MILESSA DA SILVA AFONSO

**Efeito das gorduras interesterificadas sobre o desenvolvimento
da lesão aterosclerótica em camundongos *knockout* para o
receptor de LDL**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do Título de Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Dra. Ana Maria Pita Lottenberg

**São Paulo
2016**

MILESSA DA SILVA AFONSO

**Efeito das gorduras interesterificadas sobre o desenvolvimento
da lesão aterosclerótica em camundongos *knockout* para o
receptor de LDL**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do Título de Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Dra. Ana Maria Pita Lottenberg

**São Paulo
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Afonso, Milessa da Silva

Efeito das gorduras interesterificadas sobre o desenvolvimento da lesão
aterosclerótica em camundongos *knockout* para o receptor de LDL / Milessa da Silva
Afonso. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Ana Maria Pita Lottenberg.

Descritores: 1.Dieta hiperlipídica 2.Ácidos graxos 3.Colesterol 4.Aterosclerose
5.Inflamação 6.Lipoproteínas 7.Camundongos knockout

USP/FM/DBD-055/16

Este estudo foi realizado no Laboratório de Lípidos (LIM 10) do Departamento de Clínica Médica, Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O projeto foi desenvolvido com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Bolsa de Doutorado 2011/50443-0, Bolsa de Estágio Pesquisa no Exterior 2015/03523-0 e Auxílio Pesquisa 2012/50249-2.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Antonio Benedito Afonso e Maria Luiza da Silva Afonso. Ah, se todos tivessem a doçura, sabedoria e amor que vocês têm... Obrigada por nunca medirem esforços para que eu conseguisse alcançar meus objetivos e por me apoiarem incondicionalmente durante toda essa trajetória incrível! Amo vocês demais e infinito!!!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por sempre abençoar meu caminho, minhas escolhas, minha vida e colocar em meu caminho tantas pessoas especiais, que fazem dos meus dias plenos, mágicos e inesquecíveis.

À minha família, especialmente meus pais Antônio e Maria Luiza, minhas irmãs Jacira e Melissa, minhas sobrinhas Cecília e Raissa, meus cunhados Junior e Macota, minha madrinha Benedita e minha doce avó Aparecida Affonso (*in memoriam*) pelo amor incondicional e pela força que me ajuda a seguir o caminho. Obrigada por todo apoio mesmo sem compreenderem porque amo tanto ficar dentro de um laboratório!

À minha doce e amada orientadora Dra Ana Maria Lottenberg... Eu queria ter palavras, mas parece que engasgo até na escrita... Mãe, amiga, mestre... Com você descobri e desenvolvi minha completa paixão pela pesquisa, conheci lugares que nunca imaginei visitar em minha vida e fui, acima de tudo, valorizada. Você é, com certeza, uma das pessoas mais extraordinárias que conheci na vida, incansável na luta pela verdade e justiça, você me ensinou o mais belo da ciência: fazê-la com amor e pensando no benefício que ela trará aos seres humanos. Agradeço a Deus o rumo que minha vida tomou naquele Congresso onde assisti sua palestra e pensei “tem que ser ela”, à persistência que desde pequena me persegue e ao destino que parece ter nos unido há muito tempo. Sou sortuda por aprender e trabalhar com a senhora e por tê-la ao meu lado! O que construímos é forte demais e será para a vida toda, tenho certeza! Muito obrigada por ter me aceitado como aluna, mas acima de tudo como amiga, filha, confidente. Eu te amo!

Ao Dr Eder, por ser um exemplo de pesquisador competente e honesto, compartilha conosco não apenas os conhecimentos científicos, mas também cultura geral, e sempre nos impulsionou a buscar a ciência verdadeira, aquela que é bonita de se ver e sentir. Muito obrigada por nos honrar com suas discussões sempre entusiasmadas, com um brilho no olhar... um brilho que mostra o quanto a paixão pela ciência contagia e é crônica!

À Dra Edna Regina Nakandakare, por ter me recebido com tanto carinho e por ter me ensinado tanto ao longo desses anos. Sempre com um sorriso doce no rosto, nunca mediu esforços para nos ajudar e para esclarecer nossas dúvidas.

À Dra Marisa Passarelli, pelos ensinamentos e conselhos científicos. Seu conhecimento é admirável e agradeço muito por dividí-lo conosco em cada discussão.

À Dra Mônica e ao Dr Isio, pelas discussões nas reuniões científicas as quais sempre contribuíram para ampliar nossos conhecimentos e nossos horizontes.

À Dra Patricia Cazita por ser uma pesquisadora incrível, com tantas ideias geniais que sempre despertaram minha atenção e admiração! Muito obrigada pelos conselhos, risadas e amizade.

Ao Dr Sergio Catanozi, o cara de coração nobre, que trabalha de forma incansável e que nunca mediu esforços para nos ajudar! Muito obrigada por todo apoio, pelos conselhos e ensinamentos. Ah, agradeço também pela sua colaboração essencial na cirurgia dos besouros gigantes da Amazônia!!!

Ao Dr Simão Augusto Lottenberg, homem nobre, gentil, alegre, humilde e excepcional pesquisador, obrigada pela oportunidade de aprender com o senhor tanto na Liga de Diabetes quanto no dia-a-dia. Jamais esquecerei a linda lição que o senhor nos dava diariamente ao atender seus pacientes. Impossível apagar da memória também a torcida e a alegria do senhor ao ver Maria Sílvia e eu apresentando nossos resultados no Intramuros. Muito obrigada pelos ensinamentos, conselhos e amizade!

À Dra Valeria Sutti Nunes, por ser uma mãezona para mim, sempre comemorou minhas conquistas e torceu por mim! Muito obrigada por compartilhar seu amplo conhecimento comigo, pelas discussões regadas com cafezinho, amor e sabedoria!

À Adriana Machado Saldiba de Lima, pelo incansável apoio em todos os momentos! Pelos conselhos e ensinamentos, sorrisos e sofrimentos... Por ser essa pessoa excepcional que nos transmite paz, alegria e amor.

À Bruna Almeida, nossa querida Nutri Jr, que em tão pouco tempo se tornou essencial em minha vida! Jamais me esquecerei dos nossos dias na Liga de Diabetes, Casa Jaya, violão e cantoria, piqueniques. Com sua personalidade questionadora cresci muito!!

À Claudia, por ser essa mulher incrível, batalhadora e que não mede esforços para nos ajudar no que for preciso. Muito obrigada pela paciência, pelas conversas, conselhos e sorrisos.

Ao Diego Gomes, pelos momentos de descontração regados a músicas e danças. Obrigada por ser esse cara brilhante, inteligente e que contagia a todos com sua alegria! Jamais esquecerei seus conselhos e discussões que sempre contribuíram para meu enriquecimento!

À Fabiana Ferreira, companheira e guerreira, muito obrigada por sempre me ajudar, por acreditar em mim e sempre apoiar minhas ideias! Seu otimismo e garra sempre me impulsionaram a continuar

À Fernanda Fusco, por me mostrar um mundo muito mais tranquilo e amoroso. Sua paz sempre trouxe equilíbrio ao nosso ambiente de trabalho!

À Gabriela Castilho, por ser uma pessoa excepcional e por me ensinar tanto! Muito obrigada pelas discussões que sempre foram muito enriquecedoras para mim, pelos momentos de alegria e descontração... Sua “fantasia” de pijama que o diga!

Às inseparáveis, Giovana Brito e Marina Demasi, muito obrigada por trazerem novo fôlego para nós! Precisamos de sangue novo, com desejo pelo conhecimento. Tenho certeza que vocês serão excelentes profissionais porque fazem as coisas com amor e dedicação!

Ao Guilherme Ferreira, por sempre estar disposto a discutir, aprender e ensinar. Não tenho dúvida de que seu futuro também será brilhante.

À Juliana Tironi, querida e divertida, sempre fez sua pesquisa com dedicação, amor e cuidado. Muito obrigada pelas discussões, pelos conselhos e por uma amizade que tenho certeza será eterna!

À Jussara, que com seu jeitinho meigo sempre procurou nos apoiar e nos ensinar as metodologias da forma mais precisa possível.

À Karol Santana, que muito além de amiga, tornou-se uma irmã que São Paulo me deu. Obrigada por me ensinar tanto, por me apoiar em todos os momentos, por me escutar e me dar conselhos, por sempre estar presente não importando o horário, local ou em qual circunstância. Você é demais! Jamais esquecerei as discussões científicas que faziam nossos olhos brilharem, dos nossos sonhos, alegrias e viagens compartilhadas.

À Kelly Gomes, por ser incansável no aprendizado e ao mesmo tempo por ter paciência de nos ensinar e ajudar!

À Ligia Okuda, por ser tão querida, competente e tranquila. Você sempre tem uma palavra amiga, um sorriso no rosto, um conselho... Conviver com você é mais que especial, você inspira porque ama o que faz, é dedicada, inteligente, brilhante! Sucesso!

À Lis Mie, por ser esse doce de pessoa, sempre disposta a aprender e a ensinar. Dedicada, estudiosa e frequentemente com um sorriso no rosto, você vai longe! Obrigada por ser nosso raio de sol, feliz, tranquila e radiante!

À Maria Silvia Ferrari Lavrador, obrigada por ter me acompanhado nessa trajetória, para que juntas pudéssemos ter construído um trabalho do qual nos orgulhamos! Obrigada por ter me ensinado tanto ao longo desses anos! Acima de tudo, agradeço a Deus e a Profa Ana Maria por terem colocado alguém tão especial em minha vida, porque ganhei uma amiga indispensável tanto nos momentos de desespero quanto de alegria. Tão juntas ficamos que senti, mesmo de longe, que uma “flor” cresceria em seu jardim. E eu quero estar sempre perto, sempre presente para ver essa linda flor brilhar! Muito obrigada por tudo!

À Paula Ramos, exemplo de dedicação e amor ao que faz, agradeço pelas discussões de metodologias, pelos questionamentos, pela amizade, pelo abraço apertado em momentos de alegria e tristeza e pelas conversas sinceras!

À Renata Bombo, pelas conversas e conselhos, pelos momentos de descontração, pelas viagens sempre alegres e memoráveis.

À Roberta Marcondes Machado, por ser uma pesquisadora brilhante, por ter me ensinado tantas coisas, pelas risadas pelas nossas discussões científicas que sempre rendem ideias para diversos projetos e nos tiram do chão! Obrigada pelo brilho nos olhos cada vez que discutimos sobre ciência!!!

Ao Rodrigo Tallada Iborra, por nos ensinar sempre com maestria, otimismo e paciência. Muito obrigada, meu querido amigo, por sempre estar disposto a nos ajudar, pelas conversas, conselhos, músicas, risadas e bombons ouro branco!!!

À Rosibel, por ser uma pessoa essencial no nosso dia-a-dia, sempre nos alegrando e nos trazendo um cafezinho para ativar nossos neurônios. Valeu Rosi!

À Talita Pessoa, que com seu jeitinho meigo conquistou a todos! Dedicada e estudiosa, sei que a nutrição baseada em ciência vai ganhar muito com você! Muito obrigada por suas discussões, questionamentos e ensinamentos!!

À Tatiana Venâncio, amiga de todos os momentos, obrigada por tantos conselhos, por muitas vezes me mostrar que a amizade verdadeira é aquela onde até levamos broncas, mas sabemos que é para o nosso bem... Sua opinião firme e sua personalidade doce me ensinaram demais! Agradeço por nossas discussões científicas, sociais e políticas, nossos momentos de alegria e de tristeza, de festa e de fofoca, de violão e de prosa, de cerveja e de vinho.

Aos novos companheiros, Aécio Lira, Ana Paula Lembo, Carlos Minanni, Vanessa del Bianco, Elda Dantas e Sari, certeza que será só sucesso! A ciência precisa de sangue novo, de pessoas cheias de vontade e vocês, com certeza, vão arrasar!!!

Aos antigos companheiros, Camila Canteiro Leança, Eliton Silva, Mariana Alcântara, Maria Olivia Carvalho, Raphael de Souza Pinto e Simoninha Batista, por me ensinarem tanto e por me mostrarem o quanto o bem estar no laboratório parte, muitas vezes, de um simples sorriso.

Ao Prof. Dr Chin Jia Lin e Natália Gonçalves, por me ensinarem com tanta destreza e me darem excelente suporte para que eu fizesse com segurança os experimentos envolvendo Biologia Molecular. Muito obrigada também pela amizade e confiança.

Ao Prof. Dr Dennys Esper Cintra, não apenas por ser um exemplo de pesquisador para mim e tantos outros que buscam fazer ciência, mas também por ter se tornado um mestre-amigo, que me inspira e me deixa entusiasmada cada vez que nos encontramos. É lindo ver um cientista com tanto brilho no olhar e que chega a perder o ar, literalmente, na ânsia de discutir ciência com seus pupilos. Obrigada por me permitir dividir com o senhor opiniões científicas, políticas e sociais. Agradeço de coração por compartilhar seu conhecimento admirável e por acreditar e torcer por mim.

À Profa Dra Kathryn Moore e todo o pessoal do Laboratório de Biologia Vascular da Universidade de Nova Iorque: Bhama Ramkhelawon, Coen Van Solingen, Graeme Koelwyn, Kaitlyn Rinehold, Mireille Ouimet, Scott Oldebeken, Sue Babunovic e Westley Spiro, por me darem a oportunidade de aprender ainda mais, por terem paciência comigo e por me darem de presente amizade para a vida inteira. Agradeço especialmente à Kathryn, por ter me recebido de forma tão carinhosa e compartilhado seus conhecimentos comigo.

À Profa Dra Léa Sílvia Santana, minha primeira orientadora e excepcional pesquisadora, muito obrigada por ser a primeira pessoa que enxergou em mim o brilho da ciência, por me ensinar a ter persistência e incentivar meu lado curioso. Agradeço também ao Prof Dr Jorge Mancini-Filho, grande pesquisador, por contribuir com a minha formação acadêmica.

Ao Prof Dr Leonardo Torres, pesquisador excepcional e um amigo-irmão que a vida me deu de presente! Obrigada por me ensinar todos os dias a lutar por aquilo que acredito, a respirar ciência!! Nossas discussões sempre empolgadas me ensinaram muito e agradeço infinitamente não apenas por isso, mas também por sempre estar ao meu lado!

À Profa Dra Marcia Koike, por ser mais que uma pesquisadora de conhecimento invejável, uma amiga, conselheira, companheira! Agradeço à Deus por ter colocado você em meu caminho, porque muito da confiança e aprendizado nessa trajetória devo a você!

À Profa Dra Elia Caldini e Dra Nilsa Damaceno-Rodrigues (LIM59) e Prof Dr Luiz Antonio Gioielli (FCF-USP) pela colaboração e suporte experimental.

À Natasha França e Gabriela Fullin, mulheres queridas que Deus colocou no meu caminho para viverem comigo como irmãs! Muito obrigada por serem tão especiais, pacientes e por sempre me apoiarem! Vocês são demais!

Ao Daniel Pagotto, Gabriel Ramirez, Nanda Maria e Ruy de Deus, Tunico e Tânia, Ramon e Valtinho por serem tão especiais e por me proporcionarem tantos momentos de alegria, risadas e descontração. Não seria a mesma sem nossas idas ao PubMed, nossos churrascos, cantorias, cervejadas e caipiradas e, óbvio, sem o café da D. Dulce! Hahahaha.

Aos queridos Ada Weinstock e Felix, Pauline Guiffart e Alex e Raquel Lopez Diez, por terem se tornado minha família e me darem tanto amor e atenção durante o estágio no exterior. Mais uma vez, confirmo a sorte que tenho em só encontrar pessoas maravilhosas na minha vida!

Ao Alexandre Moura, por aparecer no meio dessa caminhada e ter se tornado um amigo tão especial, por ser um cara que luta por seus ideais e por me inspirar e ensinar tanto! Desde o primeiro dia em que nos conhecemos na UNICAMP, tivemos a certeza que faríamos parte do mesmo time, porque pensamos da mesma forma e somos preparados por mestres sensacionais. Vamos em frente, meu amigo! A ciência nos espera!!

Aos cientistas brilhantes e amigos queridos Bruna Lima, Daiana Viana, Emidio Matos, Fernanda Jardini, Felipe Gomes, Guto, Illana Louise, Luciana Yoshime, Lucillia Rabelo, Mayara Paulino, Michele Trindade, Paula Garcia, Patricia Borges Botelho.

Ao querido Lucas Pantaleão, por me apoiar, ensinar e incentivar, por ser uma inspiração, um exemplo!

Às nutricionistas queridas e competentes, Angela Ilha, Juliana Gropp, Klara Rahmann, Natalia Sanchez, Patricia Rios, Vivian Buonacorso, pelos momentos de alegria e pelos ensinamentos.

Aos amados, Amanda Martins, Ariane Justo, Janaina Braga, Lara Perez, Maysa Helena, Melissa Galasso, Sílvia Ramos, Tais Garcia e Vivian Augustini, por todo amor, apoio e atenção que me deram durante essa caminhada! Vocês são incríveis!

A tantos profissionais que me ensinaram e/ou estimularam, como Maria Heloisa Shimizu, Nivaldo, Eloá e amigos do LIM12, Carolina Romão, Viviane Dias e amigos do LIM16, Prof Dr Bruno Ferraz, Aritânia Santos e demais amigos do LIM18, Beatriz Monteiro, Daniele Santos, Karina Thieme e amigos do LIM25, Prof Dr Heraldo Possolo e amigos do LIM51, Prof Dr Niels Olsen, Érica Ivana Gomes e Vitor Virgínio da UNICAMP, Leonardo Jensen (InCor), amigos e mestres dos Laboratórios de Sinalização Celular (LabSinCel) e de Genômica Nutricional (LabGeN) da UNICAMP.

À Cida, Rosana e Senaria, por sempre estarem dispostas a nos ajudar no que for preciso.

À Dona Ana, por ser uma pessoa iluminada por Deus e nos dar o exemplo diário da persistência e luta!

À toda equipe que trabalha duro na Faculdade de Medicina para que tudo funcione da melhor forma possível. Dentre eles, agradeço meu amigo, o senhor

Eugênio, dono de um coração enorme e que também acompanhou minha caminhada!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro (Processos 2011/50443-0, 2012/50249-2, 2015/03523-0).

Ao diretor da Faculdade de Medicina do Hospital Israelita Albert Einstein, Dr Alexandre Campos e às veterinárias Valéria Chida e Luciana Cintra do Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia (CETEC) do Hospital Israelita Albert Einstein por todo apoio experimental.

À Cargill, especialmente à Isabel Manso, por tão gentilmente nos ceder as gorduras para o estudo.

Obrigada de coração a todos aqueles que estiveram ao meu lado nessa trajetória incrível e inesquecível! Muitos nomes não foram aqui citados, mas agradeço a cada um que cruzou comigo pelos corredores da FMUSP, UNICAMP, NYU e retribuiu meu sorriso, meu assovio, minha cantoria... Todos me ensinaram algo que, com certeza, vou carregar por toda minha vida! Em constante aprendizado, sigo feliz e agradecida, sabendo que cada um que está no meu caminho é por uma nobre razão!!!

“A amizade desenvolve a felicidade e reduz o sofrimento, duplicando a nossa alegria e dividindo nossa dor.”

