enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) é a responsável pela formação de NO, e seu desacoplamento induz a diminuição da produção de NO e aumento da produção de ERO, que converte NO em peroxinitrito, levando a uma deficiência no endotélio eNOS-dependente (Beckman e Koppenol, 1996). Em contrapartida, a IL-10 que é uma citocina anti-inflamatória, desempenha um papel crucial para suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o

TNF- α . Sendo assim, a razão entre TNF- α /IL-10 é de grande importância para determinar o equilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias (Zemse et al., 2010; Goossens et al., 1995). Em um estudo *in vivo* e *in vitro*, foi observado os efeitos adversos do TNF- α no endotélio da aorta de camundongos, e foi verificado que a expressão do óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) foi reduzida pelo TNF- α , e a IL-10 foi capaz de reestabelecer essa expressão, mostrando que a IL-10 pode impedir a deficiência no vasorrelaxamento dependente do endotélio causado pelo TNF- α (Zemse et al., 2010). Portanto, parece razoável inferir que a diminuição da razão TNF- α /IL-10 (Figura 6) pode ter contribuído para uma menor disfunção endotelial e conseqüente diminuição da placa aterogênica nos animais tratados com a fração solúvel do leite fermentado pelos grãos de kefir.

Outra explicação para o resultado encontrado para o grupo kefir seria o seu efeito antioxidante. Um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a capacidade antioxidante do organismo caracteriza o estresse oxidativo (Wassmann et al., 2004). A relação entre aterosclerose e estresse oxidativo já vem sendo evidenciada em vários estudos.

A modificação de lipoproteínas no plasma resulta em oxidação destas lipoproteínas (LDLox) pelas ERO, tendo um importante papel na patogênese da aterosclerose, danificando diretamente as células endoteliais, promovendo o recrutamento de monócitos e sua transformação em macrófagos, onde são formadas as células espumosas e estrias gordurosas (Roberts e Cooper, 2001). A ação antioxidante do kefir já foi demonstrada em outros estudos. Cenesiz et al. (2008) observaram que camundongos suíços com criptas colônicas aberrantes, induzidas por azoximetano, e tratados com kefir-leite *ad libitum*, preveniu a peroxidação lipídica no fígado e no cólon desses animais quando comparados com o controle positivo que não recebeu o kefir. O mesmo potencial antioxidante foi relatado por Nagira et al. (1999), em que houve uma proteção aos danos oxidativos em células de melanoma humano submetidas à irradiação ultra-violeta (UV) tratadas com kefir-leite. De forma semelhante, no presente estudo, o grupo que recebeu apenas a fração solúvel do leite também teve redução da formação de AOPP no fígado, que pode ser explicado pela possível presença de compostos antioxidantes no leite,

como a caseína, que inibe a peroxidação lipídica e a formação de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), assim como o soro do leite também inibe a formação de TBARS e a captação de oxigênio (Chen et al., 2000). Adicionalmente, vários tipos de sais minerais, vitaminas e ácidos graxos de cadeia curta podem ser absorvidos no plasma e contribuir para o efeito antioxidante do leite (O'Brien et al., 2000).

Em resumo, o leite fermentado por grãos de kefir e seus peptídeos exercem efeito na diminuição e prevenção do desenvolvimento da placa aterogênica em camundongos $LDLr^{-/-}$, sem afetar os níveis de lipídios plasmáticos, através de seu efeito anti-inflamatório e antioxidante encontrado em nossos resultados.

