Maria Sílvia Ferrari Lavrador

**Efeito da ingestão das gorduras interesterificadas
sobre vias inflamatórias e metabólicas no fígado e
tecido adiposo de camundongos LDLr-KO**

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

Maria Sílvia Ferrari Lavrador

**Efeito da ingestão das gorduras interesterificadas
sobre vias inflamatórias e metabólicas no fígado e
tecido adiposo de camundongos LDLr-KO**

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

Lavrador, Maria Sílvia Ferrari

Efeito da ingestão das gorduras interesterificadas sobre vias inflamatórias e metabólicas no fígado e tecido adiposo de camundongos Idir-ko / Maria Sílvia Ferrari Lavrador. -- 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.Obesidade 4.Inflamação
5.Camundongos *knockout* 6.Fígado gorduroso

USP/FM/DBD-238/16

Estudo realizado no Laboratório de Lípidos (LIM-10) do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMUSP (CEP) e Comissão de Biossegurança (026/12) e recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) 11/50443-0 e Bolsa de Doutorado FAPESP 11/24083-7.

Dedicatória

Ao meu marido, Daniel, por sua inesgotável paciência, compreensão aos meus vários períodos de ausência e seu companheirismo, atitudes que foram fundamentais para a concretização desta etapa.

Dedicatória

**À minha filha, Carina, por me ensinar o verdadeiro significado da frase
“o amor maior do mundo”.**

Dedicatória

À minha mãe, Marília, pelo carinho, apoio e incentivo, proporcionando todas as condições possíveis para que eu nunca parasse de estudar.

**Ao meu pai, Clovis (sempre presente), que me incentivou à pós-graduação, muito antes de eu saber o que isso realmente significava.
Sua Luz e alegria estiveram sempre comigo.**

AGRADECIMENTOS

À Dra. Ana Maria Pita Lottenberg, pela oportunidade de realizar o doutorado e fazer parte de seu grupo de pesquisa. Trabalhar ao seu lado é um privilégio; sua competência, serenidade, educação, dedicação e amor ao trabalho, à nutrição e à docência são fontes diárias de incentivo. Obrigada, não apenas pelos ensinamentos profissionais, mas também por me educar e me oferecer grandes oportunidades, além de cuidar de mim e da minha família com o mesmo carinho que a sua.

À Dra. Milessa da Silva Afonso, grande parceira deste trabalho. Juntas, desenvolvemos o projeto das gorduras interesterificadas. E, não apenas isso, cultivamos uma amizade que o dia a dia não prejudicou. Pelo contrário, contribuiu, fortalecendo nossos laços de amizade e companheirismo. Hoje, torcemos pela felicidade e progresso uma da outra. Sempre irei agradecer-lhe e desejar que voe cada vez mais alto, pois lá é seu lugar. Obrigada, muito obrigada!

Ao Dr. Dennys Esper Cintra, meu eterno professor. Precisamos de muitos Dennys na nutrição e pesquisa, pois a forma como as conduz e ensina é contagiante. Não há como trabalhar com você e não ser influenciada por essa energia, amor e respeito. Minhas inúmeras idas a Campinas sempre valiam a pena, pois, após mais de 10 horas de trabalho experimental, uma breve discussão dos resultados era suficiente para recarregar as energias e me fazer voltar querendo aprender mais e mais.

À Dra. Marcia Koike, pelos muitos ensinamentos curriculares e extracurriculares. Sua colaboração transcendeu as barreiras profissionais, com grande colaboração na minha vida. Obrigada pela amizade, sinceridade e por me ensinar a analisar os fatos de vários ângulos, ver a vida e as pessoas de maneira mais holística.

À Dra. Roberta Marcondes Machado, por me dar os primeiros ensinamentos de bancada, à sua maneira *tissue-tek*, mas com grande competência.

Também pelas conversas, conselhos, parcerias e apoio. Obrigada por me passar segurança em momentos em que eu não acreditava em mim.

Ao Dr. Sergio Catanozi, por ensinar e demonstrar a todos o respeito com os animais de experimentação, pela dedicação à pesquisa e momentos de franca conversa, principalmente nos finais de dia, já noite no laboratório, quando percebia nosso desânimo e estresse.

À Dra. Valéria Sutti Nunes, sempre disposta a tirar dúvidas e colaborar, pela generosidade, carinho e amizade. Obrigada por me ensinar que devemos estar sempre prontos a ajudar os outros.

Ao Dr. Simão Augusto Lottenberg, profissional excepcional, que ensina a todos com o mesmo respeito e dedicação, assim como assiste seus pacientes. Sempre torceu pelos resultados deste projeto, ajudando a interpretar muitos deles. Muito obrigada pelos ensinamentos, conselhos, amizade e cuidados com a minha família.