Leon Tolstoi

“A felicidade só é real quando compartilhada”

Christopher McCandless (Into the Wild)

“Sem a curiosidade que me move, que me inquieta, que me insere na busca, não aprendo nem ensino”

Paulo Freire

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Gorduras alimentares e aterosclerose.....	4
1.1.1. Ácidos Graxos Poli-insaturados.....	5
1.1.2. Ácidos Graxos Saturados.....	7
1.1.3. Ácidos Graxos Trans.....	9
1.1.4. Gorduras Interesterificadas.....	13
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. OBJETIVO GERAL.....	23
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1. Desenho Experimental.....	24
4.2. Análises bioquímicas.....	26
4.3. Perfil das lipoproteínas.....	26
4.4. Determinação da área de lesão aterosclerótica.....	27
4.5. Determinação do depósito de lípidos na artéria.....	28
4.6. Conteúdo de colágeno na lesão aterosclerótica.....	28
4.7. Determinação do conteúdo de macrófago na área de lesão por imuno-histoquímica.....	29
4.8. Obtenção e cultivo dos macrófagos do peritônio de camundongos	29
4.9. Modulação da resposta inflamatória induzida por Lipopolissacarídeo (LPS).....	30
4.10. Ensaio celular de efluxo de colesterol.....	31
4.11. Determinação do efluxo de ¹⁴ C-colesterol em macrófagos mediado por HDL2 e apo A-I.....	31

4.12. Extração de RNA do tecido arterial.....	32
4.13. Quantificação do conteúdo de mRNA.....	33
4.14. Quantificação de proteínas por immunoblot	34
4.15. Análise estatística.....	35
5. RESULTADOS	37
6. DISCUSSÃO.....	57
7. CONCLUSÃO	68
8. REFERÊNCIAS	69
Anexo I. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo	82
Anexo II. Ressonância Nuclear Magnética das gorduras Palmítico e Palmítico Interesterificado	83
Anexo III. Ressonância Nuclear Magnética das gorduras Esteárico e Esteárico Interesterificado	84
Anexo IV. Aceite do artigo para publicação	85

LISTA DE ABREVIATURAS

ACAT	Acil-CoA-colesterol aciltransferase
ACC	Acil-CoA carboxilase
CEH	Colesterol éster hidrolase
CETP	Proteína de transferência de ésteres de colesterol
CPT-1	Carnitina palmitoil transferase
CT	Colesterol Total
DCV	Doença cardiovascular
ESTEAR	Dieta hiperlipídica contendo ácido esteárico
ESTEAR INTER	Dieta hiperlipídica contendo ácido esteárico interesterificado
FAS	Ácido graxo sintase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IL	Interleucina
LCAT	Lecitina colesterol acil transferase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLr-KO	Animais com ablação no receptor de LDL
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos-1
MCSF	Fator estimulante da colônia de macrófagos
MMP	Metaloproteinases de matriz
MTTP	Proteína microssomal de transferência de triglicérides
PALM	Dieta hiperlipídica contendo ácido palmítico
PALM INTER	Dieta hiperlipídica contendo ácido palmítico interesterificado
POLI	Dieta hiperlipídica contendo ácidos graxos poli-insaturados
PPAR	Receptores ativados por proliferador de peroxissomo
SCD-1	Estearoil CoA dessaturase
SREBP	Proteína ligadora ao elemento responsivo a esteróis
TG	Triglicérides
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
VCAM-1	Molécula de adesão da célula vesicular-1
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenvolvimento da lesão aterosclerótica	3
Figura 2. Produção industrial da gordura interesterificada pelo método de interesterificação química utilizando uma gordura totalmente hidrogenada	15
Figura 3. Produção industrial da gordura interesterificada pelo método de interesterificação química utilizando óleo vegetal rico em sólidos totais	15
Figura 4. Hipótese do estudo	20
Figura 5. Delineamento experimental.....	25
Figura 6. Anatomia do coração de camundongos	27
Figura 7. Perfil de lipoproteínas plasmáticas.....	42
Figura 8. Fotomicrografias de aortas.....	44
Figura 9. Gorduras interesterificadas e desenvolvimento da aterosclerose	45
Figura 10. Correlações com concentração plasmática de colesterol	47
Figura 11. Correlações com área de lesão	48
Figura 12. Gorduras interesterificadas e resposta inflamatória em macrófagos	50
Figura 13. Influência das gorduras interesterificadas sobre os transcritos (mRNA) de citocinas em artérias.....	51
Figura 14. Expressão de TNF- α e IL1 β na aorta	53
Figura 15. Gorduras interesterificadas e efluxo de colesterol mediado pela apo-AI e HDL2.....	55
Figura 16. Determinação de transcritos (mRNA) para <i>Nr1h3</i> , <i>Abca1</i> , <i>Abcg1</i> , <i>Olr1</i> e <i>Cd36</i> na aorta.....	56
Figura 17. Ação das gorduras interesterificadas no desenvolvimento da aterosclerose.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das gorduras utilizadas no preparo das dietas (g/100 g gordura) e distribuição regioespecífica dos ácidos graxos nas posições sn-2 e sn-1,3 da molécula do glicerol (%)^{1, 2} 38

Tabela 2. Concentração de colesterol e triglicérides no plasma e nas frações de lipoproteínas em camundongos LDLr-KO submetidos às diferentes dietas experimentais por 16 semanas 41

RESUMO

Afonso MS. ***Efeito das gorduras interesterificadas sobre o desenvolvimento da lesão aterosclerótica em camundongos knockout para o receptor de LDL.*** [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Nas últimas décadas, diversos estudos têm demonstrado os efeitos nocivos dos ácidos graxos *trans* à saúde. Consequentemente, diversas agências reguladoras de saúde e sociedades responsáveis pela elaboração de diretrizes nutricionais recomendaram a redução do consumo desses ácidos graxos. Deste modo, a indústria de alimentos vem adequando seus produtos a fim de substituir os ácidos graxos *trans* por gorduras interesterificadas, porém seus efeitos sobre o desenvolvimento da aterosclerose não foram ainda totalmente elucidados. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de gorduras interesterificadas contendo principalmente ácido graxo palmítico ou esteárico sobre o desenvolvimento da aterosclerose. Desta forma, camundongos *knockout* para o receptor de LDL (LDLr-KO) recém-desmamados foram alimentados por 16 semanas com dietas hiperlipídicas (40% do valor calórico total sob forma de gordura) contendo principalmente ácidos graxos poli-insaturados (POLI), *trans* (TRANS), palmítico (PALM), palmítico interesterificado (PALM INTER), esteárico (ESTEAR) ou esteárico interesterificado (ESTEAR INTER) para determinação de concentrações plasmáticas de colesterol total e triglicérides; perfil de lipoproteínas; conteúdo de lípidos (*Oil Red O*) e colágeno (*Picrosirius Red*) e infiltrado de macrófagos (imuno-histoquímica) na área de lesão aterosclerótica; expressão e conteúdo proteico de citocinas na aorta; dosagem das citocinas secretadas por macrófagos de peritônio estimulados ou não com lipopolissacarídeo (LPS); efluxo celular de colesterol mediado pela apo-AI e HDL₂. Os resultados mostraram que os animais que consumiram a gordura interesterificada contendo ácido palmítico (PALM INTER) desenvolveram importante lesão aterosclerótica em comparação aos grupos PALM, ESTEAR, ESTEAR INTER e POLI, resultados confirmados pelo conteúdo de colágeno na lesão. Apesar do

processo de interesterificação não ter alterado as concentrações plasmáticas de lípidos, conforme verificado entre os grupos PALM vs PALM INTER e ESTEAR vs ESTEAR INTER, o acúmulo de colesterol na partícula de LDL foi similar entre os grupos PALM INTER e TRANS. Além desse efeito sobre o perfil de lipoproteínas, macrófagos do peritônio de camundongos que consumiram PALM INTER secretaram significativamente mais IL-1 β , IL-6 e MCP-1 em comparação aos demais grupos. Esse efeito pró-inflamatório foi confirmado na aorta, onde se observou maior expressão de TNF- α e IL-1 β para o grupo PALM INTER em comparação a PALM. Tal insulto inflamatório foi similar ao provocado por TRANS. Esses efeitos deletérios do PALM INTER podem ser parcialmente atribuídos ao acúmulo de colesterol nos macrófagos, promovido pelo prejuízo no efluxo de colesterol mediado pela apo-AI e HDL₂, bem como aumento da expressão de receptores envolvidos na captação de LDL modificada (*Olr-1*) e diminuição daqueles envolvidos na remoção intracelular de colesterol (*Abca1* e *Nr1h3*) na parede arterial. Como conclusão, as gorduras interesterificadas contendo ácido palmítico favorecem o acúmulo de colesterol nas partículas de LDL e em macrófagos, ativando o processo inflamatório, o que conjuntamente contribuiu para maior desenvolvimento de lesão aterosclerótica.

Descritores: dieta hiperlipídica; ácidos graxos; colesterol; aterosclerose; inflamação; lipoproteínas; camundongos *knockout*.

SUMMARY

Afonso MS. ***Effect of interesterified fats on atherosclerotic lesion development in LDL receptor knockout mice.*** [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016.

In recent decades, several studies have shown harmful effects of trans fatty acids on human health. Consequently, simultaneous actions from Health Agencies and Societies responsible for the elaboration of Nutritional Guidelines recommended the reduction in the intake of trans fatty acids. Thus, the food industry is adapting their products to replace these fatty acids by substituting them for interesterified fats, however, the effects of the latter on atherosclerotic lesion development are unknown. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of interesterified fats containing palmitic or stearic fatty acids on atherosclerosis development. For this purpose, weaning male LDL-c receptor knockout (LDLr-KO) mice were fed a high fat diet (40% of total daily energy intake from fat) enriched in polyunsaturated (PUFA), TRANS, palmitic (PALM), palmitic interesterified (PALM INTER), stearic (STEAR) or stearic interesterified (STEAR INTER) fat for 16 weeks to determine several parameters: total cholesterol and triglycerides plasma concentrations; lipoprotein profile; lipid (Oil Red O) and collagen (Picrosirius Red) contents, as well as macrophage infiltration (immunohistochemistry) in the atherosclerotic lesion; cytokine transcription and protein content in the aorta; cytokines secreted from peritoneal macrophages stimulated or not with lipopolysaccharide (LPS); apo-AI and HDL₂-mediated cellular cholesterol efflux. The results showed that mice fed PALM INTER presented greater atherosclerotic lesion as compared to PALM, STEAR, STEAR INTER and PUFA, which was confirmed by the collagen content in the aortic lesions. Although the interesterification process did not modify the plasma lipid concentration, as verified by the comparisons PALM vs PALM INTER and STEAR vs STEAR INTER, the cholesterol accumulation in LDL particle was similar in PALM INTER and TRANS. Peritoneal macrophages from PALM INTER-fed mice secreted

significantly more IL-1 β , IL-6 and MCP-1 as compared to all other groups. This pro-inflammatory effect was confirmed in the aorta, in which PALM INTER presented higher TNF- α and IL-1 β expressions as compared to PALM. This inflammatory insult was similar to that elicited by TRANS. All these deleterious effects of PALM INTER can be partially attributed to macrophage cholesterol accumulation, due to impaired apo-AI and HDL₂-mediated cholesterol efflux, as well as to higher expression of receptors involved in modified LDL uptake (*Olr-1*), together with a reduction in those involved in cholesterol removal (*Abca1* e *Nr1h3*) in the arterial wall. In conclusion, interesterified fats containing palmitic acid promotes cholesterol accumulation in LDL particles and in macrophages, activating the inflammatory process, which contributed to atherosclerosis development.

Keywords: diet, high fat; fatty acids; cholesterol; atherosclerosis; inflammation; lipoproteins; mice, knockout.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, as doenças cardiovasculares (DCV) passaram a ser a principal causa mundial de mortalidade (Murray *et al.*, 2012), sendo a aterosclerose o principal contribuinte. Caracterizada como uma doença multifatorial, a aterosclerose tem como fatores de risco clássicos a concentração plasmática de colesterol, tabagismo, hiperglicemia, resistência à insulina, obesidade, hipertensão e dieta inadequada, rica em TRANS e ácidos graxos saturados (Libby, 2006). Todos esses fatores contribuem para a ativação endotelial, alterações no metabolismo de lípidos e na resposta inflamatória, condições relevantes para o início, a progressão e, por fim, a ruptura da placa aterosclerótica (Ross, 1999). De fato, conforme demonstrado na figura 1, as concentrações plasmáticas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) estão diretamente associadas com maior risco de desenvolvimento de doença cardiovascular, já que a retenção dessa lipoproteína no espaço subendotelial favorece sua modificação físico-química, condição essencial para o desenvolvimento da lesão aterosclerótica (Ross, 1999; Rocha & Libby, 2009; Hansson & Hermansson, 2011). Tal relevância se deve ao fato de que essas lipoproteínas oxidadas estimulam a ativação endotelial, a qual é caracterizada pelo aumento da expressão de moléculas de adesão, tais como as selectinas E e P, moléculas de adesão da célula vascular-1 (VCAM-1) e intercelular-1 (ICAM-1) (Witztum & Steinberg, 1991; Li *et al.*, 1993; Ross, 1999; Hansson & Hermansson, 2011), bem como da proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1), contribuindo para o recrutamento de linfócitos e monócitos para o

local propenso à formação da lesão. Os monócitos infiltrados no espaço subendotelial são diferenciados a macrófagos mediante a ação do fator estimulante da colônia de macrófagos (MCSF), cuja expressão é induzida pela LDL oxidada (Fuhrman *et al.*, 2008). Macrófagos diferenciados possuem receptores *scavenger* tais como *lectin-like oxLDL* (LOX-1), *cluster of differentiation 36* (CD36) e *class A e B scavenger receptors* (SRA e SR-BI, respectivamente) capazes de captar partículas de LDL modificadas (Ross, 1999; Rocha & Libby, 2009; Finn, Kolodgie & Virmani, 2010). O aumento da captação dessas lipoproteínas modificadas contribui para o acúmulo de ésteres de colesterol nos macrófagos, dando origem às células espumosas capazes de secretar ainda mais mediadores inflamatórios e moléculas quimioatraentes (Rocha & Libby, 2009; Finn, Kolodgie & Virmani, 2010). Dentre os mediadores inflamatórios, as células da parede endotelial são capazes de secretar diversas citocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucinas-1 β (IL-1 β) e 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), bem como as proteínas MCP-1 e MCSF envolvidas no recrutamento e ativação das células inflamatórias, respectivamente (Libby, 2006).

A progressão da doença cursa com a proliferação de células musculares lisas, as quais secretam matriz extracelular dando origem à capa fibrosa rica em colágeno, condição essencial para promover a estabilidade da placa (Libby, 2006; Libby, 2013). Entretanto, em estágios mais avançados, macrófagos ativados também secretam metaloproteinases de matriz capazes de catabolizar o colágeno e degradar a capa fibrosa, tornando a lesão propensa à ruptura (Libby & Theroux, 2005).

Figura 1. Desenvolvimento da lesão aterosclerótica. As concentrações plasmáticas de LDL associam-se com o desenvolvimento da aterosclerose, já que a retenção subendotelial dessa lipoproteína favorece a sua modificação por processos oxidativos. A LDL oxidada induz a ativação endotelial, caracterizada pelo aumento na expressão de moléculas de adesão e da proteína quimioatraente de monócitos favorecendo a infiltração dessa célula no espaço subendotelial. Além disso, a LDL oxidada também é capaz de ativar a diferenciação de monócitos a macrófagos via fator estimulante da colônia de macrófagos (MCSF), o que é um passo extremamente importante, já que o macrófago possui receptores capazes de captar a LDL modificada, dando origem à célula espumosa. Além desses fatores, a LDL modificada impede o retorno de macrófagos residentes para o sangue e favorece a apoptose de células endoteliais e macrófagos.

Além destes fatores, o acúmulo de colesterol livre e de seus produtos oxidados (oxisteróis) resultantes da esterificação ineficiente pela enzima acil-CoA-colesterol aciltransferase (ACAT) induz o estresse do retículo endoplasmático e, conseqüentemente, a apoptose de macrófagos (Feng *et al.* 2003; Sun *et al.*, 2009). A apoptose não apenas de macrófagos como também de células musculares lisas e, possivelmente, de células endoteliais, juntamente com um ambiente pró-inflamatório, pró-coagulante e proteolítico,

contribui para a vulnerabilidade e, portanto, a ruptura da placa aterosclerótica. O contato do núcleo lipídico extremamente trombogênico com o sangue favorece o advento da oclusão arterial e dos processos aterotrombóticos (Libby, 2006; Libby, 2013; Tabas, 2010; Finn, Kolodgie & Virmani, 2010).

1.1. Gorduras alimentares e aterosclerose

Em meados da década de 50, importante investigação epidemiológica demonstrou que o alto consumo de gordura, especialmente em quantidade superior a 30% das calorias totais da dieta, aumentava a incidência de aterosclerose (Keys *et al.*, 1957). Posteriormente, diversos estudos demonstraram que não apenas a quantidade, mas também o tipo de gordura alimentar exercia impacto importante sobre a colesterolemia e, conseqüentemente, sobre o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Grundy, 1990; Watts *et al.*, 1996; Kris-Etherton & Yu, 1997; Ascherio, 2002; Mensink *et al.*, 2003). Dentro deste contexto, o *Seven Countries Study* evidenciou correlação positiva entre o consumo de ácidos graxos saturados, ácidos graxos *trans* e colesterol com mortalidade por DCV (Kromhout *et al.*, 1995). Nesse mesmo estudo, os pesquisadores observaram baixa incidência de morte por DCV em regiões do Mediterrâneo e apontaram como possível causa o baixo consumo de gordura saturada concomitante ao elevado consumo de gordura monoinsaturada. Os efeitos deletérios do alto consumo de ácidos graxos saturados e *trans* sobre o sistema cardiovascular foram confirmados no *Nurse's Health Study*, no qual verificou-se que a substituição de 5% das calorias provenientes de gordura saturada por gordura insaturada

reduziu em 42% o risco para DCV, um efeito mais pronunciado mediante substituição de ácidos graxos *trans* por insaturados, o que proporcionou uma redução de 53% no risco cardiovascular (Hu *et al.*, 1997). Recentemente, uma meta-análise incluindo mais de 50.000 indivíduos reafirmou que a substituição parcial de ácidos graxos saturados por poli-insaturados, reduz a concentração plasmática de LDL-c e, conseqüentemente, os eventos cardiovasculares (Hooper *et al.*, 2015).

Paralelamente aos resultados de estudos epidemiológicos e clínicos, a ação dos diferentes ácidos graxos sobre vias metabólicas e, nas últimas décadas, sobre as vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento da aterosclerose também foram elucidadas.

1.1.1. Ácidos Graxos Poli-insaturados

Caracterizada por possuir ácidos graxos com duas ou mais duplas ligações na cadeia de carbono, a gordura poli-insaturada é capaz de reduzir as concentrações de colesterol e triglicérides plasmáticos quando usada em substituição aos ácidos graxos saturados (Shepherd *et al.*, 1980; Goodnight *et al.*, 1982). Um dos primeiros mecanismos descritos dos poli-insaturados sobre a redução da colesterolemia refere-se a sua cadeia *cis*, cuja configuração espacial ocupa maior espaço na partícula de LDL, restringindo a incorporação de colesterol nesta partícula (Spritz & Mishkel, 1969). Outras ações descritas foram atribuídas à capacidade desses ácidos graxos em aumentar a expressão de genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos (receptores ativados por proliferador de peroxissomo alfa – PPAR α , carnitina palmitoil transferase –

CPT-1) e bloquear a expressão daqueles envolvidos na lipogênese hepática (proteína ligadora ao elemento responsivo a esteróis – SREBP-1c, ácido graxo sintase – FAS, estearoil COA dessaturase – SCD-1, acil-CoA carboxilase – ACC), culminando em menor síntese de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) (Hannah *et al.*, 2001). Além disso, ácidos graxos insaturados conferem maior fluidez às membranas do hepatócito, alterando a atividade e a quantidade de receptores específicos de LDL denominados receptores B/E (Fernandez & McNamar, 1989; Tripodi *et al.*, 1991). Esse processo provavelmente decorre da alta afinidade dos ácidos graxos insaturados com a ACAT, reduzindo o *pool* intracelular de colesterol livre, condição que induz a síntese do receptor B/E via ativação da proteína ligadora ao elemento responsivo a esteróis 2 (SREBP-2) (Yu-Poth *et al.*, 2005). Além disso, os ácidos graxos insaturados formam LDL com menor conteúdo de colesterol éster, por diminuírem a transferência deste esteroide da lipoproteína de alta densidade (HDL) para VLDL, reação mediada pela proteína de transferência de ésteres de colesterol, a CETP (Lottenberg *et al.*, 1996).