REFERÊNCIAS

- Agerbaek, M., Gerdes, L.U., and Richelsen, B. **Hypocholesterolemic effect of a new fermented milk product in healthy middleaged men.** *Eur. J. Clin. Nutr.* 1995;49:346– 352.
- Beckman, J.S., Koppenol, W.H. **Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly.** *Am J Physiol.* 1996;271:1424-1437.
- Bradford, M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
- Cenesiz, S., Devrim, A.K., Kamber, U., Sozmen, M. **The effect of kefir on glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) levels in mice with colonic abnormal crypt formation (ACF) induced by azoxymethane (AOM).** *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 2008;115:15-19.
- Chen, J., Lindmark-Månsson, H., Åkesson, B. **Optimisation of a coupled enzymatic assay of glutathione peroxidase activity in bovine milk and whey.** *International Dairy Journal.* 2000;10:347–351.
- Chen, Y.P., Hsiao, P.J., Hong, W.S., Dai, T.Y., Chen, M.J. ***Lactobacillus kefiranofaciens* M1 isolated from milk kefir grains ameliorates experimental colitis *in vitro* and *in vivo*.** *J Dairy Sci.* 2012;95:63-74.
- Croce, K., Libby, P. **Intertwining of thrombosis and inflammation in atherosclerosis.** *Curr Opin Hematol.* 2007;14:55-61.
- Daleprane, J.B., FreitasVda, S., Pacheco, A., Rudnicki, M., Faine, L.A., Dörr, F.A., Ikegaki, M., Salazar, L.A., Ong, T.P., Abdalla, D.S. **Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis.** *J Nutr Biochem.* 2012;23:557-566.
- Daugherty, A., Rateri, D. **A Handbook of Mouse Models of Cardiovascular Disease.** 2006;5:53-66.

de Oliveira Leite, A.M., Miguel, M.A., Peixoto, R.S., Rosado, A.S., Silva, J.T., Paschoalin, V.M. **Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage.** *Braz J Microbiol.* 2013;44:341-349.

Ebner, J., Aşçı-Arslan, A., Fedorova, M., Hoffmann, R., Küçükçetin, A., Pischetsrieder, M. **Peptide profiling of bovine kefir reveals 236 unique peptides released from caseins during its production by starter culture or kefir grains.** *J Proteomics.* 2015;117:41-57.

Efentakis, P., Iliodromitis, E.K., Mikros, E., Papachristodoulou, A., Dagres, N., Skaltsounis, A.L., Andreadou, I. **Effects of the Olive Tree Leaf Constituents on Myocardial Oxidative Damage and Atherosclerosis.** *Planta Med.* 2015; 81:648-654.

Farnworth, E.R. **Kefir – a complex probiotic.** *J Food Sci Technol.* 2005;2:1-17.

Ferreira, C.L.L.F., Rodrigues, W.S. **Processamento Artesanal do logurte e Quefir.** InformeTécnico. Minas Gerais: UFV, 1995;1-10.

Goossens, V., Grooten, J., De Vos K., Fiers, W. **Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:8115-8119.

Hansson, G.K., Libby, P. **The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword.** *Nat Rev Immunol.* 2006;6:508-19.

Hong, W.S., Chen, Y.P., Chen, M.J. **The antiallergic effect of kefir Lactobacilli.** *J. Food Sci.* 2010;75:244–253.

Jascolka, T.L., Aguilar, E.C., Teixeira, L.G., Lages, P.C., de Cássia Raimundo, I., Beltrão, N.R.M., Matoso, R.O., Carneiro, R.P., Nicoli, J.R., Alvarez-Leite, I. **Kefir supplementation improves lipid profile and oxidative stress but does not reduce atherosclerotic lesion in apoE deficient Mice.** *J Food Nutr Disor.* 2013;2:1-7.

Lee, M.Y., Ahn, K.S., Kwon, O.K., Kim, M.J., Kim, M.K., Lee, I.Y., Oh, S.R., Lee, H.K. **Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in a mouse asthma model.** *Immunobiology*. 2007; 212:647-654.

Libby, P., Theroux, P. **Pathophysiology of coronary artery disease.** *Circulation*. 2005;111:3481-3488.

Liu, J.R., Wang, S.Y., Chen, M.J., Chen, H.L., Yueh, P.Y., Lin, C.W. **Hypocholesterolaemic effects of milk-kefir and soymilk-kefir in cholesterol-fed hamsters.** *Br J Nutr*. 2006; 95:939-946.