Em decorrência desses importantes efeitos sobre a lipemia somados ao potencial anti-inflamatório, estudos experimentais demonstraram que os ácidos graxos poli-insaturados previnem a formação da lesão aterosclerótica quando comparados aos ácidos graxos saturados. De fato, em camundongos LDLr-KO alimentados com dieta hiperlipídica rica em gordura saturada, a substituição parcial por ácidos graxos poli-insaturados reduziu a expressão de MCP-1 e o acúmulo de colesterol nos macrófagos peritoneais, fatores que foram concomitantes à redução das concentrações plasmáticas de colesterol e de IL-

6 (Wang *et al.*, 2009a). De forma semelhante, observou-se redução da secreção de MCP-1 e da expressão de TNF- α , IL-6 e MCP-1 em macrófagos da linhagem THP-1 tratados com ácido eicosapentaenoico (EPA) e com ácido araquidônico, quando comparados aos macrófagos tratados com os ácidos graxos saturados mirístico e palmítico e ao grupo controle (Wang *et al.*, 2009b). Macrófagos dessa mesma linhagem incubados com VLDL contendo alta concentração de EPA apresentam redução da secreção dos marcadores inflamatórios TNF- α , IL-1 β e MCP-1, fatores que contribuem para menor recrutamento de células inflamatórias e, portanto, menor formação de células espumosas (Jinno *et al.*, 2011). De fato, em carótidas humanas com placas avançadas, a incorporação de EPA reduziu o número de infiltrado de células inflamatórias e aumentou a estabilidade da placa (Thies *et al.*, 2003). Esses fatos podem ser atribuídos ao papel do EPA sobre a redução na expressão das proteínas IL-6 e ICAM-1, bem como à menor expressão das metaloproteinases de matriz MMP-7, MMP-9 e MMP-12, conforme observado em pacientes suplementados com esse ácido graxo (Cawood *et al.*, 2010).

1.1.2. Ácidos Graxos Saturados

Os ácidos graxos saturados apresentam cadeia retilínea de carbono e estão presentes nas gorduras animais, bem como em alguns vegetais, tais como coco e cacau. O ácido palmítico (C16:0) contribui com 56,3% do total de gordura saturada presente na alimentação, seguido pelos ácidos esteárico (18:0) e mirístico (14:0), os quais perfazem, respectivamente, 25,8% e 8,7% do

total de ácidos graxos saturados consumidos na dieta (Kris-Etherton *et al.*, 2005).

Estudos clínicos e epidemiológicos demonstraram que o alto consumo de ácidos graxos saturados aumenta a concentração plasmática de colesterol total e LDL (Grundy & Vega, 1988; Nicolosi *et al.*, 1990; Bennett *et al.*, 1995; Mensink *et al.*, 2003), induz lipogênese hepática (Casaschi *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2005), ativa vias de sinalização envolvidas no processo inflamatório (Suganami *et al.*, 2007) e no estresse do retículo endoplasmático (Wang, Wei & Pagliassotti, 2006), o que contribui para o estabelecimento da apoptose (Malhi *et al.*, 2006; Erbay *et al.*, 2009).

O aumento das concentrações plasmáticas de colesterol e LDL proporcionado pela gordura saturada é atribuído, especialmente, à redução da expressão e atividade de receptores hepáticos de LDL (B/E), diminuindo a remoção desta partícula da circulação (Bonanome & Grundy, 1988; Daumerie, Woollett & Dietschy, 1992; Horton, Cuthbert & Spady, 1993; Bennett *et al.*, 1995; Kris-Etherton & Yu, 1997). No fígado, os ácidos graxos saturados induzem a síntese de apoB100 e ativam a transcrição de genes que codificam proteínas associadas à síntese de ácidos graxos, fatores que contribuem com a formação de VLDL e, consequentemente, LDL (Jackson *et al.*, 2006). Além disso, em virtude de sua cadeia retilínea, os ácidos graxos saturados se empacotam de forma mais coesa na LDL, possibilitando maior transporte de colesterol por esta partícula (Spritz & Mishkel, 1969). Ainda com relação ao seu efeito sobre as lipoproteínas, embora não reduzam as concentrações plasmáticas de HDL, os ácidos graxos saturados podem reduzir seu potencial

anti-inflamatório e prejudicar a função endotelial quando comparados aos ácidos graxos poli-insaturados (Nicholls *et al.*, 2006).

Desta forma, muito além da colesterolemia, os ácidos graxos saturados promovem a formação da lesão aterosclerótica por ativar o processo inflamatório (Poledne, 2013). De fato, em camundongos LDLr-KO submetidos a dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados e colesterol, houve aumento da concentração plasmática de MCP-1, TNF- α e IL-6, concomitante com aumento do infiltrado de macrófagos na parede arterial (Wang *et al.*, 2010). Em macrófagos da linhagem J774 estimulados com lipopolissacarídeo (LPS), os ácidos palmítico e esteárico induziram a secreção de TNF- α quando comparados aos ácidos graxos insaturados (de Lima-Salgado *et al.*, 2011). Parte desses efeitos pró-inflamatórios estão associados à capacidade dos ácidos graxos saturados em interagir com o receptor do tipo Toll (TLR4), deflagrando uma cascata de sinalização que culmina na translocação do fator nuclear *kappa* B (NFkB) e, conseqüentemente, a transcrição de seus genes alvo ciclooxigenase-2 (COX-2), IL-1 α , óxido nítrico sintase induzível (iNOS), entre outros (Lee *et al.*, 2001). Além disso, por serem precursores de ceramidas, os ácidos graxos saturados de cadeia longa favorecem o acúmulo dessas substâncias nos macrófagos, aumentando a secreção de citocinas inflamatórias por essas células (Holland *et al.*, 2011; Schilling *et al.*, 2013).

1.1.3. Ácidos Graxos Trans

Os ácidos graxos *trans* contêm ácidos graxos insaturados com uma ou mais duplas ligações na posição *trans*. Na alimentação, encontram-se

especialmente os ácidos vacênico (*trans*-11 18:1) e elaídico (*trans*-9 18:1). O ácido vacênico é encontrado em pequenas quantidades nas carnes e nos laticínios, já que são produzidos por bactérias do rúmen. Por outro lado, o ácido elaídico está presente nos óleos vegetais parcialmente hidrogenados (PHVO) produzidos em escala industrial, contribuindo com a maior parte dos ácidos graxos *trans* presentes na alimentação (Micha & Mozaffarian, 2008; Teegala, Willett & Mozaffarian, 2009).

Os efeitos deletérios dos ácidos graxos *trans* sobre a doença cardiovascular foi demonstrado em estudos epidemiológicos, clínicos e experimentais. Esses efeitos são atribuídos à capacidade desses ácidos graxos, especialmente o elaídico, em induzir perfil lipídico plasmático ainda mais aterogênico que os ácidos graxos saturados, ativar processos inflamatórios (Mozaffarian *et al.*, 2004; Bryk *et al.*, 2011), provocar disfunção endotelial (López-García *et al.*, 2005) e reduzir a sensibilidade à ação da insulina (Lefevre *et al.*, 2005), condições que, isolada ou conjuntamente, podem culminar no desenvolvimento de aterosclerose e *diabetes mellitus* (Kromhout *et al.*, 1995; Micha & Mozaffarian, 2008).

Em indivíduos normocolesterolêmicos que recebiam no mínimo 10% de ácidos graxos *trans*, saturados e *cis*-monoinsaturados, demonstrou-se que os ácidos graxos *trans*, assim como os saturados, aumentavam a concentração plasmática de LDL-c, mas exerciam efeito adverso adicional, em razão de reduzirem a concentração plasmática de HDL-c (Mensink & Katan, 1990). Posteriormente, estudos comprovaram que os ácidos graxos *trans* aumentavam o catabolismo da principal proteína presente na HDL, a

apolipoproteína AI (apo-AI), enquanto reduzem o catabolismo da apolipoproteína B100 (apo B100), a qual está envolvida na formação de LDL e VLDL (Matthan *et al.*, 2000; Matthan *et al.*, 2004). Como a apo-AI tem como função principal captar colesterol de células periféricas via receptor *ATP binding cassette transporter A-1* (ABCA-1), a degradação dessa proteína e/ou desse receptor poderia ser responsável pelo aumento na formação da lesão aterosclerótica. Para testar essa hipótese, foram isoladas HDL de indivíduos jovens normocolesterolêmicos que consumiram dieta normolipídica (25 a 30% das calorias diárias) enriquecida com gordura *trans*, saturada ou poli-insaturada. A capacidade da HDL em remover colesterol dos macrófagos sobrecarregados com LDL acetilada foi semelhante entre os grupos (Buonacorso *et al.*, 2007). Isso sugere que a ação deletéria dos ácidos graxos *trans* possa depender da condição metabólica prévia do indivíduo. De fato, em macrófagos humanos derivados de monócitos, verificou-se que o efeito do ácido elaídico sobre a redução do efluxo celular de colesterol mediado pelo receptor ABCA-1 foi mais intenso em macrófagos enriquecidos com colesterol quando comparados aos macrófagos com concentrações normais de colesterol (Fournier *et al.*, 2012). Por outro lado, em camundongos LDLr-KO alimentados com dieta hiperlipídica (40% das calorias diárias) enriquecida com ácidos graxos *trans*, houve aumento do conteúdo proteico de ABCA-1 na área de lesão quando comparado aos ácidos graxos saturados e poli-insaturados. É importante observar que, nesse caso, o aumento do conteúdo de ABCA-1 foi atribuído à maior formação da placa e, portanto, ao maior conteúdo de macrófagos na área da lesão (Machado *et al.*, 2012).

Os ácidos graxos *trans* também estimulam a expressão de genes envolvidos na síntese hepática de triglicérides e na produção de VLDL, tais como a ácido graxo sintase (FAS), a proteína de ligação ao elemento responsivo a esteroides-1c (SREBP-1c) e a proteína microsomal de transferência de triglicérides (MTTP), conforme demonstrado em camundongos com deficiência no receptor de LDL-c (Cassagno *et al.*, 2005).

Efeitos semelhantes sobre a lipogênese hepática foram demonstrados nesse mesmo modelo animal mediante consumo de dieta hiperlipídica (40% das calorias diárias) (Machado *et al.*, 2010), mas um evento agravante foi a redução dos transcritos da MTTP, sugerindo menor capacidade do fígado em exportar triglicérides. Esse fato induziu o desenvolvimento de lesões compatíveis com esteato-hepatite não alcoólica (NASH), condição fortemente relacionada com o aumento do risco de doença cardiovascular (Sookoian & Pirola, 2008). Realmente, observou-se nesses animais, perfil de lipoproteínas mais aterogênico, o que contribuiu para o desenvolvimento de lesão aterosclerótica severa (Machado *et al.*, 2012).

Outros efeitos deletérios dos ácidos graxos *trans* no contexto cardiovascular estão relacionados ao aumento das concentrações plasmáticas de LDL pequenas e densas (Mauger *et al.*, 2003), à redução da vasodilatação mediada pelo fluxo (de Roos, Bots & Katan, 2001) e à ativação de vias envolvidas no processo inflamatório. Além disso, sua concentração na membrana de eritrócitos tem sido associada com o aumento na expressão de proteína C reativa, IL-6, TNF- α , MCP-1 e moléculas de adesão (Baer *et al.*, 2004; Mozzafarian *et al.*, 2004; López-García *et al.*, 2005; Bryk *et al.*, 2011).

Diante dessas evidências, a *Food and Drug Administration* (FDA) designou, em 1999, que todos os produtos embalados deveriam indicar na rotulagem nutricional a quantidade de ácidos graxos trans na porção dos alimentos industrializados. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) preconizou na resolução RDC nº 360 de 23 de dezembro de 2003, que apenas os produtos que contenham ácidos graxos *trans* em quantidade menor ou igual a 0,2 g por porção sejam designados como zero *trans*. Adicionalmente, em 2006 a *American Heart Association* realizou um fórum com representantes da indústria de alimentos e de órgãos de saúde, com a finalidade de discutir as possíveis alternativas para redução do consumo de *trans* sem aumentar a quantidade de ácidos graxos saturados dos produtos (Eckel *et al.*, 2007).

No entanto, as gorduras que vêm sendo utilizadas atualmente em substituição aos ácidos graxos *trans* são as gorduras interesterificadas, (Hunter, 2006), as quais possuem baixos teores ou ausência de isômeros *trans*, entretanto, são ricas em ácidos graxos saturados já que são produzidas a partir de uma base totalmente hidrogenada, ou seja, saturada.

1.1.4. Gorduras Interesterificadas

As gorduras interesterificadas são obtidas pela mistura de um óleo vegetal com uma gordura completamente hidrogenada (**Figura 2**), ou misturas de frações sólidas e líquidas de um óleo vegetal rico em sólidos totais, tal como verificado no óleo de palma, o qual possui como fração sólida a estearina de palma e como fração líquida a oleína de palma (**Figura 3**). Em escala industrial, essa mistura é submetida ao processo de interesterificação, o qual permite o

rearranjo aleatório de ácidos graxos na molécula de glicerol até que seja alcançado um equilíbrio termodinâmico. Este método, que possibilita a formação de triglicérides com novas propriedades físicas, organolépticas e químicas (Norizzah *et al.*, 2004; Tarrago-Trani *et al.*, 2006), pode ser químico ou enzimático.

O processo químico é o mais utilizado industrialmente e, neste método, a gordura é aquecida (100 a 140 °C) por um curto período na presença de catalisadores, geralmente o metóxido de sódio, em uma concentração de 0,05 a 0,15% (Berry, 2009). Os ácidos graxos são hidrolisados da cadeia de glicerol e rearranjados de forma aleatória, embora a composição de ácidos graxos no triglicéride interesterificado possa ser controlada pelas quantidades relativas de cada tipo de gordura. Já a interesterificação enzimática utiliza lipases provenientes de bactérias, fungos e leveduras que são mais seletivas, atuando nas posições *sn*-1 e *sn*-3 do triglicéride (Marangoni & Rousseau, 1995; Tarrago-Trani *et al.*, 2006; Berry, 2009).

Essa numeração estereoespecífica (*stereospecific numbering system*, *sn*) dos triglicérides refere-se à posição do átomo de carbono na molécula do glicerol. Nas gorduras e óleos vegetais, os ácidos graxos insaturados são encontrados predominantemente na posição *sn*-2, enquanto os saturados estão presentes nas posições mais externas, *sn*-1 e *sn*-3. Por outro lado, nas gorduras animais, a posição intermediária do triglicéride é ocupada em maior proporção por ácidos graxos saturados (Berry, 2009).

Figura 2. Produção industrial da gordura interesterificada pelo método de interesterificação química utilizando uma gordura totalmente hidrogenada. A gordura interesterificada é produzida a partir da mistura de uma gordura totalmente hidrogenada, ou totalmente saturada, com um óleo vegetal, o qual possui principalmente ácidos graxos insaturados na posição sn-2 da molécula de glicerol. Com uso de catalisadores e temperatura específicos, os ácidos graxos sofrem um rearranjo aleatório na molécula do glicerol, resultando em triglicérides com maior quantidade de ácidos graxos saturados na posição sn-2.

Figura 3. Produção industrial da gordura interesterificada pelo método de interesterificação química utilizando óleo vegetal rico em sólidos totais. A gordura interesterificada também pode ser produzida a partir da mistura de uma fração sólida, como a estearina de palma, com uma fração líquida, como a oleína de palma. O rearranjo dos ácidos graxos na molécula do glicerol também ocorrerá via uso de catalisadores e temperatura específicos, aumentando a quantidade de ácidos graxos saturados na posição sn-2.

Estudos epidemiológicos e experimentais já elucidaram o efeito do consumo de gorduras vegetais e animais sobre o risco cardiovascular. Nesse contexto, já foram evidenciados os efeitos do comprimento da cadeia (Mensink *et al.*, 2003), do grau de insaturação e da posição geométrica das duplas ligações presentes nos ácidos graxos (Hu *et al.*, 1997; Lefevre *et al.*, 2004; Sacks & Katan, 2002); entretanto, o papel da troca de posição dos ácidos graxos nos triglicérides sobre o desenvolvimento da DCV ainda não foi completamente elucidado.

Grande parte dos estudos envolvendo gorduras interesterificadas demonstra o seu efeito sobre a lipemia; contudo, os resultados são bastante controversos, já que diferentes tipos de ácidos graxos podem ser utilizados na formulação dessas gorduras. Tanto o óleo de soja parcialmente hidrogenado quanto o interesterificado proporcionaram aumento na razão LDL-c/HDL-c em humanos, quando comparados ao óleo de palma (Sundram, Karupaiah & Hayes, 2007). Por outro lado, em homens hipercolesterolêmicos verificou-se que o consumo tanto da margarina contendo óleo de palma (láurico, mirístico, palmítico, oleico e linoleico) quanto da margarina contendo óleo de palma interesterificado aumentaram as concentrações de LDL-c quando comparados à margarina contendo elevados teores de ácido linoleico e moderados de *trans* (Nestel *et al.*, 1995). Além disso, demonstrou-se que a interesterificação transferiu quantidades significativas de ácido palmítico para a posição *sn*-2 e de ácidos graxos insaturados para as posições *sn*-1 e *sn*-3, o que se refletiu nos quilomícrons isolados do plasma (Nestel *et al.*, 1995). Desta forma. Como a posição *sn*-2 em óleos vegetais é ocupada por ácidos graxos insaturados,

inserir um ácido graxo saturado nessa posição pode prejudicar o metabolismo hepático de LDL-c e, também, a atividade da lecitina colesterol aciltransferase (LCAT) (Wang, Kuksis & Manganaro, 1982), enzima que transfere ésteres de colesterol presentes nas lipoproteínas circulantes no plasma para HDL-c (Hayes, 2001), incorrendo em maior risco cardiovascular.

No entanto, outro estudo conduzido em mulheres normocolesterolêmicas demonstrou que o ácido palmítico nas posições *sn*-1 e *sn*-3 foi responsável pelo aumento da concentração plasmática de triglicérides e pela redução dos valores de insulina no início da resposta pós-prandial (0 a 90 minutos) (Yli-Jokipii *et al.*, 2001), eventos que estão associados ao risco cardiovascular. Além disso, o consumo de gorduras com alto conteúdo de ácido palmítico na posição *sn*-2 reduziu a lipemia pós-prandial em indivíduos saudáveis (Sanders *et al.*, 2011).

De fato, em indivíduos saudáveis, a interesterificação química não alterou as concentrações plasmáticas de lipídeos, mas favoreceu a menor concentração do dímero D, um produto de degradação da fibrina associado com o risco para doença cardiovascular (Meijer & Weststrate, 1997). Já em obesos, esse tipo de interesterificação aumentou a concentração pós-prandial de triglicérides (85%), fato não observado em indivíduos eutróficos (Robinson *et al.*, 2009). Juntos, esses dados sugerem que a interesterificação pode afetar indivíduos saudáveis de maneira diferente daqueles que já têm risco de desenvolver DCV e *diabetes mellitus* tipo 2.

Em animais, o processo de interesterificação parece reduzir a lipemia. Em ratos *Wistar*, o consumo de óleo de canola interesterificado, favoreceu

menor concentração de colesterol total e livre no plasma quando comparados ao grupo de animais que recebeu a dieta com óleo de canola sem passar pelo processo de interesterificação (Ohara *et al.*, 2009). Nesse mesmo modelo animal, o consumo de óleo de coco e farelo de arroz ou óleo de coco e de gergelim interesterificados por 60 dias reduziu as concentrações plasmáticas de colesterol total, LDL-c e triglicérides quando comparados com ratos alimentados com os mesmos óleos antes de passar pela interesterificação (Reena & Lokesh, 2007). Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisadores verificou que essa ação estaria associada ao aumento na expressão do receptor hepático de LDL concomitante ao aumento na expressão dos genes que codificam para colesterol-7 α -hidroxilase (CYP7A1) e SREBP-2. Esses resultados sugerem que a modificação da posição do ácido graxo na molécula do glicerol, proporcionada pela interesterificação, possa modular as concentrações plasmáticas de LDL pela regulação de enzimas-chave envolvidas no metabolismo do colesterol (Reena, Gowda & Lokesh, 2011). Vale ressaltar que, nesse último estudo, foi utilizada uma quantidade similar de ácidos graxos saturados, poli-insaturados e monoinsaturados, o que pode ter proporcionado esse efeito redutor da lipemia.

Apesar de todos esses estudos realizados com diferentes fontes de gorduras, o óleo de palma ainda é a opção de escolha para substituição das gorduras *trans* por conferir consistência semissólida em temperatura ambiente e maior estabilidade à oxidação (Müller *et al.*, 1998). Entretanto, o uso exclusivo do óleo de palma pode causar aumento indesejável do consumo de ácido palmítico, o qual está associado com aumento do risco cardiovascular, já

que favorece a elevação da colesterolemia (Grande *et al.*, 1965; Bonanome & Grundy, 1988; Grundy & Vega, 1988) e ativa importantes vias de sinalização celular envolvidas no processo inflamatório e no estresse metabólico (Wang *et al.*, 2010; Holland *et al.*, 2011; Schilling *et al.*, 2013).

Uma opção adotada pela indústria é o uso de ácido esteárico, em razão da sua neutralidade sobre os lípides plasmáticos (Grande *et al.*, 1965; Bonanome & Grundy, 1988; Grundy & Vega, 1988; Mensink, 2008). No entanto, deve-se ressaltar que a presença desse ácido graxo é muito baixa nos alimentos consumidos habitualmente e não há evidências sobre a repercussão do seu alto consumo sobre o risco cardiovascular. Sabe-se, até o momento, que o seu alto consumo (9% das calorias da dieta) induziu elevação da concentração plasmática de fibrinogênio, conforme discutido em importante revisão (Hunter, Zhang & Kris-Etherton, 2010).

Figura 4. Hipótese do estudo. Os óleos vegetais (A) possuem ácidos graxos insaturados na posição sn-2 do triglicéride, possibilitando absorção eficiente desse tipo de ácido graxo sob a forma de 2-monoacilglicerol (Tomarelli *et al.*, 1968; Filer, Mattson & Fomon, 1969; Mattson, Nolen & Webb, 1979; Carnielli *et al.*, 1995). A captação desses ácidos graxos pelo fígado inibe a expressão e a atividade de enzimas envolvidas na lipogênese *de novo* e também não induz o processo inflamatório e a resistência à ação da insulina. A conformação espacial dos ácidos graxos insaturados ocupa mais espaço nas lipoproteínas, reduzindo a sua capacidade de transporte de colesterol, o que contribui à formação de partículas menos aterogênicas e reduz o risco cardiovascular (Spritz & Mishkel, 1969; Pachikian *et al.*, 2011; Machado *et al.*, 2012; Depner, Philbrick & Jump, 2013). Por outro lado, as gorduras interesterificadas (B) possuem grande quantidade de ácidos graxos saturados na posição sn-2 do triglicéride, o que possibilitaria maior absorção desse tipo de ácido graxo sob a forma de 2-monoacilglicerol, estimulando a expressão e a atividade de enzimas envolvidas na lipogênese *de novo*, induzindo o processo inflamatório e a resistência à ação da insulina no tecido hepático. Devido à conformação espacial dos ácidos graxos saturados, a ligação de forma coesa dos mesmos aumenta a capacidade das lipoproteínas em transportar colesterol, fator que aumenta o risco de eventos cardiovasculares.

A maior parte dos estudos sobre a ação das gorduras interesterificadas avaliou o seu efeito sobre as concentrações plasmáticas de lípides (Nestel *et al.*, 1995; Yli-Jokipii *et al.*, 2001; Sundram, Karupaiah & Hayes, 2007; Robinson *et al.*, 2009; Sanders *et al.*, 2011) e poucos sobre a lesão aterosclerótica (Kritchevsky *et al.*, 1998a; Kritchevsky *et al.*, 1998b; Kritchevsky *et al.*, 2000). As investigações sobre o efeito dessas gorduras no desenvolvimento da aterosclerose utilizaram gordura animal, rica em ácido palmítico, a qual não é a fonte utilizada atualmente pela indústria (Kritchevsky *et al.*, 1998a; Kritchevsky *et al.*, 1998b). Apenas um estudo comparou o efeito de ácido palmítico ao do ácido esteárico utilizando fonte vegetal (Kritchevsky *et al.*, 2000). Nesse trabalho, porém, as dietas foram enriquecidas com colesterol, componente que também interfere na lipemia. Além disso, não foi investigada a ação das gorduras interesterificadas de origem vegetal enriquecidas com ácido palmítico e esteárico sobre as vias envolvidas no desenvolvimento da placa aterosclerótica. Nossa hipótese (**Figura 4**) é que o aumento na quantidade de ácido graxo saturado na posição 2 do triglicéride em decorrência do processo de interesterificação favoreça sua incorporação em lipoproteínas, o que contribui para aumento na eficiência dessa partícula em transportar o colesterol aos tecidos periféricos, induzindo, portanto, o desenvolvimento de lesão aterosclerótica.

2. JUSTIFICATIVA

Embora as gorduras interesterificadas estejam sendo utilizadas como alternativa para o uso dos ácidos graxos *trans*, existem poucos estudos que evidenciem a ação do processo de interesterificação sobre os mecanismos relacionados ao desenvolvimento da placa aterosclerótica. Os efeitos dos ácidos graxos palmítico e esteárico na aterosclerose já estão bem documentados na literatura; entretanto, a ação desses ácidos graxos na forma interesterificada ainda precisa ser melhor elucidada.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da interesterificação em misturas de óleos contendo ácido palmítico ou esteárico sobre o desenvolvimento da lesão aterosclerótica em camundongos *knockout* para o receptor de LDL (LDLr-KO).

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a atuação dessas gorduras sobre parâmetros bioquímicos (concentrações de colesterol total e triglicérides) e perfil de lipoproteínas;
- ✓ Determinar o efeito desses ácidos graxos sobre a modulação da resposta inflamatória via secreção de citocinas (MCP-1, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) por macrófagos peritoneais estimulados com lipopolissacarídeo.
- ✓ Averiguar o papel dessas gorduras sobre o conteúdo proteico de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) na aorta abdominal;
- ✓ Determinar o papel das gorduras interesterificadas sobre o efluxo de colesterol celular mediado pela apolipoproteína-AI e pela HDL₂;
- ✓ Analisar em camundongos LDLr-KO o efeito crônico do consumo de misturas (*blends*) de gorduras, interesterificadas ou não, contendo ácidos graxos palmítico ou esteárico sobre o acúmulo de lípidos e o conteúdo de colágeno e macrófago na raiz aórtica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. *Desenho Experimental*

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP 026/12) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), conforme apresentado no Anexo I. O modelo animal utilizado foi camundongo com ablação gênica do receptor de LDL (LDLr-KO), o qual desenvolve aterosclerose quando submetido à dieta rica em gordura, mesmo na ausência de colesterol (Penumetcha *et al.*, 2012). Noventa camundongos machos *knockout* para o receptor de LDL (C57BL/6J; Jackson Laboratory, Bar Harbor, EUA) foram mantidos em ambiente com temperatura (22 ± 2 °C) e umidade relativa ($55 \pm 10\%$) controladas e ciclo invertido claro/escuro de 12 horas. Após o desmame, os animais consumiram dieta padrão (*chow*) por uma semana para aclimação e foram distribuídos aleatoriamente entre os seis grupos experimentais, conforme ilustrado na Figura 5.

As dietas hiperlipídicas (40% do valor calórico total sob a forma de gordura) foram preparadas pela Nutriexperimental (Campinas, SP, Brasil), seguindo as recomendações do *American Institute of Nutrition* (Reeves *et al.*, 1993). A ração foi peletizada manualmente no Laboratório de Lípidos (LIM 10) da FMUSP e a distribuição final de macronutrientes correspondeu, em porcentagem do valor calórico, 40% de carboidratos, 40% de gorduras e 20% de proteínas. É importante ressaltar que não foi adicionado colesterol à dieta dos animais, uma vez que o mesmo influencia importantes vias relacionadas ao

desenvolvimento da lesão aterosclerótica, o que poderia ocultar o efeito das gorduras.

Figura 5. Delineamento experimental. POLI: dieta hiperlipídica contendo gordura poli-insaturada; TRANS: dieta hiperlipídica contendo gordura trans; PALM: dieta hiperlipídica contendo gordura rica em ácido palmítico; PALM INTER: dieta hiperlipídica contendo ácido graxo palmítico interesterificado; ESTEAR: dieta hiperlipídica contendo gordura rica em ácido esteárico; ESTEAR INTER: dieta hiperlipídica contendo ácido graxo esteárico interesterificado.

A composição das gorduras cedidas pela Cargill (São Paulo, Brasil) está apresentada na Tabela 1. Para confirmar a posição do ácido graxo na molécula do glicerol foi utilizado um método quantitativo das gorduras por ressonância nuclear magnética (RNM) empregando o ^{13}C , conforme previamente descrito (Vlahov, 1998; Silva *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010). Essa análise foi realizada no Laboratório de Ressonância Nuclear Magnética do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP para determinação da

composição dos ácidos graxos saturados, bem como dos ácidos graxos oleico e linoleico nas posições *sn*-2 e *sn*-1,3 do triglicéride.

As dietas e a água foram disponibilizadas *ad libitum* aos animais por um período de 16 semanas. O consumo alimentar e o peso dos animais foram monitorados durante todo o experimento para elaboração das curvas de ganho de peso e crescimento. Ao final de 16 semanas, os animais foram submetidos à eutanásia, após jejum de 12 h. Em seguida, foram coletados o sangue em tubos contendo EDTA (0,1%) e o coração ligado à artéria aorta.

4.2. Análises bioquímicas

As concentrações plasmáticas de colesterol total (CT) e triglicérides (TG) foram avaliadas ~~medidas~~ por *kits* comerciais da Roche Diagnostics (Mannheim, Germany).

4.3. Perfil das lipoproteínas

O perfil das lipoproteínas foi analisado por cromatografia em gel de filtração (FPLC). Alíquotas de 100 µL de plasma de cada animal foram injetadas em coluna Superose 6HR 10/30 (FPLC System, Pharmacia, Upsalla, Suécia). Os conteúdos de colesterol total e triglicérides foram avaliados por método enzimático-colorimétrico em leitor de microplaca (SpectraMax Plus384, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) nas frações de VLDL, LDL e HDL.

4.4. Determinação da área de lesão aterosclerótica

Após perfundidas, as artérias aorta conectadas ao coração foram dissecadas, embebidas em substância criopreservante (Tissue TEK, OCT), congeladas gradualmente em isopentano, submersas em nitrogênio e estocadas à -80°C . Foram realizados cortes seriados ($8\text{ }\mu\text{m}$) da região da raiz aórtica, iniciados logo após o aparecimento das valvas aórticas até o início da aorta ascendente, onde já não é mais possível a identificação das valvas (correspondente à área entre C e D; **Figura 6**).

Figura 6. Anatomia do coração de camundongos. A distância entre B e C é de aproximadamente $250\pm 58\text{ }\mu\text{m}$ e entre C e D $280\pm 67\text{ }\mu\text{m}$. A área avaliada compreende a distância entre C e D (Adaptada de Paigen et al., 1987).

Os fragmentos foram fixados em lâminas previamente silanizadas e mantidos à -80°C para posterior análise da área de depósito de lípidos e determinação do infiltrado de macrófagos na área de lesão. A região estudada foi determinada seguindo protocolo de Paigen *et al.* (1987).

4.5. Determinação do depósito de lípidos na artéria

A área marcada com *Oil Red O* corresponde ao infiltrado de lípidos na parede da artéria, caracterizando a área de lesão aterosclerótica. Para assegurar uma análise representativa da área estudada, foram analisados cortes em intervalos de 80 µm, correspondendo a 5 lâminas, uma vez que foram fixados dois cortes histológicos de 8 µm em cada lâmina. Os cortes foram realizados na região da raiz aórtica (correspondente à área entre C e D; **Figura 6**). Os fragmentos foram corados com *Oil Red O* (Sigma-Aldrich, Brasil) e contracorados com hematoxilina de Carazzi. A quantificação do depósito lipídico foi determinada em sistema de imagem digital (Leica Qwin, Leica System) e *software* específico (Image-Pro Plus-Media Cybernetics, MD, USA). A média das áreas foi calculada para cada animal e, subsequentemente, para cada grupo.

4.6. Conteúdo de colágeno na lesão aterosclerótica

O conteúdo de colágeno foi determinado por coloração com *Picrosirius-red* em cortes subsequentes aos utilizados na análise de área de lesão aterosclerótica (*Oil Red O*). A leitura histomorfométrica foi realizada em sistema de imagem digital (*Image-ProPlus software*, Media Cybernetics, MD, USA). Sob luz polarizada, as fibras de colágeno foram identificadas por sua aparência amarela ou vermelha. A fração do volume de colágeno (CVF, %) foi expressa como percentual de área marcada pela área total da placa.

4.7. Determinação do conteúdo de macrófago na área de lesão por imuno-histoquímica

O conteúdo de macrófago na área de lesão foi determinado por imuno-histoquímica. Para tanto, cortes da raiz aórtica foram fixados em acetona por 10 min e lavados em água corrente. Em seguida, foram bloqueados com solução tampão tris (TBS) + albumina de soro bovino (1%) + leite desnatado (2%) por 30 min. Após lavagem com TBS + soro equino (DAKO) + Tween 20 (0,05%), as lâminas foram incubadas *overnight* a 4 °C com anticorpo primário policlonal anti-CD68 (Serotec). As lâminas foram então lavadas com TBS + Tween 20 (0,05%), incubadas por 30 min com H₂O₂ (3%) para bloqueio da peroxidase endógena, novamente lavadas com TBS + Tween20 (0,05%) e incubadas por 90 min com anticorpo secundário conjugado a peroxidase. Aplicou-se substrato de revelação (DAB Substrate Kit-Vector), segundo informações do fabricante. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Carazzi e a área marcada com DAB (marrom), correspondente ao infiltrado de macrófago na parede da artéria, foi quantificada utilizando-se sistema de imagem digital (Leica Qwin, Leica System) e *software* específico (*Image-Pro Plus-Media Cybernetics*, Bethesda, MD, USA). A média das áreas foi calculada para cada animal e, subsequentemente, para cada grupo.

4.8. Obtenção e cultivo dos macrófagos do peritônio de camundongos

Para a obtenção dos macrófagos do peritônio de camundongos, a cavidade peritoneal foi lavada com 6 mL de tampão fosfato (NaCl 0,8%,

Na₂HPO₄ 0,07%, KCl 0,02% e KH₂PO₄ 0,04%), sem EDTA, estéril, pH 7,4. O líquido coletado foi centrifugado a 1.500 rpm a 4 °C por 2 min.

4.9. Modulação da resposta inflamatória induzida por

Lipopolissacarídeo (LPS)

Após obtenção do botão celular, as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA) livre de endotoxinas, contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil), antibióticos (100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina - Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA) e glutamina (2 mM - Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA). Após contagem das células e determinação da viabilidade celular utilizando Trypan Blue, os macrófagos foram cultivados em placas de 24 wells (0,5 x 10⁶ células por cavidade) e mantidos em incubadora de CO₂ 5% a 37 °C. Após 48 h, as placas foram lavadas com PBS para remoção de células não aderidas. Os macrófagos foram incubados por 24 h com 0,5 mL de RPMI contendo albumina bovina isenta de ácidos graxos (FAFA) e LPS (1 µg/mL de meio). Incubações controles foram realizadas apenas na presença de RPMI com FAFA. O meio de cultura foi recolhido em tubos criogênicos, os quais foram armazenados à -80 °C para determinação da concentração de MCP-1 (painel MMHMAG-44K-01), TNF-α, IL-6, IL-1β e IL-10 (painel MCYTOMAG-70K-04) utilizando a metodologia Luminex xMAP (Bio-Rad Laboratory, Hercules, CA, USA). O conteúdo de proteína das células aderidas na placa foi determinado em cada well pelo método de Lowry et al. (1951), após lise celular com NaOH 0,1%, para correção das concentrações de citocinas.

4.10. Ensaio celular de efluxo de colesterol

A HDL₂ (d = 1.063–1.125 g/mL) foi obtida do plasma de doadores saudáveis, a partir da ultracentrifugação sequencial e purificada por ultracentrifugação de gradiente descontínuo. Após a diálise, todas as frações de lipoproteínas foram esterilizadas em filtro 0.22 µm. A LDL foi acetilada de acordo com Basu et al. (1976) e a quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951). A apo-AI purificada foi obtida da Sigma Chemical Co. (St Louis, MI).

4.11. Determinação do efluxo de ¹⁴C-colesterol em macrófagos mediado por HDL2 e apo A-I

Após eutanásia em câmara de CO₂, os macrófagos presentes na cavidade peritoneal dos camundongos foram removidos com injeção de PBS contendo antibióticos. Após centrifugação (1000 rpm/4°C/5 min), o botão celular foi ressuspensionado em 500 µL de meio RPMI (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil) e 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA). Após contagem e verificação da viabilidade, as células foram incubadas em placas de 96 wells (0,25 x 10⁶ células por well) em estufa 37°C, 5% CO₂ por 24 h. Em seguida, as células foram incubadas com LDL acetilada (50 µg/mL) e ¹⁴C-colesterol (0,5 µCi/mL) diluídas em DMEM durante 30 h. Após cuidadosa lavagem com tampão fosfato contendo FAFA, as células foram incubadas por 8 h com apo A-I (30 µg/mL) ou HDL₂ (50 µg/mL) diluídas em DMEM (Gibco,

Grand Island, Nova Iorque, EUA). O meio de cultura foi transferido para frascos de cintilação, onde se acrescentou 3 mL de solução contadora. As células foram lavadas com solução fisiológica gelada e, em seguida, os lípides celulares foram extraídos com solução de hexana:isopropanol (3:2), transferidos para frascos de cintilação e permaneceram em capela de exaustão até a completa evaporação do solvente, tempo após o qual foi acrescentado 3 mL de solução contadora para a determinação da radioatividade. Os valores obtidos das incubações, na presença de apo A-I e HDL₂, foram subtraídos daqueles obtidos apenas com meio de equilíbrio (condição controle), de maneira a refletir o efluxo específico, mediado por apo A-I ou HDL₂. Desta forma, a porcentagem de efluxo foi calculada pela divisão da radioatividade do meio com a radioatividade total multiplicada por 100.

4.12. Extração de RNA do tecido arterial

As aortas foram maceradas e ressuspensas em 1 mL de Trizol e armazenadas em tubos de congelamento em -80 °C. Para a extração de RNA, foi utilizado o *kit RNA Isolation Qiagen RNeasy Mini* (Qiagen, Toronto, CAN). A presença das bandas correspondentes aos RNA ribossomais 18S e 28S, bem como a quantificação do RNA total, foram determinadas em *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). O RNA foi convertido à cDNA por reação de transcrição reversa com *Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Forest City, CA), a partir de uma concentração média de 250 ng de RNA total. A reação foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research Inc,

Watertown, Massachusetts, EUA), de acordo com o protocolo do fornecedor (60 min a 37°C, 5 min a 95°C, seguido de incubação 4°C).