Liu, J.R., Wang, S.Y., Lin, Y.Y., Lin, C.W. **Antitumor activity of milk kefir and soymilk-kefir in tumor-bearing mice.** *Nutr Cancer*. 2002;44:183-187.

Lourens-Hattingh, A.; Viljoen, B.C. **Yogurt as probiotic carrier food.** *Int. Dairy J*. 2001;11:1-17.

Maeda, H., Zhu, X., Mitsuoka, T. **New medium for the pro-duction of exopolysaccharide (OSKC) by *Lactobacillus kefiranofaciens*.** *Bioscience Microflora*. 2004;22:45-50.

Manning-Tobin, J.J.; Moore, K.J.; Seimon, T.A.; Bell, S.A.; Sharuk, Alvarez-Leite, J.I.; Winther, M.P.J. de; Tabas, I. Freeman, M.W. **Loss of SR-A and CD36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:19-26.

Marquina, D., Santos, A., Corpas, I., Muñoz, J., Zazo, J., Peinado, J.M. **Dietary influence of kefir on microbial activities in the mouse bowel.** *Lett Appl Microbiol*. 2002;35:136-140.

Menezes, T.N., Carnielli, J.B., Gomes, H.L., Pereira, F.E., Lemos, E.M., Bissoli, N.S., Lopes-Ferreira, M., Andrich, F., Figueiredo, S.G. **Local inflammatory response induced by scorpionfish *Scorpaena plumieri* venom in mice.** *Toxicon*. 2012;60:4-11.

Mizuno, Y., Jacob, R.F., Mason, R.P. **Inflammation and the development of atherosclerosis.** *J Atheroscler Thromb.* 2011;18:351-358.

Nagira, T.; Narisawa, J.; Teruya, K.; Kusumoto, K.; Katakura, Y.; W.Barnes, T.; Tokumaru, S.; Shirahata, S. **Supression of Apoptosis in UVDamaged Human Melanoma Cells by a Fermented Milk, Kefir.** *Netherlands: Kluwer Academic Publishers.* 1999; 40:437-439.

Nakamura, T., Hirota, T., Mizushima, K., Ohki, K., Naito, Y., Yamamoto, N., Yoshikawa, T. **Milk-derived peptides, Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro, attenuate atherosclerosis development in apolipoprotein e-deficient mice: a preliminary study.** *J Med Food.* 2013;16:396-403.

O'Brien R, C., Luo, M., Balazs, N., Mercuri, J. **In vitro and in vivo antioxidant properties of gliclazide.** *J Diabetes Complications.* 2000;14:201-6.

Otles, S., Cagindi, O., Akcicek, E. **Probiotics and health.** *Asian Pac J Cancer Prev.* 2003;4:369-372.

Paigen, B., Morrow, A., Holmes, P.A., Mitchell, D., Williams, R.A. **Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice.** *Atherosclerosis.* 1987;68:231-240.

Pimentel, C.V.M.B., Francki, V.M., Gollucke, A.P.B. **Alimentos Funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos.** São Paulo: Varela. 2005;13-19.

Ribic, C.H., Cerar, A., Pokom, D., Perse, M., Zebic, A. **Effects of kefir containing various levels of fat on chemically induced colorectal epithelial tumors in wistar rats.** *Nutrition Research.* 2005;25:53-63.

Roberts, J.M., Cooper, D.W. **Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia.** *Lancet.* 2001;357:53-56.

Scott, J. **Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease.** *Curr OpinGenet Dev.* 2004;14:271-279.

Skålen, K., Gustafsson, M., Rydberg, E.K., Hultén, L.M., Wiklund, O., Innerarity, T.L., Borén, J. **Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis.** *Nature*. 2002;417:750-754.

Steffens, S., Mach, F. **Inflammation and atherosclerosis.** *Herz*. 2004;29:741-748.

Tsai, J.; Chen, T.; Pan, B. S.; Gong, S.; Chung, M. **Antihypertensive effect of bioactive peptides produced by protease-facilitated lactic acid fermentation of milk.** *Food Chemistry*. 2008;106:552-558.