4.13. Quantificação do conteúdo de mRNA

Os cDNAs das amostras foram submetidos à reação de polimerase em cadeia quantitativa por tempo real (RT-qPCR), utilizando o sistema de amplificação *TaqMan Two Step RT-PCR* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os normalizadores para os ensaios em macrófagos e aorta foram escolhidos após teste de quatro genes endógenos descritos na literatura, dos quais o mais estável foi a β -actina (*Actb* Mm00607939_s1). A reação de qPCR em tempo real foi realizada no aparelho *Step One Plus Real Time PCR System* (Applied Biosystems). Os dados foram analisados utilizando-se o programa *StepOne Software 2.0* (Applied Biosystems), que gera curvas logarítmicas dos sinais de amplificação. Os valores de expressão gênica foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, no qual $\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ do controle endógeno}$, considerando-se a eficiência do ensaio (90 a 110%) (Livak e Schmitgen, 2001). As sequências dos *primers* utilizados foram: IL-10 (*Il10*, Mm00439614_m1), IL1 β (*Il1b*, Mm00434228_m1), IL-6 (*Il6*, Mm00446190_m1), TNF α (*Tnf*, Mm00443258_m1), MCP-1 (*Ccl2* Mm00441242_m1), LOX-1 (*Olr1*, Mm00454586_m1), CD36 (*Cd36*, Mm01135198_m1), ABCA-1 (*Abca1*, Mm00442646_m1), ABCG-1 (*Abcg1*, Mm00437390_m1), LXR α (*Nr1h3*, Mm00443451_m1).

4.14. Quantificação de proteínas por immunoblot

Os tecidos congelados foram homogeneizados em tubos de ensaio, cada um contendo 2 mL do tampão de extração, durante 20 s com o processador Polytron® PTA 20S (modelo PT 10/35, Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA), operado em velocidade máxima. Durante e após o procedimento, o material homogeneizado foi mantido em banho de gelo para evitar a desfosforilação e desnaturação das proteínas. Ao final da extração foi adicionado Triton X-100 a 1% (Merk) em todas as amostras mantidas em gelo. Após 40 min, os materiais extraídos e homogeneizados foram centrifugados e o sobrenadante coletado.

Alíquotas contendo 50 µg de proteína por amostra foram aplicadas sobre gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de 1,5 mm de espessura. No mesmo gel foi aplicada uma amostra padrão de proteínas com pesos moleculares conhecidos. A eletroforese foi realizada em cuba de minigel da Bio-Rad (Mini-Protean) (Hercules, CA, USA), com solução tampão para eletroforese previamente diluída. O SDS-PAGE foi inicialmente submetido a 25 volts, até a passagem da linha demarcada pela fase de empilhamento (*stacking*) e 120 volts até o final do gel de resolução (*resolving*). A seguir, as proteínas foram separadas no SDS-PAGE e transferidas para a membrana de nitrocelulose utilizando-se o equipamento de eletrotransferência de minigel da Bio-Rad. A solução tampão para transferência foi mantida em voltagem constante de 120 volts por 2 h, sob refrigeração contínua em gelo. As membranas de nitrocelulose, contendo as proteínas transferidas, foram

incubadas em solução bloqueadora por 2 h, à temperatura ambiente, para diminuir a ligação inespecífica de proteínas. A seguir, as membranas foram lavadas com solução basal por 3 sessões de 5 min e incubadas com os anticorpos específicos. Após a incubação, as membranas foram mantidas sob agitação constante durante 10 h a 4 °C e, em seguida, lavadas novamente com solução basal por 3 sessões de 5 min. Posteriormente, as membranas foram incubadas por 2 h em solução com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase e, então, lavadas 3 vezes por 5 min cada. Às membranas adicionou-se 1 mL de cada reagente do *kit* de quimioluminescência. As membranas foram então expostas ao filme de RX (Kodak XAR - Rochester, NY), com intensificador (Cronex Lightning Plus - DuPont, Wilmington, DE) em cassete por 5 min, revelado de forma convencional. A intensidade das bandas foi determinada por meio da leitura das autorradiografias reveladas por densitometria óptica, utilizando um *scanner* (HP 3400) e o programa *Scion Image V. Alpha 4.0.3.2*. (Scion Corporation). Foram analisadas as proteínas IL-1 β e TNF- α (BIOL-503505 e BIOL-506101 mouse & rat monoclonal), respectivamente.

4.15. Análise estatística

Os resultados foram expressos em média e erro padrão. Os grupos experimentais foram comparados por análise de variância (ANOVA *One-Way*) seguido do teste de *Newman-Keuls* para dados paramétricos ou por *Kruskal-Wallis* para dados não paramétricos. As correlações foram calculadas usando o teste de Spearman. Foi considerado o nível de significância inferior a 5% para

todas as análises. A avaliação dos dados foi feita no programa *GraphPad Prism* 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização da gordura

Para investigar o efeito específico da gordura interesterificada, todas as dietas foram preparadas com quantidade similar de ácidos graxos monoinsaturados para evitar possíveis fatores de confusão. Desta forma, a variação mais relevante esteve entre os ácidos graxos de interesse, cujos valores permaneceram em torno de 40%. É importante destacar que a composição das gorduras antes e após o processo de interesterificação não foi alterada, conforme demonstrado na Tabela 1.

Os resultados mostram que o processo de interesterificação da gordura contendo ácido palmítico alterou a posição dos ácidos graxos na molécula de glicerol, de modo que houve aumento de 80% na quantidade de ácidos graxos saturados e redução de 42% e 46% na quantidade de ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados, respectivamente, na posição *sn*-2. Os cromatogramas obtidos por ressonância nuclear magnética dos óleos utilizados no estudo estão representados nos Anexos II e III.

A gordura PALM possuía 65,1% de monoinsaturados e 9,7% de saturados na posição *sn*-2 do triglicéride e, após o processo de interesterificação, observou-se um percentual de 37,5% e 49% para os respectivos ácidos graxos nessa posição (**Tabela 1**).

Tabela 1. Composição das gorduras utilizadas no preparo das dietas (g/100 g gordura) e distribuição regioespecífica dos ácidos graxos nas posições sn-2 e sn-1,3 da molécula do glicerol (%)^{1, 2}

Ácidos graxos	POLI	TRANS	PALM	PALM INTER	ESTEAR	ESTEAR INTER
Láurico C12:0	0	0,04	0,06	0,07	0,24	0,22
Mirístico C14:0	0,07	0,11	0,11	0,08	0,92	0,95
Palmítico C16:0	5,49	11,09	5,82	5,02	40,00	40,82
Esteárico C18:0	3,17	6,94	39,72	40,47	5,06	4,60
Elaídico C18:1t	0,05	34,28	0,26	0,07	0,22	0,08
Oleico C18:1	39,94	39,56	40,35	40,38	39,89	39,68
Linoelaídico C18:2t	0,25	2,66	0,27	0,12	0,72	0,39
Linoleico C18:2	45,55	3,63	9,79	10,16	11,33	11,70
Linolênico C18:3	3,12	0,09	0,88	1,26	0,30	0,41
Araquídico C20:0	0,47	0,47	1,05	1,06	0,43	0,39
Eicosenoico C20:1	0,72	0,23	0,46	0,34	0,29	0,22
Docosanoico C22:0	0,68	0,55	0,71	0,68	0,11	0,10
Total SAT	9,88	19,2	47,47	47,38	46,76	47,08
Total MONO	40,66	39,79	40,81	40,72	40,18	39,9
Total POLI	48,67	3,72	10,67	11,42	11,63	12,11
Total TRANS	0,44	36,94	0,73	0,25	1,04	0,55
Ácidos graxos (posição)						
SAT (sn-1,3)			67,7	50,4	56,2	48,9
SAT (sn-2)			9,7	49,0	47,3	45,3
MONO (sn-1,3)			25,2	37,0	34,2	40,2
MONO (sn-2)			65,1	37,5	36,8	41,4
POLI (sn-1,3)			7,1	12,7	9,6	10,9
POLI (sn-2)			25,2	13,5	15,9	15,4

¹Teores de ácidos graxos obtidos estão apresentados em % de área e representam a média de três determinações.

²Fontes das gorduras: POLI (60% óleo girassol, 40% óleo de canola); TRANS (100% óleo de soja hidrogenado); PALM e PALM INTER (95% óleo de palma, 4% óleo de soja, 1% óleo de canola); ESTEAR e ESTEAR INTER (42% óleo de canola totalmente hidrogenada, 40,5% óleo de girassol rico em oleico; 2% óleo de soja).

Esses resultados estão de acordo com o observado por Sanders *et al.* (2011), os quais também utilizaram gordura contendo ácido palmítico antes e após o processo de interesterificação. Os autores observaram que antes da interesterificação, 69,1% do ácido oleico e 9,2% do palmítico estavam na posição *sn*-2 do triglicéride, percentuais que foram alterados para 43% de oleico e 39,1% de palmítico após o processo de interesterificação. No caso da gordura rica em ácido esteárico, partiu-se de uma gordura com elevada quantidade de ácidos graxos saturados na posição *sn*-2 em decorrência da hidrogenação total do óleo vegetal. Desta forma, não se verificou aumento na quantidade de ácidos graxos saturados na posição *sn*-2 do triglicéride após o processo de interesterificação.

5.2. Ganho de peso e consumo alimentar dos animais

Apesar do peso médio inicial e consumo alimentar dos animais não diferir entre os grupos, durante as 16 semanas, os animais do grupo PALM INTER apresentaram maior ganho de peso quando comparado aos grupos ESTEAR, ESTEAR INTER e TRANS (**Tabela 2**).

5.3. Análises bioquímicas e perfil de lipoproteínas

As concentrações plasmáticas de colesterol (CT) e triglicérides (TG) foram significativamente maiores nos camundongos que consumiram a dieta TRANS em relação aos demais grupos experimentais (**Tabela 2**). Os grupos que consumiram dietas contendo ácido palmítico apresentaram maiores concentrações de colesterol total e triglicérides quando comparados a POLI,

embora em menor magnitude que a gordura TRANS. Por outro lado, as gorduras contendo ácido esteárico não aumentaram as concentrações plasmáticas de lípides quando comparadas a POLI.

Interessante observar que as concentrações plasmáticas de colesterol entre os grupos PALM vs PALM INTER (499 ± 23 vs 527 ± 21 , $p > 0,05$) e ESTEAR vs ESTEAR INTER (343 ± 22 vs 364 ± 23 , $p > 0,05$) demonstram que o processo de interesterificação não altera as concentrações plasmáticas de lípides. Entretanto, a análise do perfil de lipoproteínas demonstrou que, embora a gordura interesterificada contendo ácido palmítico não tenha aumentado as concentrações plasmáticas de colesterol na mesma magnitude que a gordura TRANS, a concentração de colesterol na LDL foi semelhante entre esses grupos (266 ± 17 vs 254 ± 7 , $p > 0,05$), os quais foram maiores que os valores encontrados para POLI, PALM, ESTEAR e ESTEAR INTER. Já o conteúdo de triglicérides das LDL e de colesterol nas partículas de VLDL foram maiores no grupo TRANS em relação aos demais grupos (**Tabela 2, Figura 7**).

Tabela 2. Concentração de colesterol e triglicérides no plasma e nas frações de lipoproteínas em camundongos LDLr-KO submetidos às diferentes dietas experimentais por 16 semanas^{1,2}

	<i>POLI</i>	<i>TRANS</i>	<i>PALM</i>	<i>PALM INTER</i>	<i>ESTEAR</i>	<i>ESTEAR INTER</i>
Consumo (g/d/animal)	2,9 ± 0,1 ^a	2,9 ± 0,1 ^a	3,1 ± 0,3 ^a	3,2 ± 0,2 ^a	3,5 ± 0,2 ^a	3,3 ± 0,1 ^a
Ganho de peso (g)	16,0 ± 0,8 ^{ab}	13,9 ± 0,8 ^a	16,1 ± 0,8 ^{ab}	18,1 ± 1,0 ^b	14,2 ± 0,7 ^a	14,3 ± 0,7 ^a
CT (mg/dL)	321 ± 13 ^a	669 ± 20 ^b	499 ± 23 ^c	527 ± 21 ^c	343 ± 22 ^a	364 ± 23 ^a
VLDL-C (mg/dL)	60 ± 7 ^a	363 ± 18 ^b	176 ± 20 ^c	175 ± 17 ^c	108 ± 18 ^{ad}	121 ± 15 ^d
LDL-C (mg/dL)	157 ± 10 ^a	266 ± 17 ^b	219 ± 10 ^c	254 ± 7 ^b	145 ± 9 ^a	175 ± 15 ^a
HDL-C (mg/dL)	90 ± 7 ^a	40 ± 5 ^b	91 ± 8 ^a	93 ± 7 ^a	91 ± 5 ^a	80 ± 6 ^a
TG (mg/dL)	130 ± 12 ^a	541 ± 67 ^b	309 ± 49 ^{bc}	303 ± 33 ^{bc}	239 ± 28 ^{ac}	237 ± 27 ^{ac}
VLDL-TG (mg/dL)	89 ± 12 ^a	481 ± 60 ^b	209 ± 39 ^{ac}	214 ± 28 ^{bc}	146 ± 19 ^{ac}	163 ± 21 ^{ac}
LDL-TG (mg/dL)	32 ± 3 ^a	141 ± 20 ^b	48 ± 7 ^a	70 ± 11 ^a	66 ± 12 ^a	57 ± 9 ^a
HDL-TG (mg/dL)	18 ± 3 ^a	24 ± 5 ^a	20 ± 4 ^a	13 ± 2 ^a	15 ± 3 ^a	14 ± 2 ^a

¹ Dados apresentados em média±EP (n=13–17). Médias em uma coluna com letras diferentes (p<0,05). A análise estatística para os dados que passaram no teste de normalidade foi feita usando *One-way ANOVA* seguida do pós teste *de Newman-Keuls*. VLDL-c, TG, VLDL-TG, LDL-TG, HDL-TG foram analisados pelo teste não paramétrico seguida pelo pós teste de *Dunn*.

² A distribuição de colesterol total (CT) e triglicérides (TG) nas lipoproteínas foi calculada como área sob a curva dos picos obtidos nos perfis cromatográficos em gel de filtração de amostras individuais de plasma e convertidos em números absolutos.

Figura 7. Perfil de lipoproteínas plasmáticas. As frações de lipoproteínas foram isoladas do plasma dos camundongos LDLr-KO alimentados com dietas hiperlipídicas contendo ácidos graxos poli-insaturados (A), ácidos graxos trans (B), gordura rica em ácido palmítico (C), gordura rica em ácido palmítico interesterificado (D), gordura rica em ácido esteárico (E) e gordura rica em ácido esteárico interesterificado (F) por 16 semanas (n=13-17). Camundongos alimentados com as dietas contendo PALM INTER e TRANS apresentaram maior enriquecimento de colesterol nas partículas de LDL. Linhas cheias indicam concentração de colesterol total (CT) e linhas pontilhadas indicam concentração de triglicérides (TG).

Conforme esperado, verificou-se neste trabalho que o grupo que consumiu a dieta TRANS apresentou menor concentração de colesterol na HDL quando comparado aos demais grupos experimentais (**Tabela 2, Figura 7**). O conteúdo de triglicérides nessa partícula foi semelhante entre os grupos de estudo. Assim como verificado para as concentrações de colesterol e triglicérides plasmáticos, o processo de interesterificação não alterou o acúmulo de triglicérides nas lipoproteínas VLDL, LDL e HDL (**Tabela 2**).

5.4. Determinação da área de lesão aterosclerótica

Condizente com os dados de lípides plasmáticos e do perfil de lipoproteínas, o consumo de dieta TRANS induziu severo acúmulo de lípidos nas artérias dos animais quando comparado aos demais grupos (**Figuras 8 e 9**).

Com relação ao processo de interesterificação, verificou-se que PALM INTER obteve maior conteúdo de lípidos na artéria com relação à PALM ($p < 0,01$) (**Figuras 8 e 9**). Não houve diferença para este parâmetro entre ESTEAR e ESTEAR INTER ($p > 0,05$), mas é importante ressaltar que todos os grupos mencionados desenvolveram lesão aterosclerótica significativamente maior quando comparados a POLI.

Figura 8. Fotomicrografias de aortas. Fotomicrografias de aortas isoladas dos camundongos LDLr-KO alimentados com dietas hiperlipídicas contendo ácidos graxos poli-insaturados (POLI), ácidos graxos trans (TRANS), gordura rica em ácido palmítico (PALM), gordura rica em ácido palmítico interesterificado (PALM INTER), gordura rica em ácido esteárico (ESTEAR) e gordura rica em ácido esteárico interesterificado (ESTEAR INTER). Cortes histológicos foram marcados com *Oil Red O* para determinação do conteúdo de lípidos neutros, *Picrosirius Red* para determinação do conteúdo de colágeno e marcados com anticorpo anti-CD68 para determinação do infiltrado de macrófagos. Fotomicrografias de *Oil Red O* e CD68 estão em aumento de 5x e *Picrosirius red* sob aumento de 20x.

Figura 9. Gorduras interesterificadas e desenvolvimento da aterosclerose. A lesão aterosclerótica foi determinada em aortas isoladas dos camundongos LDLr-KO alimentados com dietas hiperlipídicas contendo ácidos graxos poli-insaturados (POLI), ácidos graxos trans (TRANS), gordura rica em ácido palmítico (PALM), gordura rica em ácido palmítico interesterificado (PALM INTER), gordura rica em ácido esteárico (ESTEAR) e gordura rica em ácido esteárico interesterificado (ESTEAR INTER). Cortes histológicos foram analisados para conteúdo de lípidos (*Oil Red O*), infiltrado de macrófago (anticorpo anti-CD68) e conteúdo de colágeno (*Picrosirius Red*). Dados foram avaliados quanto a normalidade e foi realizada transformação logarítmica para *Oil Red O* e CD68 antes da análise estatística. *One-way ANOVA* seguido pelo pós teste de *Newman-keuls* foi utilizada para comparação dos grupos. Significância estatística entre os grupos está representada por diferentes letras. Dados apresentados em média $\pm$ erro padrão (n=9-13).

Observou-se correlação positiva entre o infiltrado de macrófagos e o conteúdo de colesterol plasmático ($r=0,69$; $p<0,0001$, **Figura 10**) e a área da lesão ($r=0,94$, $p<0,0001$, **Figura 11**), o que reafirma a importância do conteúdo lipídico e da inflamação no desenvolvimento da aterosclerose.

Desta forma, verificou-se que os animais que consumiram a dieta enriquecida com PALM INTER também apresentaram maior infiltrado de macrófagos na parede arterial em comparação aos demais grupos, com exceção de TRANS, o qual já se esperava encontrar maior infiltrado dessas células (**Figuras 8 e 9**).

Portanto, o processo de interesterificação favoreceu o recrutamento e a infiltração de células inflamatórias, conforme pode ser verificado entre os grupos PALM e PALM INTER ($p<0,001$), resultado não observado com a interesterificação do ácido esteárico ($p>0,05$) (**Figuras 8 e 9**). Também como era de se esperar, o grupo POLI diferiu dos demais grupos, apresentando menor infiltrado de macrófagos. Esses resultados reafirmam que a progressão da doença aterosclerótica foi maior no grupo TRANS, seguido pelo grupo PALM INTER quando comparados a PALM, ESTEAR, ESTEAR INTER e POLI, dados confirmados pela maior presença de colágeno no grupo TRANS, seguido pelo grupo PALM INTER (**Figuras 8 e 9**).

O grupo PALM também apresentou uma capa fibrosa maior com relação aos grupos POLI, ESTEAR e ESTEAR INTER uma vez que apresentaram maior lesão quando comparado a tais grupos.

Figura 10. Correlações com concentração plasmática de colesterol. Concentração plasmática de colesterol total e área de macrófago (A), área de lesão (B), conteúdo de colágeno (C), conteúdo de colesterol na LDL (D) e concentração plasmática de triglicérides (E).

Figura 11. Correlações com área de lesão. Área de lesão aterosclerótica e área de macrófago (A), conteúdo de colágeno (B), concentrações plasmáticas de colesterol total (C) e triglicérides (D) e conteúdo de colesterol na LDL (E).

5.5. Determinação da secreção de citocinas em macrófagos peritoneais

Os macrófagos do peritônio de camundongos alimentados com a dieta PALM INTER secretaram significativamente mais IL-1 β , IL-6 e MCP-1 quando comparado aos demais grupos. Por outro lado, a gordura TRANS não induziu aumento da secreção das citocinas inflamatórias, não diferindo dos grupos POLI, PALM, ESTEAR e ESTEAR INTER (**Figura 12**). Não foi verificada diferença entre os grupos com relação à secreção das citocinas IL-10 e TNF- α .

5.6. Determinação dos transcritos (mRNA) de citocinas em artérias abdominais

Como a resposta primária dos ácidos graxos em macrófagos peritoneais podem não assegurar que a mesma seja observada em macrófagos infiltrados na parede arterial, foi avaliada a expressão de citocinas na aorta abdominal. Conforme observado para a secreção de citocinas em macrófagos peritoneais estimulados com LPS, PALM INTER apresentou a maior expressão de *Il1 β* . Por outro lado, TRANS apresentou a maior expressão de *Ccl2* (MCP-1) e *Tnf*. Contudo, não houve diferença na expressão das interleucinas-6 (*Il6*) e -10 (*Il10*) entre os grupos (**Figura 13**).

Figura 12. Gorduras interesterificadas e resposta inflamatória em macrófagos. Macrófagos peritoneais foram isolados dos camundongos LDLr-KO alimentados com dietas hiperlipídicas contendo ácidos graxos poli-insaturados (POLI), ácidos graxos trans (TRANS), gordura rica em ácido palmítico (PALM), gordura rica em ácido palmítico interesterificado (PALM INTER), gordura rica em ácido esteárico (ESTEAR) e gordura rica em ácido esteárico interesterificado (ESTEAR INTER) por 16 semanas. Células ($0,5 \times 10^6$ /well) foram estimuladas por 24 h com 1 μ g/mL de lipopolissacarídeo (LPS) de *E. Coli* em meio de cultura contendo albumina bovina isenta em ácidos graxos. Citocinas inflamatórias IL-1 β (A), IL-6 (B), MCP-1 (C), TNF α (D) e anti-inflamatória IL-10 (E) liberadas no meio de cultura foram mensuradas utilizando o kit comercial MULTIPLEX. Dados foram avaliados quanto à normalidade e foi realizada a transformação logarítmica para TNF α e IL-10 antes da análise estatística. *One-way ANOVA* seguido do pós teste de *Newman-keuls* foi utilizado para comparação entre os grupos. Significância estatística representada por letras diferentes ($p < 0,05$). Dados apresentados em média $\pm$ erro padrão ($n=6-10$).

Figura 13. Influência das gorduras interesterificadas sobre os transcritos (mRNA) de citocinas em artérias. Aortas abdominais foram dissecadas dos camundongos LDLr-KO alimentados com dietas hiperlipídicas contendo ácidos graxos poli-insaturados (POLI), ácidos graxos trans (TRANS), gordura rica em ácido palmítico (PALM), gordura rica em ácido palmítico interesterificado (PALM INTER), gordura rica em ácido esteárico (ESTEAR) e gordura rica em ácido esteárico interesterificado (ESTEAR INTER) por 16 semanas. Os resultados foram normalizados para o valor de expressão das artérias de camundongos alimentados com dieta contendo 7% das calorias sob forma de gordura. Dados foram avaliados quanto à normalidade e a comparação entre os grupos foi realizada utilizando-se *One-way ANOVA* seguido do pós teste de *Newman-Keuls*. Significância estatística representada por letras diferentes ($p < 0,05$). Dados apresentados em média $\pm$ erro padrão ($n=4-7$).

5.7. Determinação do conteúdo proteico de citocinas em artérias abdominais

Embora PALM INTER tenha induzido menor TNF α mRNA quando comparado a TRANS, o conteúdo proteico foi similar (**Figura 14**, $p>0,05$), indicando uma regulação pós-transcricional. Além disso, o conteúdo proteico de IL-1 β no grupo PALM INTER também foi similar a TRANS (**Figura 14**, $p>0,05$) e maior que o grupo PALM, confirmando que o processo de interesterificação também induz resposta inflamatória no tecido arterial. O alto conteúdo proteico de IL-1 β também foi observado para os grupos ESTEAR e ESTEAR INTER (**Figura 14**).

Figura 14. Expressão de TNF- α e IL1 β na aorta. Aortas abdominais foram isoladas dos camundongos LDLr-KO alimentados com dietas hiperlipídicas contendo ácidos graxos poli-insaturados (POLI), ácidos graxos trans (TRANS), gordura rica em ácido palmítico (PALM), gordura rica em ácido palmítico interesterificado (PALM INTER), gordura rica em ácido esteárico (ESTEAR) e gordura rica em ácido esteárico interesterificado (ESTEAR INTER) por 16 semanas. As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida e transferidas para membranas de nitrocelulose, as quais foram incubadas com anticorpo anti-IL-1 β , anti-TNF- α e anti- α -tubulina. A α -tubulina foi utilizada como controle endógeno para normalização dos dados. Dados foram avaliados quanto à normalidade e a comparação dos grupos foi realizada utilizando-se One-way ANOVA seguido do pós teste de *Newman-Keuls*. Significância estatística representada por letras diferentes ($p < 0,05$). Dados apresentados em média $\pm$ erro padrão ($n=4$).

5.8. Gorduras interesterificadas e efluxo celular de colesterol

Para melhor elucidar o mecanismo pelo qual a alteração do ácido palmítico na posição 2 do triglicérides induziu o desenvolvimento de aterosclerose, foi realizado o ensaio de efluxo celular de colesterol em macrófagos peritoneais de camundongos alimentados com dieta rica hiperlipídica contendo as gorduras PALM ou PALM INTER. Uma redução importante do efluxo celular de colesterol para os aceptores extracelulares apo-AI ($5,29 \pm 0,70$ vs $2,75 \pm 0,30$, $p < 0,008$) e HDL₂ ($14,23 \pm 1,74$ vs $8,05 \pm 1,41$, $p < 0,020$) foi observada para PALM INTER quando comparado ao grupo PALM (**Figura 15**). Para verificar se o prejuízo na remoção de colesterol celular também ocorria na parede arterial, foram determinadas as expressões dos receptores envolvidos tanto na captação de LDL modificada (*Olr1*), quanto na remoção intracelular de colesterol (*Nr1h3* e *Abca1*). Novamente, animais alimentados com PALM INTER apresentaram maior expressão de *Olr1* ($4,35 \pm 0,53$ vs $2,14 \pm 0,61$, $p = 0,028$) e redução na expressão de *Nr1h3* ($0,48 \pm 0,07$ vs $0,67 \pm 0,05$, $p = 0,048$) e *Abca1* ($1,19 \pm 0,16$ vs $2,06 \pm 0,30$, $p = 0,016$) (**Figura 16**).

Figura 15. Gorduras interesterificadas e efluxo de colesterol mediado pela apo-AI e HDL2. Macrófagos peritoneais foram isolados dos camundongos LDLr-KO alimentados com dietas hiperlipídicas contendo gordura rica em ácido palmítico (PALM) e gordura rica em ácido palmítico interesterificado (PALM INTER) por 16 semanas. Células ($0,25 \times 10^6/\text{well}$) foram incubadas com LDL acetilada ($50 \mu\text{g/mL}$) e ^{14}C -colesterol ($0,5 \mu\text{Ci/mL}$) por 30 h e, em seguida, incubadas por 8 h com apo A-I ($30 \mu\text{g/mL}$) ou HDL₂ ($50 \mu\text{g/mL}$). A porcentagem de efluxo foi calculada pela divisão da radioatividade do meio com a radioatividade total multiplicada por 100. Dados foram avaliados quanto à normalidade e a comparação dos grupos foi realizada utilizando-se teste t de *Student*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Dados apresentados em média $\pm$ erro padrão ($n=6-10$).

Figura 16. Determinação de transcritos (mRNA) para *Nr1h3*, *Abca1*, *Abcg1*, *Olr1* e *Cd36* na aorta. Aortas abdominais foram dissecadas dos camundongos LDLr-KO alimentados com dietas hiperlipídicas contendo gordura rica em ácido palmítico (PALM) e gordura rica em ácido palmítico interesterificado (PALM INTER) por 16 semanas. Os resultados foram normalizados para o valor de expressão das artérias de camundongos alimentados com dieta contendo 7% das calorias sob forma de gordura. Dados foram avaliados quanto à normalidade e a comparação dos grupos foi realizada utilizando-se teste t de *Student*. * $p < 0,05$. Dados apresentados em média $\pm$ erro padrão ($n=6-10$).

6. DISCUSSÃO

Este estudo mostra, pela primeira vez, os mecanismos pelos quais as gorduras interesterificadas produzidas com ácido palmítico induzem o desenvolvimento da placa aterosclerótica, podendo aumentar o risco cardiovascular. De fato, o grupo PALM INTER apresentou maior lesão aterosclerótica em comparação a PALM (**Figuras 8 e 9**), indicando que o enriquecimento de ácido graxo saturado na posição *sn*-2 do triglicéride aumenta o potencial aterogênico já atribuído ao ácido palmítico (Jiang *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2012; Ishiyama *et al.*, 2010). Estudo anterior já havia demonstrado em coelhos maior aterogenicidade dos ácidos graxos saturados na posição *sn*-2 (Kritchevsky *et al.*, 1998a), contudo, as possíveis vias envolvidas não foram avaliadas.

A maior lesão aterosclerótica observada no grupo PALM INTER em relação à PALM não pode ser atribuída a alterações na concentração plasmática de colesterol, uma vez que o processo de interesterificação não influenciou os lípides plasmáticos (colesterol e triglicérides), conforme demonstrado também com as gorduras contendo ácido esteárico (**Tabela 2**). Estudos conduzidos em animais e em humanos nos quais se utilizou gorduras interesterificadas de diversas fontes lipídicas (Nestel *et al.*, 1995; Meijer e Weststrate, 1997; Kritchevsky *et al.*, 2000) apresentaram os mesmos resultados.

Apesar de não ter provocado alteração nos lípides plasmáticos, o processo de interesterificação da gordura contendo ácido palmítico induziu o

enriquecimento das partículas de LDL em colesterol (**Tabela 3**), condição que pode parcialmente justificar o maior desenvolvimento de placa observado nos animais deste grupo. Interessante observar que as LDL de animais que consumiram tanto a dieta rica em gordura PALM INTER quanto TRANS possuíam capacidade semelhante de carrear colesterol aos tecidos periféricos.

Como era esperado, os animais que consumiram dieta TRANS apresentaram a maior concentração plasmática de colesterol em relação aos demais grupos, culminando em desenvolvimento de severa lesão aterosclerótica (**Figuras 8 e 9**). Este aumento das concentrações plasmáticas de colesterol total e triglicérides pode ser atribuído à maior síntese e secreção de apoB, bem como à ativação de vias lipogênicas no fígado (Bassett *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2010). Uma meta-análise envolvendo 38 estudos clínicos controlados demonstrou que o consumo de ácidos graxos *trans* estava associado ao aumento das concentrações plasmáticas de LDL e, além disso, tinha um efeito adverso adicional por reduzir as concentrações plasmáticas de HDL (Mensink *et al.*, 2003). No presente trabalho, verificou-se também que o grupo que consumiu a dieta *trans* apresentou menor concentração de colesterol na HDL quando comparado aos demais grupos experimentais, o que sugere sua menor capacidade de remover colesterol de tecidos periféricos (**Tabela 2, Figura 7**). Corroborando esses dados, estudos têm demonstrado a ação dos ácidos graxos *trans* sobre o aumento do catabolismo de apo-AI e a redução do efluxo celular de colesterol, fatores que poderiam contribuir para a maior formação de lesão aterosclerótica (Matthan *et al.*, 2004; Fournier *et al.*, 2012).

Com relação à dieta enriquecida com ácidos graxos poli-insaturados (POLI), observou-se menor concentração plasmática de colesterol e triglicérides em relação a TRANS, PALM e PALM INTER (**Tabela 2**), o que resultou em menor formação de lesão aterosclerótica (**Figuras 8 e 9**). Entretanto, os animais dos grupos ESTEAR e ESTEAR INTER não apresentaram aumento nas concentrações de lípides plasmáticos quando comparados a POLI (**Tabela 2**). Realmente, dietas contendo ácido palmítico aumentam as concentrações plasmáticas de colesterol quando comparadas às dietas contendo ácidos graxos poli-insaturados, efeito não verificado para as gorduras contendo ácido esteárico (Bonanome e Grundy, 1988; Kris-Etherton e Yu, 1997). O ácido esteárico não eleva a colesterolemia em razão de ser rapidamente dessaturado a ácido oleico (C18:1) pela enzima esteroil-CoA-dessaturase (SCD1) no fígado (Bennett *et al.*, 1995). O ácido oleico é utilizado como substrato pela enzima acil-CoA-colesterol aciltransferase (ACAT) para esterificação do colesterol, reduzindo o conteúdo de colesterol livre e proporcionando aumento da síntese de receptores do tipo B/E (Yu-Poth *et al.* 2005).

Assim como observado nos lípides plasmáticos e no perfil de lipoproteínas, os grupos ESTEAR e ESTEAR INTER não apresentaram diferença com relação ao acúmulo de lípides na artéria ($p>0,05$) (**Figuras 8 e 9**). Ao utilizar gordura rica em ácido esteárico antes e após a randomização, Kritchevsky *et al.* (1998a) também não observaram diferença na formação de lesões em aortas de coelhos. Entretanto, é importante ressaltar que ambos os grupos formaram lesão aterosclerótica significativamente maior em

comparação ao grupo POLI, fator que não pode ser explicado pela colesterolemia. Entretanto, não apenas o conteúdo de lípides, mas também a inflamação exerce papel fundamental sobre os mecanismos que embasam a aterosclerose (Bjorkbacka *et al.*, 2004; Michelsen *et al.*, 2004; Willerson e Ridker, 2004; Madan e Amar, 2008). De fato, verificou-se que os animais alimentados com dieta enriquecida com PALM INTER também apresentaram maior infiltrado de macrófagos na parede arterial em relação aos demais grupos, exceto quando comparados com o grupo TRANS. Portanto, o processo de interesterificação favoreceu o recrutamento e a infiltração de células inflamatórias, conforme pode ser verificado entre os grupos PALM e PALM INTER ($p < 0,001$), resultado não observado com a interesterificação com o ácido esteárico ($p > 0,05$) (**Figuras 8 e 9**). Conforme esperado, POLI diferiu dos demais grupos, apresentando menor infiltrado de macrófagos. Desta forma, verifica-se uma correlação positiva entre o infiltrado de macrófagos e a área da lesão ($r = 0,94$, $p < 0,0001$, **Figura 11**).

Diante desses resultados, buscou-se avaliar o efeito das gorduras testadas sobre a modulação de genes envolvidos no processo inflamatório, em razão de sua relevância no desenvolvimento da aterosclerose. Como um primeiro indicador, foram dosadas as citocinas secretadas por macrófagos retirados do peritônio dos camundongos e estimulados com LPS. O enriquecimento de ácido palmítico na posição *sn*-2 do triglicéride favoreceu um insulto inflamatório mais potente, conforme evidenciado pelo aumento da secreção de IL-6, IL-1 β e MCP-1 quando comparado a PALM (**Figura 12**). O aumento de MCP-1 no grupo PALM INTER pode explicar parcialmente sua

maior área de lesão em comparação a PALM, uma vez que essa citocina está envolvida com o recrutamento e a infiltração de macrófagos no espaço subendotelial (Boring *et al.*, 1998). O concomitante aumento de IL-1 β e MCP-1 observado com PALM INTER evidencia o seu importante papel no desenvolvimento da placa aterosclerótica, já que estudos anteriores demonstraram que animais com ablação gênica para IL-1 β (Kirii *et al.*, 2003) e para o receptor de MCP-1 (Boring *et al.*, 1998) apresentaram redução significativa na formação da lesão (Boring *et al.*, 1998).

Como esperado, POLI apresentou concentrações de citocinas bastante elevadas com relação aos demais grupos experimentais que consumiram as dietas ricas em gordura saturada, em razão da alta concentração de ácidos graxos da série ω -6 presentes na dieta (Machado *et al.*, 2012). A capacidade pró-inflamatória do ω -6 já está bem estabelecida, uma vez que o ácido araquidônico é substrato para síntese de prostaglandinas, tromboxanas e leucotrienos da série par, os quais são fortes indutores de agregação plaquetária, vasoconstrição e inflamação (Simopoulos, 1999). Apesar de ter induzido perfil inflamatório tanto em macrófagos (**Figura 12**) quanto na aorta (**Figura 14**), POLI desenvolveu menor lesão aterosclerótica, resultado que reforça a hipótese lipídica de Steinberg (2006), a qual credita ao colesterol a sua preponderância no desenvolvimento da placa aterosclerótica.

Com relação ao grupo TRANS, não foi observado aumento da secreção das citocinas inflamatórias, efeito contrário ao observado em outro estudo realizado no mesmo modelo animal (Machado *et al.*, 2012). Embora nas duas investigações a quantidade de *trans* na dieta tenha sido semelhante, esse

resultado contraditório decorreu pelo fato de Machado e colaboradores (2012) terem utilizado gordura com maior percentual de ácidos graxos saturados, os quais sabidamente estimulam vias de sinalização inflamatórias, como aquelas mediadas pelo receptor do tipo Toll 4 (TLR4) (Lee *et al.*, 2001). Corroborando nossos resultados, estudo clínico conduzido em 61 adultos saudáveis mostrou que o consumo de ácido graxo *trans* não alterou a expressão de marcadores inflamatórios, tais como IL-6, proteína C reativa e MCP-1, quando comparado ao consumo de ácido oleico (Smit *et al.*, 2011).

Considerando que as alterações inflamatórias em macrófagos não necessariamente refletem a resposta inflamatória na parede arterial, já que outros componentes celulares, tais como linfócitos, neutrófilos, células musculares lisas e endoteliais, também estão envolvidos nesse processo, foram determinados a expressão e o conteúdo proteico de citocinas na aorta de camundongos, conforme protocolo validado em outros estudos (Dinarelli, 2009; Hansson e Hermansson, 2011). De fato, apesar do PALM INTER apresentar maior expressão de TNF- α na aorta abdominal, este resultado não se reproduziu no macrófago peritoneal, um dado também observado no grupo TRANS. Entretanto, é importante destacar que o enriquecimento de ácido palmítico na posição 2 dos triglicérides foi mais prejudicial quando comparado a sua forma nativa, já que os transcritos e o conteúdo proteico de IL-1 β (**Figuras 13 e 14**), bem como o conteúdo proteico de TNF α (**Figura 14**), foram maiores no PALM INTER quando comparado a PALM. Interessante observar que, na aorta, o insulto inflamatório promovido pelo PALM INTER foi similar a TRANS (**Figura 13**). As gorduras contendo ácido esteárico não induziram a expressão

de TNF- α , mas parecem exercer efeito importante com relação à IL-1 β . Desta forma, embora o ácido esteárico não tenha aumentado as concentrações plasmáticas de colesterol, a maior formação da lesão aterosclerótica observada nesses grupos com relação a POLI pode ser decorrente da ativação de vias inflamatórias.

Esses resultados indicam que o processo de interesterificação da gordura contendo ácido palmítico favorece a formação da lesão não apenas pelo maior acúmulo de colesterol na partícula de LDL, mas também pelo estímulo de vias de sinalização inflamatórias.