Uchida, M., Ishii, I., Inoue, C., Akisato, Y., Watanabe, K., Hosoyama, S., Toida, T., Ariyoshi, N., Kitada, M. **Kefiran reduces atherosclerosis in rabbits fed a high cholesterol diet.** *J Atheroscler Thromb*. 2010;17:980-988.

Wang, Y., Xu, N., Xi, A., Ahmed, Z., Zhang, B. **Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet.** *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009;84:341-347.

Wassmann, S.; Wassmann, K.; Nickenig, G. **Modulation of Oxidant and Antioxidant Enzyme Expression and Function in Vascular Cells Modulation.** *Hypertension*. 2004;44:381-386.

Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoam T., Nguyen, A.T., Zingraff, J., Jungers, P., Descamps-Latscha, B. **Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia.** *Kidney Int*. 1996;49:1304-1313.

Xie, N., Cui, Y., Yin, Y.N., Zhao, X., Yang, J.W., Wang, Z.G., Fu, N., Tang, Y., Wang, X.H., Liu, X.W., Wang, C.L., Lu, F.G. **Effects of two *Lactobacillus* strains on lipid metabolism and intestinal microflora in rats fed a high-cholesterol diet.** *BMC Complement Altern Med*. 2011; 11-53.

Zadelaar, S., Kleemann, R., Verschuren, L., de Vries-Van der Weij, J., van der Hoorn, J., Princen, H.M., Kooistra, T. **Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1706-1721.

Zemse, S.M., Chiao, C.W., Hilgers, R.H., Webb, R.C. **Interleukin-10 inhibits the in vivo and in vitro adverse effects of TNF-alpha on the endothelium of murine aorta.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;299:H1160-1167.

Zheng, Y., Lu, Y., Wang, J., Yang, L., Pan, C., Huang, Y. **Probiotic properties of Lactobacillus strains isolated from Tibetan kefir grains.** *PLoS One.* 2013;8:e69868.

APÊNDICE

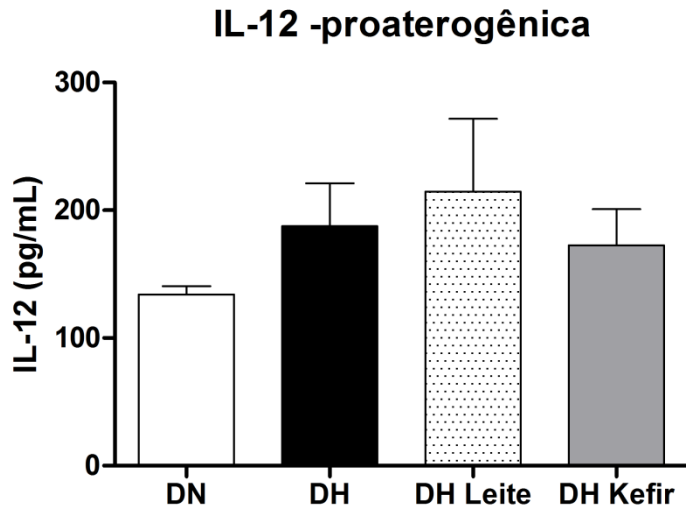


Figura 8: Concentração de IL-12. Gráficos de barras mostrando a concentração de IL-12 no soro de camundongos *knockout* para receptor de LDL-C (*LDLr^{-/-}*) com dieta normal (DN) ou tratados com dieta hipercalórica (DH) eleite (DH Leite) ou kefir (DH Kefir). Os resultados estão expressos como média±E.P.M.