Embora TRANS não tenha induzido resposta inflamatória em macrófagos peritoneais, este ácido graxo suscitou severa lesão aterosclerótica, o que pode ser atribuído principalmente às concentrações plasmáticas de lípidos, modificação da composição de lipoproteínas e indução do processo inflamatório local. Não houve diferença no desenvolvimento da aterosclerose entre os grupos ESTEAR e ESTEAR INTER em razão de apresentarem perfis inflamatório e lipídico similares. Portanto, os efeitos deletérios do processo de interesterificação podem ser verificados apenas com relação ao ácido palmítico. É importante destacar que pouca quantidade de ácido esteárico está presente nos alimentos, e as consequências metabólicas do seu alto consumo em decorrência das gorduras interesterificadas são desconhecidas até o momento.

Como as principais diferenças sobre os parâmetros associados ao desenvolvimento da lesão aterosclerótica foram observadas entre os grupos PALM e PALM INTER, avaliou-se as vias pelas quais o enriquecimento de

ácido palmítico na posição *sn*-2 poderia aumentar o desenvolvimento da lesão aterosclerótica. A homeostase de lípidos em macrófagos é um fator determinante para a progressão da lesão aterosclerótica; por este motivo, foi investigado se PALM INTER apresentou maior lesão devido ao aumento na expressão de receptores envolvidos na captação de LDL modificada (*Cd36* e *Olr1*) ou ao prejuízo no transporte reverso de colesterol mediada pelo receptor nuclear LXR e seus transcritos, os transportadores *ATP-binding cassette* (*Abca1* e *Abcg1*).

De fato, os dados mostraram que o grupo PALM INTER apresentou aumento nos transcritos de *Olr1*, acompanhado da redução nas expressões de *Nr1h3* e *Abca1*. Estudo anterior conduzido em macrófagos THP-1 demonstrou que o ácido palmítico aumenta a captação de LDL via receptor *Olr1* (Ishiyama *et al.*, 2010). Entretanto, observamos que o enriquecimento de ácido palmítico na posição *sn*-2 dos triglicérides promove uma expressão ainda maior de *Olr1* (**Figura 16**), o que pode contribuir para o maior acúmulo de lípidos nos macrófagos, induzindo o processo inflamatório, conforme observado para o conteúdo proteico de IL-1 β e TNF- α na parede arterial. Portanto, a redução na expressão de *Abca1* observada no grupo PALM INTER pode ser uma consequência da ativação do processo inflamatório, já que outros estudos demonstraram que a inflamação prejudica o efluxo de colesterol mediado pelo ABCA1 (Okuda *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2013). Adicionalmente, observou-se que a atividade dos receptores ABCA-1 e ABCG-1 foi prejudicada, pois o grupo PALM INTER apresentou redução no efluxo de colesterol para apo-AI e HDL₂ (**Figura 15**). Esses transportadores estão envolvidos na primeira etapa do

transporte reverso de colesterol (RCT), um sistema antiaterogênico que promove a transferência do excesso de colesterol da parede arterial para o fígado, para posterior excreção na bile e nas fezes (Rader *et al.*, 2009).

Todas as importantes alterações observadas com PALM INTER podem ser atribuídas ao rearranjo aleatório de ácidos graxos na molécula do glicerol mediante o processo de interesterificação. De fato, as análises cromatográficas mostraram que as gorduras utilizadas no estudo mantiveram o mesmo percentual de ácidos graxos (**Tabela 1**) em comparação à gordura nativa. Entretanto, após o processo de interesterificação, um percentual muito elevado de ácidos graxos saturados foi realocado na posição *sn*-2 do glicerol (**Tabela 2**), a qual é normalmente ocupada por ácidos graxos insaturados nos óleos vegetais. No intestino, a lipase pancreática hidrolisa os ácidos graxos das posições *sn*-1 e *sn*-3 do triglicéride, preservando os ácidos graxos da posição *sn*-2, os quais são absorvidos mais eficientemente por estarem na forma de 2-monoacilglicerol, estrutura com característica anfipática (Tomarelli *et al.*, 1968; Filer, Mattson e Fomon, 1969; Mattson, Nolen e Webb, 1979; Carnielli *et al.*, 1995; Innis, Dyer e Nelson, 1994). Essa estrutura é precursora da síntese de triglicérides que serão incorporados aos quilomícrons (Berry, Miller e Sanders, 2007; Berry *et al.*, 2007). Esses triglicérides sofrem ação da enzima lipoproteína lipase, a qual se localiza no endotélio dos capilares e também é capaz de hidrolisar o ácido graxo nas posições *sn*-1 e *sn*-3. O ácido graxo livre será disponibilizado para armazenamento em tecido adiposo ou será utilizado como fonte energética no músculo. Portanto, o ácido graxo presente na posição *sn*-2, mantido no remanescente de quilomícron, será transportado

preferencialmente ao fígado em vez do tecido adiposo (Berry, 2009). No fígado, o acúmulo de ácidos graxos saturados induz lipogênese, resistência à insulina e processo inflamatório (Baer *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2005; Wang, Wei e Pagliassotti, 2006; Suganami *et al.*, 2007; Joshi-Barve *et al.*, 2007).

Além disso, um estudo recente demonstrou que lipoproteínas intestinais enriquecidas com ácidos graxos saturados induziram maior expressão de receptores de quilomícrons em monócitos da linhagem THP-1 e de cultura primária, favorecendo o desenvolvimento de células espumosas (Varela *et al.*, 2013). Esses dados são relevantes, pois reafirmam a hipótese de que o alto consumo de ácidos graxos saturados, especialmente na posição *sn*-2, aumenta a sua exposição a macrófagos, células endoteliais e células musculares lisas, potencializando seus efeitos deletérios sobre o risco cardiovascular.

Figura 17. Ação das gorduras interesterificadas no desenvolvimento da aterosclerose. Gorduras interesterificadas contendo ácido palmítico aumentam a capacidade física da LDL em transportar colesterol, possibilitando maior captação de colesterol na parede arterial. Ácidos graxos saturados e colesterol presentes na partícula de LDL induzem processos inflamatórios, o que favorece o recrutamento de monócitos via Ccl2. Essas células, uma vez diferenciadas, captam a LDL modificada por intermédio de receptores tal como Olr1, cuja expressão também foi aumentada mediante o consumo de dieta rica em gordura interesterificada. A maior captação de partículas de LDL modificada e a menor remoção intracelular de colesterol mediada pela redução na expressão do fator de transcrição LXR e seus genes alvo *Abca1* e *Abcg1* contribuem para o acúmulo de colesterol e ácido graxo saturado também nos macrófagos, contribuindo para a piora no quadro inflamatório.

7. CONCLUSÃO

A gordura interesterificada contendo ácido palmítico induz o desenvolvimento de aterosclerose por favorecer acúmulo de colesterol nas partículas de LDL e macrófagos, ativando o processo inflamatório em camundongos *knockout* para o receptor de LDL.

8. REFERÊNCIAS

- Ascherio A. Epidemiologic studies on dietary fats and coronary heart disease. *Am J Med.* 2002;113 Suppl 9B:9S-12S.
- Baer DJ, Judd JT, Clevidence BA, Tracy RP. Dietary fatty acids affect plasma markers of inflammation in healthy men fed controlled diets: a randomized crossover study. *Am J Clin Nutr.* 2004;79(6):969-73.
- Bassett CM, McCullough RS, Edel AL, Maddaford TG, Dibrov E, Blackwood DP, Austria JA, Pierce GN. Trans-fatty acids in the diet stimulate atherosclerosis. *Metabolism.* 2009;58(12):1802-8.
- Basu SK, Goldstein JL, Anderson GW, Brown MS. Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976; 73:3178– 3182.
- Bennett AJ, Billett MA, Salter AM, Mangiapane EH, Bruce JS, Anderton KL, Marenah CB, Lawson N, White DA. Modulation of hepatic apolipoprotein, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and low-density lipoprotein receptor mRNA and plasma lipoprotein concentrations by defined dietary fats. Comparison of trimyristin, tripalmitin, tristearin and triolein. *Biochem J.* 1995;311 (Pt1):167-73.
- Berry SE, Miller GJ, Sanders TA. The solid fat content of stearic acid-rich fats determines their postprandial effects. *Am J Clin Nutr.* 2007; 85(6): 1486-94.
- Berry SE, Woodward R, Yeoh C, Miller GJ, Sanders TA. Effect of interesterification of palmitic acid-rich triacylglycerol on postprandial lipid and factor VII response. *Lipids.* 2007; 42(4): 315-23.
- Berry SE. Triacylglycerol structure and interesterification of palmitic and stearic acid-rich fats: an overview and implications for cardiovascular disease. *Nutr Res Rev.* 2009; 22(1): 3-17.
- Björkbacka H, Kunjathoor VV, Moore KJ, Koehn S, Ordija CM, Lee MA, Means T, Halmen K, Luster AD, Golenbock DT, Freeman MW. Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nat Med.* 2004; 10(4): 416-21.
- Bonanome A, Grundy SM. Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. *N Engl J Med.* 1988; 318(19): 1244-8.

- Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*. 1998; 394(6696): 894-7.
- Brasil. Resolução RDC nº 360 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 23 dezembro 2003. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=9059>. Acesso em mar de 2010.
- Bryk D, Zapolska-Downar D, Malecki M, Hajdukiewicz K, Sitkiewicz D. Trans fatty acids induce a proinflammatory response in endothelial cells through ROS-dependent nuclear factor- κ B activation. *J Physiol Pharmacol*. 2011; 62(2): 229-38.
- Buonacorso V, Nakandakare ER, Nunes VS, Passarelli M, Quintão EC, Lottenberg AM. Macrophage cholesterol efflux elicited by human total plasma and by HDL subfractions is not affected by different types of dietary fatty acids. *Am J Clin Nutr*. 2007;86(5):1270-7.
- Carnielli VP, Luijendijk IH, van Goudoever JB, Sulkers EJ, Boerlage AA, Degenhart HJ, Sauer PJ. Feeding premature newborn infants palmitic acid in amounts and stereoisomeric position similar to that of human milk: effects on fat and mineral balance. *Am J Clin Nutr*. 1995; 61(5): 1037-42.
- Casaschi A, Maiyoh GK, Adeli K, Theriault AG. Increased diacylglycerol acyltransferase activity is associated with triglyceride accumulation in tissues of diet-induced insulin-resistant hyperlipidemic hamsters. *Metabolism*. 2005; 54(3): 403-9.
- Cassagno N, Palos-Pinto A, Costet P, Breilh D, Darmon M, Bérard AM. Low amounts of trans 18:1 fatty acids elevate plasma triacylglycerols but not cholesterol and alter the cellular defence to oxidative stress in mice. *Br J Nutr*. 2005; 94(3): 346-52.
- Cawood AL, Ding R, Napper FL, Young RH, Williams JA, Ward MJ, Gudmundsen O, Vige R, Payne SP, Ye S, Shearman CP, Gallagher PJ, Grimble RF, Calder PC. Eicosapentaenoic acid (EPA) from highly concentrated n-3 fatty acid ethyl esters is incorporated into advanced atherosclerotic plaques and higher plaque EPA is associated with decreased plaque inflammation and increased stability. *Atherosclerosis*. 2010; 212(1): 252-9.
- Daumerie CM, Woollett LA, Dietschy JM. Fatty acids regulate hepatic low density lipoprotein receptor activity through redistribution of intracellular cholesterol pools. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89(22): 10797-801.
- de Lima-Salgado TM, Alba-Loureiro TC, do Nascimento CS, Nunes MT, Curi R. Molecular mechanisms by which saturated fatty acids modulate TNF- α

- expression in mouse macrophage lineage. *Cell Biochem Biophys*. 2011; 59(2): 89-97.
- de Roos NM, Bots ML, Katan MB. Replacement of dietary saturated fatty acids by trans fatty acids lowers serum HDL cholesterol and impairs endothelial function in healthy men and women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(7):1233-7.
- Depner CM, Philbrick KA, Jump DB. Docosahexaenoic acid attenuates hepatic inflammation, oxidative stress, and fibrosis without decreasing hepatosteatosis in a Ldlr(-/-) mouse model of western diet-induced nonalcoholic steatohepatitis. *J Nutr*. 2013;143(3):315-23.
- Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JF Jr. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med*. 1997;337(6):408-16.
- Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:519-50.
- Eckel RH, Borra S, Lichtenstein AH, Yin-Piazza SY; Trans Fat Conference Planning Group. Understanding the complexity of trans fatty acid reduction in the American diet: American Heart Association Trans Fat Conference 2006: report of the Trans Fat Conference Planning Group. *Circulation*. 2007; 115(16): 2231-46.
- Erbay E, Babaev VR, Mayers JR, Makowski L, Charles KN, Snitow ME, Fazio S, Wiest MM, Watkins SM, Linton MF, Hotamisligil GS. Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis. *Nat Med*. 2009; 15(12): 1383-91.
- Feng B, Yao PM, Li Y, Devlin CM, Zhang D, Harding HP, Sweeney M, Rong JX, Kuriakose G, Fisher EA, Marks AR, Ron D, Tabas I. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat Cell Biol*. 2003; 5(9): 781-92.
- Fernandez ML, McNamar DJ. Dietary fat-mediated changes in hepatic apoprotein B/E receptor in the guinea pig: effect of polyunsaturated, monounsaturated, and saturated fat. *Metabolism*. 1989; 38(11): 1094-102.
- Filer LJ Jr, Mattson FH, Fomon SJ. Triglyceride configuration and fat absorption by the human infant. *J Nutr*. 1969; 99(3): 293-8.
- Finn AV, Kolodgie FD, Virmani R. Correlation between carotid intimal/medial thickness and atherosclerosis: a point of view from pathology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30(2): 177–81
- Fournier N, Attia N, Rousseau-Ralliard D, Védie B, Destailats F, Grynberg A, Paul JL. Deleterious impact of elaidic fatty acid on ABCA1-mediated

- cholesterol efflux from mouse and human macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1821(2): 303-12.
- Fuhrman B, Partoush A, Volkova N, Aviram M. Ox-LDL induces monocyte-to-macrophage differentiation in vivo: Possible role for the macrophage colony stimulating factor receptor (MCSF-R). *Atherosclerosis*. 2008; 196(2): 598-607.
- Gao D, Pararasa C, Dunston CR, Bailey CJ, Griffiths HR. Palmitate promotes monocyte atherogenicity via de novo ceramide synthesis. *Free Radic Biol Med*. 2012; 53(4): 796-806;
- Goodnight SH Jr, Harris WS, Connor WE, Illingworth DR. Polyunsaturated fatty acids, hyperlipidemia, and thrombosis. *Arteriosclerosis*. 1982;2(2):87-113.
- Grande F, Anderson JT, Chlouverakis C, Proja M, Keys A. Effect of dietary cholesterol on man's serum lipids. *J Nutr*. 1965;87(1):52-62.
- Grundey SM, Vega GL. Plasma cholesterol responsiveness to saturated fatty acids. *Am J Clin Nutr*. 1988; 47(5): 822-4.
- Grundey SM. Cholesterol and coronary heart disease. Future directions. *JAMA*. 1990;264(23):3053-9.
- Hannah VC, Ou J, Luong A, Goldstein JL, Brown MS. Unsaturated fatty acids down-regulate srebp isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells. *J Biol Chem*. 2001; 276(6): 4365-72.
- Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol*. 2011; 12(3): 204-12.
- Hayes KC. Synthetic and modified glycerides: effects on plasma lipids. *Curr Opin Lipidol*. 2001;12(1):55-60
- Holland WL, Bikman BT, Wang LP, Yuguang G, Sargent KM, Bulchand S, Knotts TA, Shui G, Clegg DJ, Wenk MR, Pagliassotti MJ, Scherer PE, Summers SA. Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(5):1858-70.
- Hooper L, Martin N, Abdelhamid A, Davey Smith G. Reduction in saturated fat intake for cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015; 6:CD011737.
- Horton JD, Cuthbert JA, Spady DK. Dietary fatty acids regulate hepatic low density lipoprotein (LDL) transport by altering LDL receptor protein and mRNA levels. *J Clin Invest*. 1993; 92(2): 743-9.

- Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, Rimm E, Colditz GA, Rosner BA, Hennekens CH, Willett WC. Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med*. 1997; 337(21): 1491-9.
- Hunter JE. Dietary trans fatty acids: review of recent human studies and food industry responses. *Lipids*. 2006; 41(11): 967-92.
- Hunter JE, Zhang J, Kris-Etherton PM. Cardiovascular disease risk of dietary stearic acid compared with trans, other saturated, and unsaturated fatty acids: a systematic review. *Am J Clin Nutr*. 2010;91(1):46-63.
- Innis SM, Dyer R, Nelson CM. Evidence that palmitic acid is absorbed as *sn*-2 monoacylglycerol from human milk by breast-fed infants. *Lipids*. 1994; 29(8): 541-5.
- Ishiyama J, Taguchi R, Yamamoto A, Murakami K. Palmitic acid enhances lectin-like oxidized LDL receptor (LOX-1) expression and promotes uptake of oxidized LDL in macrophage cells. *Atherosclerosis*. 2010; 209(1): 118-24.
- Jackson KG, Maitin V, Leake DS, Yaqoob P, Williams CM. Saturated fat-induced changes in Sf 60-400 particle composition reduces uptake of LDL by HepG2 cells. *J Lipid Res*. 2006; 47(2): 393-403.
- Jiang H, Liang C, Liu X, Jiang Q, He Z, Wu J, Pan X, Ren Y, Fan M, Li M, Wu Z. Palmitic acid promotes endothelial progenitor cells apoptosis via p38 and JNK mitogen-activated protein kinase pathways. *Atherosclerosis* 2010; 210(1): 71-7.
- Jinno Y, Nakakuki M, Kawano H, Notsu T, Mizuguchi K, Imada K. Eicosapentaenoic acid administration attenuates the pro-inflammatory properties of VLDL by decreasing its susceptibility to lipoprotein lipase in macrophages. *Atherosclerosis*. 2011; 219(2): 566-72.
- Joshi-Barve S, Barve SS, Amancherla K, Gobejishvili L, Hill D, Cave M, Hote P, McClain CJ. Palmitic acid induces production of proinflammatory cytokine interleukin-8 from hepatocytes. *Hepatology*. 2007;46(3):823-30.
- Keys A. Diet and the epidemiology of coronary heart disease. *J Am Med Assoc*. 1957;164(17):1912-9.
- Kirii H, Niwa T, Yamada Y, Wada H, Saito K, Iwakura Y, Asano M, Moriwaki H, Seishima M. Lack of interleukin-1 β decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(4):656-60.

- Kris-Etherton PM, Griel AE, Psota TL, Gebauer SK, Zhang J, Etherton TD. Dietary stearic acid and risk of cardiovascular disease: intake, sources, digestion, and absorption. *Lipids*. 2005; 40(12): 1193-200.
- Kris-Etherton PM, Yu S. Individual fatty acid effects on plasma lipids and lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr*. 1997; 65(5 Suppl): 1628S-1644S.
- Kritchevsky D, Tepper SA, Chen SC, Meijer GW, Krauss RM. Cholesterol vehicle in experimental atherosclerosis. 23. Effects of specific synthetic triglycerides. *Lipids*. 2000;35(6):621-5.
- Kritchevsky D, Tepper SA, Kuksis A, Eghtedary K, Klurfeld DM. Cholesterol vehicle in experimental atherosclerosis. 21. Native and randomized lard and tallow. *J. Nutr. Biochem*. 1998; 9:582–585. a
- Kritchevsky D, Tepper SA, Wright S, Kuksis A, Hughes TA. Cholesterol vehicle in experimental atherosclerosis. 20. Cottonseed oil and randomized cottonseed oil. *Nutr. Res*. 1998; 18: 259–264. b
- Kromhout D, Menotti A, Bloemberg B, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Dontas AS, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Karvonen M, Katan M, Nissinen A, Nedeljkovic S, Pekkanen J, Pekkarinen M, Punsar S, Rasanen L, Simic B, Toshima H. Dietary saturated and trans fatty acids and cholesterol and 25-year mortality from coronary heart disease: the Seven Countries Study. *Prev Med*. 1995 May;24(3):308-15.
- Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*. 2001;276(20):16683-9.
- Lefevre M, Kris-Etherton PM, Zhao G, Tracy RP. Dietary fatty acids, hemostasis, and cardiovascular disease risk. *J Am Diet Assoc*. 2004;104(3):410-9
- Lefevre M, Lovejoy JC, Smith SR, Delany JP, Champagne C, Most MM, Denkins Y, de Jonge L, Rood J, Bray GA. Comparison of the acute response to meals enriched with cis- or trans-fatty acids on glucose and lipids in overweight individuals with differing FABP2 genotypes. *Metabolism*. 2005;54(12):1652-8.
- Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr, Libby P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb*. 1993;13(2):197-204.
- Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*. 2005; 111(25): 3481-8

- Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(2):456S-460S.
- Libby P. History of Discovery: Inflammation in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32(9): 2045–2051
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420(6917): 868–74.
- Libby, P. Collagenases and cracks in the plaque. *J Clin Invest.* 2013; 123(8): 3201–3.
- Lin J, Yang R, Tarr PT, Wu PH, Handschin C, Li S, Yang W, Pei L, Uldry M, Tontonoz P, Newgard CB, Spiegelman BM. Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1 β coactivation of SREBP. *Cell.* 2005;120(2):261-73.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25(4):402-8.
- López-García E, Schulze MB, Meigs JB, Manson JE, Rifai N, Stampfer MJ, Willett WC, Hu FB. Consumption of trans fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction. *J Nutr.* 2005;135(3):562-6.
- Lottenberg AM, Nunes VS, Lottenberg SA, Shimabukuro AF, Carrilho AJ, Malagutti S, Nakandakare ER, McPherson R, Quintão EC. Plasma cholesteryl ester synthesis, cholesteryl ester transfer protein concentration and activity in hypercholesterolemic women: effects of the degree of saturation of dietary fatty acids in the fasting and postprandial states. *Atherosclerosis.* 1996; 126(2): 265-75.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265–275.
- Machado RM, Nakandakare ER, Quintao EC, Cazita PM, Koike MK, Nunes VS, Ferreira FD, Afonso MS, Bombo RP, Machado-Lima A, Soriano FG, Catanozi S, Lottenberg AM. Omega-6 polyunsaturated fatty acids prevent atherosclerosis development in LDLr-KO mice, in spite of displaying a pro-inflammatory profile similar to trans fatty acids. *Atherosclerosis.* 2012;224(1):66-74.
- Machado RM, Stefano JT, Oliveira CP, Mello ES, Ferreira FD, Nunes VS, de Lima VM, Quintão EC, Catanozi S, Nakandakare ER, Lottenberg AM. Intake of trans fatty acids causes nonalcoholic steatohepatitis and reduces adipose tissue fat content. *J Nutr.* 2010;140(6):1127-32.

- Madan M, Amar S. Toll-like receptor-2 mediates diet and/or pathogen associated atherosclerosis: proteomic findings. *PLoS One*. 2008;3(9):e3204.
- Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem*. 2006;281(17):12093-101.
- Marangoni AG, Rousseau D. Engineering triacylglycerols: the role of interesterification. *Trends Food Sci Technol* 1995; 6:329-35.
- Matthan NR, Ausman LM, Lichtenstein AH, Jones PJ. Hydrogenated fat consumption affects cholesterol synthesis in moderately hypercholesterolemic women. *J Lipid Res*. 2000;41(5):834-9.
- Matthan NR, Welty FK, Barrett PH, Harausz C, Dolnikowski GG, Parks JS, Eckel RH, Schaefer EJ, Lichtenstein AH. Dietary hydrogenated fat increases high-density lipoprotein Apo A1 catabolism and decreases low-density lipoprotein apoB-100 catabolism in hypercholesterolemic women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(6):1092-7.
- Mattson FH, Nolen GA, Webb MR. The absorbability by rats of various triglycerides of stearic and oleic acid and the effect of dietary calcium and magnesium. *J Nutr*. 1979; 109(10): 1682-7.
- Mauger JF, Lichtenstein AH, Ausman LM, Jalbert SM, Jauhiainen M, Ehnholm C, Lamarche B. Effect of different forms of dietary hydrogenated fats on LDL particle size. *Am J Clin Nutr*. 2003; 78(3): 370-5.
- Meijer GW, Weststrate JA. Interesterification of fats in margarine: effect on blood lipids, blood enzymes, and hemostasis parameters. *Eur J Clin Nutr*. 1997; 51(8): 527-34.
- Mensink RP, Katan MB. Effect of dietary trans fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. *N Engl J Med*. 1990;323(7):439-45.
- Mensink RP, Zock PL, Kester AD, Katan MB. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr*. 2003;77(5):1146-55.
- Mensink RP. Effects of products made from a high-palmitic acid, trans-free semiliquid fat or a high-oleic acid, low-trans semiliquid fat on the serum lipoprotein profile and on C-reactive protein concentrations in humans. *Eur J Clin Nutr*. 2008;62(5):617-24.

- Micha R, Mozaffarian D. Trans fatty acids: effects on cardiometabolic health and implications for policy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2008;79(3-5):147-52.
- Mozaffarian D, Pischon T, Hankinson SE, Rifai N, Joshipura K, Willett WC, Rimm EB. Dietary intake of trans fatty acids and systemic inflammation in women. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(4):606-12.
- Müller H, Jordal O, Kierulf P, Kirkhus B, Pedersen JI. Replacement of partially hydrogenated soybean oil by palm oil in margarine without unfavorable effects on serum lipoproteins. *Lipids*. 1998;33(9):879-87.
- Murray CJ, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380(9859):2197-223.
- Nestel PJ, Noakes M, Belling GB, McArthur R, Clifton PM. Effect on plasma lipids of interesterifying a mix of edible oils. *Am J Clin Nutr*. 1995; 62(5): 950-5.
- Nicholls SJ, Lundman P, Harmer JA, Cutri B, Griffiths KA, Rye KA, Barter PJ, Celermajer DS. Consumption of saturated fat impairs the anti-inflammatory properties of high-density lipoproteins and endothelial function. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(4):715-20.
- Nicolosi RJ, Stucchi AF, Kowala MC, Hennessy LK, Hegsted DM, Schaefer EJ. Effect of dietary fat saturation and cholesterol on LDL composition and metabolism. In vivo studies of receptor and nonreceptor-mediated catabolism of LDL in cebus monkeys. *Arteriosclerosis*. 1990;10(1):119-28.
- Norizzah AR, Chong CL, Cheow CS, Zaliha O. Effects of chemical interesterification on physicochemical properties of palm stearin and palm kernel olein blends. *Food Chem*. 2004; 86: 229-35.
- Okuda LS, Castilho G, Rocco DD, Nakandakare ER, Catanozi S, Passarelli M. Advanced glycated albumin impairs HDL anti-inflammatory activity and primes macrophages for inflammatory response that reduces reverse cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1821: 1485-92.
- Ohara N, Naito Y, Kasama K, Shindo T, Yoshida H, Nagata T, Okuyama H. Similar changes in clinical and pathological parameters in Wistar Kyoto rats after a 13-week dietary intake of canola oil or a fatty acid composition-based interesterified canola oil mimic. *Food Chem Toxicol*. 2009;47(1):157-62.
- Pachikian BD, Essaghir A, Demoulin JB, Neyrinck AM, Catry E, De Backer FC, Dejeans N, Dewulf EM, Sohet FM, Portois L, Deldicque L, Molendi-Coste

- O, Leclercq IA, Francaux M, Carpentier YA, Fougère F, Muccioli GG, Cani PD, Delzenne NM. Hepatic n-3 polyunsaturated fatty acid depletion promotes steatosis and insulin resistance in mice: genomic analysis of cellular targets. *PLoS One*. 2011;6(8):e23365.
- Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis*. 1987;68(3):231-40.
- Penumetcha M, Song M, Merchant N, Parthasarathy S. Pretreatment with n-6 PUFA protects against subsequent high fat diet induced atherosclerosis--potential role of oxidative stress-induced antioxidant defense. *Atherosclerosis*. 2012;220(1):53-8.
- Poledne R. A new atherogenic effect of saturated fatty acids. *Physiol Res*. 2013;16;62(2):139-43.
- Rader DJ, Alexander ET, Weibel GL, Billheimer J, Rothblat GH. The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. *J Lipid Res*. 2009; 50: S189–94
- Reena MB, Lokesh BR. Hypolipidemic effect of oils with balanced amounts of fatty acids obtained by blending and interesterification of coconut oil with rice bran oil or sesame oil. *J Agric Food Chem*. 2007;55(25):10461-9.
- Reena MB, Gowda LR, Lokesh BR. Enhanced hypocholesterolemic effects of interesterified oils are mediated by upregulating LDL receptor and cholesterol 7- α -hydroxylase gene expression in rats *J Nutr*. 2011;141(1):24-30.
- 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;123(11):1939-51.
- Robinson DM, Martin NC, Robinson LE, Ahmadi L, Marangoni AG, Wright AJ. Influence of interesterification of a stearic acid-rich spreadable fat on acute metabolic risk factors. *Lipids*. 2009;44(1):17-26.
- Rocha VZ, Libby P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2009; 6(6): 399-409.
- Ross R. Atherosclerosis — an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340(2): 115–26.
- Sacks FM, Katan M. Randomized clinical trials on the effects of dietary fat and carbohydrate on plasma lipoproteins and cardiovascular disease. *Am J Med*. 2002;113 Suppl 9B:13S-24S.

- Sanders TA, Filippou A, Berry SE, Baumgartner S, Mensink RP. Palmitic acid in the *sn*-2 position of triacylglycerols acutely influences postprandial lipid metabolism. *Am J Clin Nutr*. 2011;94(6):1433-41.
- Schilling JD, Machkovech HM, He L, Sidhu R, Fujiwara H, Weber K, Ory DS, Schaffer JE. Palmitate and lipopolysaccharide trigger synergistic ceramide production in primary macrophages. *J Biol Chem*. 2013;288(5):2923-32.
- Shepherd J, Packard CJ, Grundy SM, Yeshurun D, Gotto AM Jr, Taunton OD. Effects of saturated and polyunsaturated fat diets on the chemical composition and metabolism of low density lipoproteins in man. *J Lipid Res*. 1980;21(1):91-9.
- Silva RC, Soares DF, Lourenço MB, Soares FASM, Silva KG, Gonçalves MIA, Gioielli LA. Structured lipids obtained by chemical interesterification of olive oil and palm stearin. *Food Sci Technol*. 2010; 43: 752–8.
- Simopoulos AP. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr*. 1999;70(3 Suppl):560S-569S.
- Smit LA, Katan MB, Wanders AJ, Basu S, Brouwer IA. A high intake of trans fatty acids has little effect on markers of inflammation and oxidative stress in humans. *J Nutr*. 2011;141(9):1673-8.
- Sookoian S, Pirola CJ. Non-alcoholic fatty liver disease is strongly associated with carotid atherosclerosis: a systematic review. *J Hepatol*. 2008;49(4):600-7.
- Spritz N, Mishkel MA. Effects of dietary fats on plasma lipids and lipoproteins: an hypothesis for the lipid-lowering effect of unsaturated fatty acids. *J Clin Invest*. 1969;48(1):78-86.
- Steinberg D. Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy, part V: the discovery of the statins and the end of the controversy. *J Lipid Res*. 2006;47(7):1339-51.
- Suganami T, Tanimoto-Koyama K, Nishida J, Itoh M, Yuan X, Mizuarai S, Kotani H, Yamaoka S, Miyake K, Aoe S, Kamei Y, Ogawa Y. Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(1):84-91.
- Sun Y, Ishibashi M, Seimon T, Lee M, Sharma SM, Fitzgerald KA, Samokhin AO, Wang Y, Sayers S, Aikawa M, Jerome WG, Ostrowski MC, Bromme D, Libby P, Tabas IA, Welch CL, Tall AR. Free cholesterol accumulation in macrophage membranes activates Toll-like receptors and p38 mitogen-

activated protein kinase and induces cathepsin K. *Circ Res*. 2009;104(4):455-65.

- Sundram K, Karupaiah T, Hayes KC. Stearic acid-rich interesterified fat and trans-rich fat raise the LDL/HDL ratio and plasma glucose relative to palm olein in humans. *Nutr Metab (Lond)*. 2007 Jan 15;4:3.
- Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(1):36-46.
- Tarrago-Trani MT, Phillips KM, Lemar LE, Holden JM. New and existing oils and fats used in products with reduced trans-fatty acid content. *J Am Diet Assoc*. 2006;106(6):867-80.
- Teegala SM, Willett WC, Mozaffarian D. Consumption and health effects of trans fatty acids: a review. *J AOAC Int*. 2009;92(5):1250-7.
- Thies F, Garry JM, Yaqoob P, Rerkasem K, Williams J, Shearman CP, Gallagher PJ, Calder PC, Grimble RF. Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2003; 361(9356): 477-85.
- Tomarelli RM, Meyer BJ, Weaver JR, Bernhart FW. Effect of positional distribution on the absorption of the fatty acids of human milk and infant formulas. *J Nutr*. 1968; 95(4): 583-90.
- Tripodi A, Loria P, Dilengite MA, Carulli N. Effect of fish oil and coconut oil diet on the LDL receptor activity of rat liver plasma membranes. *Biochim Biophys Acta*. 1991; 1083(3): 298-304.
- Varela LM, Ortega-Gomez A, Lopez S, Abia R, Muriana FJ, Bermudez B. The effects of dietary fatty acids on the postprandial triglyceride-rich lipoprotein/apoB48 receptor axis in human monocyte/macrophage cells. *J Nutr Biochem*. 2013; 24(12): 2031-9
- Vlahov G. Regiospecific analysis of natural mixtures of triglycerides using quantitative ¹³C nuclear magnetic resonance of acyl chain carbonyl carbons. *Magnetic Resonance Chemistry*. 1998; 36: 359–62.
- Wang CS, Kuksis A, Manganaro F. Studies on the substrate specificity of purified human milk lipoprotein lipase. *Lipids*. 1982;17(4):278-84.
- Wang D, Wei Y, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology*. 2006;147(2):943-51.
- Wang S, Wu D, Matthan NR, Lamon-Fava S, Lecker JL, Lichtenstein AH. Reduction in dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids:

eicosapentaenoic acid plus docosahexaenoic acid ratio minimizes atherosclerotic lesion formation and inflammatory response in the LDL receptor null mouse. *Atherosclerosis*. 2009; 204(1): 147-55. a

Wang S, Wu D, Lamon-Fava S, Matthan NR, Honda KL, Lichtenstein AH. *In vitro* fatty acid enrichment of macrophages alters inflammatory response and net cholesterol accumulation *Br J Nutr*. 2009; 102(4): 497–501. b

Wang S, Wu D, Matthan NR, Lamon-Fava S, Lecker JL, Lichtenstein AH. Enhanced aortic macrophage lipid accumulation and inflammatory response in LDL receptor null mice fed an atherogenic diet. *Lipids*. 2010; 45(8):701-11.

Watts GF, Jackson P, Burke V, Lewis B. Dietary fatty acids and progression of coronary artery disease in men. *Am J Clin Nutr*. 1996; 64(2): 202-9.

Willerson JT, Ridker PM. Inflammation as a cardiovascular risk factor. *Circulation*. 2004; 109(21 Suppl 1): II2-10.

Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*. 1991;88(6):1785-92.

Yu-Poth S, Yin D, Kris-Etherton PM, Zhao G, Etherton TD. Long-chain polyunsaturated fatty acids upregulate LDL receptor protein expression in fibroblasts and HepG2 cells. *J Nutr*. 2005;135(11):2541-5.

Yli-Jokipii K, Kallio H, Schwab U, Mykkänen H, Kurvinen JP, Savolainen MJ, Tahvonen R. Effects of palm oil and transesterified palm oil on chylomicron and VLDL triacylglycerol structures and postprandial lipid response. *J Lipid Res*. 2001;42(10):1618-25.

Zhao GJ, Tang SL, Lu YC et al. Antagonism of betulinic acid on LPS mediated inhibition of ABCA1 and cholesterol efflux through inhibiting nuclear factor- κ B signaling pathway and miR-33 expression. *PLoS ONE* 2013;8:e74782

ANEXO I. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

APROVAÇÃO

O Coordenador da CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em **04.04.2012**, após atendimento a diligência encaminhada **APROVOU *ad-referendum*** o Protocolo de Pesquisa nº **026/12** intitulado: " Efeito de gorduras interesterificadas sobre o desenvolvimento da lesão aterosclerótica em camundongos com deficiência no receptor de LDL-c." que utilizará **90** Camundongos da linhagem **C57BI/6** com ablação no gene do receptor de LDL, apresentado pelo Departamento de Clínica Médica.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei No 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Edna Regina Nakandakare

Ana Maria Pita Lottenberg

Pesquisador (a) Executante: Milessa da Silva Afonso

CEP-FMUSP, 04 de abril de 2012.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Av. Dr. Arnaldo, 455 – Instituto Oscar Freire 1º andar CEP 01248-903 – Fone : 3061-8004
mail: cep.fmusp@hcnnet.usp.br

Anexo II. Ressonância Nuclear Magnética das gorduras Palmítico (acima) e Palmítico Interesterificado (abaixo).

Anexo III. Ressonância Nuclear Magnética das gorduras Esteárico (acima) e Esteárico Interesterificado (abaixo).

Subject: JNB-15-405R1: Final Decision

Ms. No.: JNB-15-405R1

Title: Dietary interesterified fat enriched with palmitic acid induces atherosclerosis by impairing macrophage cholesterol efflux and eliciting inflammation

Corresponding Author: Dr. Ana Maria Lottenberg

Authors: Milessa S Afonso; Maria Silvia F Lavrador; Marcia K Koike, Ph.D.; Dennys E Cintra, Ph.D.; Fabiana D Ferreira; Valeria S Nunes, Ph.D.; Gabriela Castilho, Ph.D.; Luis Antonio Gioielli, Ph.D.; Renata P A Bombo, Ph.D.; Sergio Catanozi, Ph.D.; Elia G Caldini, Ph.D.; Nilsa R Damaceno-Rodrigues, Ph.D.; Marisa Passarelli, Ph.D.; Edna R Nakandakare, Ph.D.;

Dear Dr. Lottenberg,

I am pleased to inform you that your manuscript (JNB-15-405R1) was accepted for publication in the Journal of Nutritional Biochemistry. We appreciate your efforts to strengthen the manuscript by considering the reviewers' comments. The manuscript will now be forwarded to the publisher for copyediting and composing. You will receive galley proofs, a copyright transfer form and an offprint (reprint) order form from the publisher.

Should you have any questions along the way to publication, I would be happy to answer them.

Thank you for submitting your work to the Journal of Nutritional Biochemistry; we appreciate your interest in JNB, and we invite you to submit manuscripts again in the future.

When your paper is published on ScienceDirect, you want to make sure it gets the attention it deserves. To help you get your message across, Elsevier has developed a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown (publicly available) next to your published article. This format gives you the opportunity to explain your research in your own words and attract interest. You will receive an invitation email to create an AudioSlides presentation shortly. For more information and examples, please visit <http://www.elsevier.com/audioslides>.

Sincerely,

Joseph R. Richardson
Editorial Manager

The Journal of Nutritional Biochemistry
Bernhard Hennig, Editor-in-Chief

www.elsevier.com/locate/jnutbio/

University of Kentucky
900 Limestone Street
Rm. 599 Wethington Building
Lexington, KY 40536-0200
Tel: (859) 218-1388
Fax: (859) 257-1811
E-mail: jnb@uky.edu

Anexo IV. Carta de aceite para publicação do trabalho na revista *The Journal of Nutritional Biochemistry*.