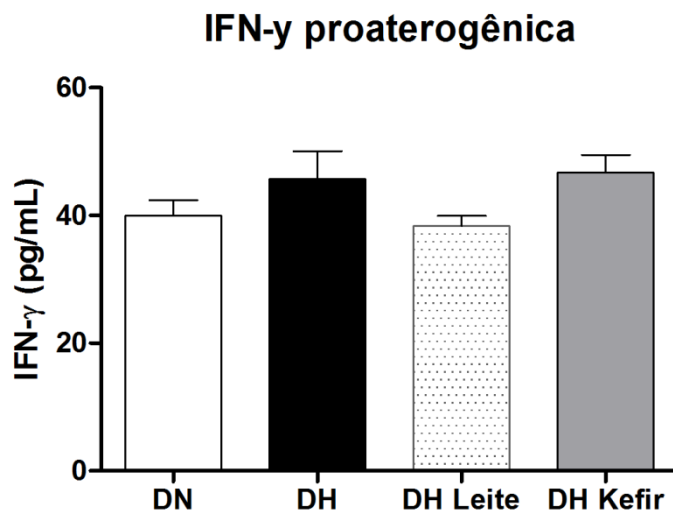


Figura 9: Concentração de IFN- γ . Gráficos de barras mostrando a concentração de IFN- γ no soro de camundongos *knockout* para receptor de LDL-C (*LDLr^{-/-}*) com dieta normal (DN) ou tratados com dieta hipercalórica (DH) eleite (DH Leite) ou kefir (DH Kefir). Os resultados estão expressos como média±E.P.M.

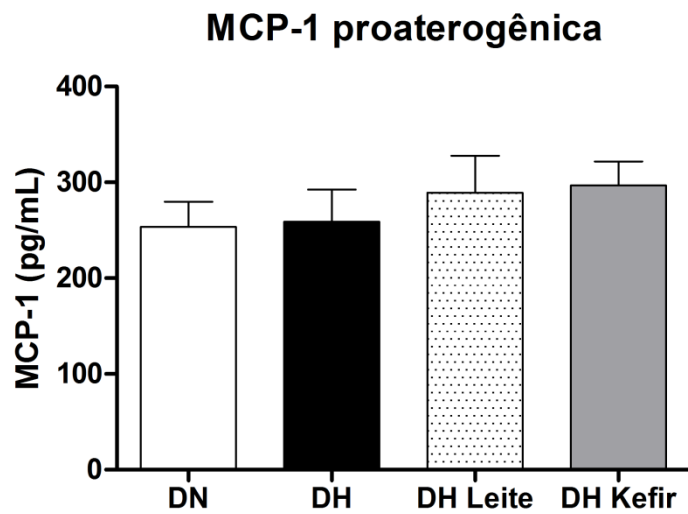


Figura 10: Concentração de MCP-1. Gráficos de barras mostrando a concentração de MCP-1 no soro de camundongos *knockout* para receptor de LDL-C (LDLr^{-/-}) com dieta normal (DN) ou tratados com dieta hipercalórica (DH) eleite (DH Leite) ou kefir (DH Kefir). Os resultados estão expressos como média±E.P.M.

ANEXOS



Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UVV)

PARECER DO RELATOR

Parecer Nº. 338/2014

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade**

Tipo de Pesquisa: Pesquisa.

Instituição onde será desenvolvido: Universidade Vila Velha

Situação: **APROVADO**

Ao analisar o projeto de pesquisa: “**Avaliação de efeitos de hormônios e nutracêuticos em camundongos dislipidêmicos**”, tendo como pesquisador(a) responsável **Dr. Tadeu Uggere de Andrade**, considero que o projeto se encontra adequado e satisfatoriamente de acordo com as exigências das Resoluções que regem essa Comissão.

Assim, mediante a importância social e científica que o projeto apresenta, a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, sou de parecer favorável à realização do projeto classificando-o como **APROVADO**, pois o mesmo atende aos Requisitos Fundamentais da Normas de Conduta para a Utilização de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão na Universidade Vila Velha.

Vila Velha , 01 de julho de 2015.

Prof. João Luiz Rossi Junior
Relator da CEUA-UVV.

Universidade Vila Velha
Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, Vila Velha-ES, CEP.: 29102-770
E-mail barbara.loureiro@uvv.br

ADM-14