À Dra. Edna Regina Nakandakare, chefe do Laboratório de Lípidos, pela oportunidade e contribuição, sempre disposta a ouvir e discutir dados, com grande participação neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Eder Quintão, pelo exemplo de pesquisador, incansável busca por conhecimento e atualização na área de pesquisa. Obrigada por nos ensinar não apenas assuntos relacionados aos lípidos, mas também cultura em geral, sempre nos incentivando a aprender mais, em diversos âmbitos.

À Dra. Marisa Passarelli, pesquisadora sempre presente, obrigada pelos ensinamentos e esclarecimentos, sempre com muita profundidade.

À Dra. Patricia Cazita, pelo apoio, carinho, trocas de experiências e bate-papos em momentos descontraídos.

À Dra. Gabriela Castilho, pela amizade, incentivo, conselhos e grande contribuição na empreitada das técnicas de bancada. Obrigada pelo carinho e apoio de sempre.

Ao Dr. Rodrigo Tallada Iborra, pelos ensinamentos incansáveis na técnica de *Western Blotting*, apoio e ajuda constantes ao longo desses anos.

À Dra. Adriana Saldiba Machado, pela amizade, carinho, sempre com uma palavra de consolo e ajuda. Obrigada pelas discussões dos casos de pacientes e indicações. Você é um ótimo exemplo de que pesquisadora também pode ser nutricionista clínica.

À Ms. Karolline Santana, pela amizade, carinho, apoio, risadas, companhia nas voltas de metrô e finais de semana no laboratório. Obrigada pela atenção, paciência e ensinamentos.

À Ms. Paula Ramos, pela *fofurisse* que lhe é peculiar, amizade, risadas e ensinamentos. Sua dedicação e perfeccionismo são contagiantes. Obrigada pela companhia naquele dia em que nada dá certo e só nos resta uma boa conversa descontraída.

Ao Dr. Diego Gomes, pelas conversas e consolo frente a resultados inesperados, ou, ainda pior, da falta deles, e pelas aulas de inglês, que muitas vezes terminavam em deliciosos jantares. Obrigada pela amizade, conversas sinceras, momentos de descontração regados a alegria e bom humor.

À Ms. Tatiana Venâncio, pela paciência, carinho e apoio. Muita saudade das conversas além bancada, sempre nos levando a pensar mais sobre o que julgamos muito simples.

À Dra. Renata Bombo, pela contribuição nos experimentos, conversas e conselhos durante esses anos.

À Dra. Ligia Shimabukuro Okuda, pelos ensinamentos, carinho e apoio. Sua disciplina e dedicação são contagiantes. Você é muito querida.

À Fabiana Dias Ferreira, pela contribuição no aprendizado do dia a dia na bancada, pelo carinho, conversas e desabafos.

À Kelly Gomes, obrigada pela ajuda ao longo deste trabalho.

À Dra. Mônica Neves, pelo carinho, apoio e confiança. Suas colocações nas reuniões científicas e até durante discussões de pacientes são sempre de grande contribuição.

À Claudia Souza, pelo carinho, apoio e por estar sempre disponível a ajudar a resolver as inúmeras questões burocráticas.

À Rosibel, pelo seu cuidado com todo o material do laboratório. Seu trabalho é fundamental para o seguro andamento dos experimentos.

À nova geração de pós-graduandos do LIM-10 Lis Mie, Vanessa, Ana Paula, Aécio, Carlos, Talita, Elba e Renata. Obrigada pela ajuda e troca de conhecimentos. Boa sorte a todos!

Ao Dr. Lício Veloso, chefe do Laboratório de Sinalização Celular (LabSinCel), por permitir a realização de alguns experimentos na unidade e, principalmente, pela oportunidade de estar entre seus alunos, participando de reuniões e discussões preciosas. Conviver com sua equipe contribuiu muito para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos doutores e pós-graduandos do LabSinCel, especialmente Carina Sólón, Natália Dragano, Albina Garcia e Bruna Bombassaro, que tornaram meus longos dias em Campinas mais agradáveis. Obrigada por sempre se disporem a ajudar nos experimentos.

À Dra. Erika Anne, bióloga do LabSinCel, que me ensinou não apenas análises de biologia molecular, mas a necessidade da organização nos experimentos e as responsabilidades de cada integrante de um grupo de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Chin Jia Lin, por colaborar para os experimentos, envolvendo Biologia Molecular, sempre ensinando a todos os procedimentos com perfeição.

Ao Prof. Dr. Luiz Antonio Gioielli (FCF-USP), pela colaboração e suporte experimental.

À Natalia Sanchez, pela amizade, carinho e por dividir com muita alegria várias atividades profissionais, ensinando-me que o trabalho em conjunto é muito prazeroso quando temos organização, dedicação, respeito e parceria. Conhecê-la e trabalhar com você foi mais um grande presente durante esta jornada.

Às futuras nutricionistas Marina Demasi e Giovanna Brito, pela contribuição nos experimentos. Que vocês continuem fazendo a diferença, com respeito à profissão e aos pacientes.

À Julia Pazetto, por me receber sempre em seu apartamento em Campinas para que pudesse realizar os experimentos na UNICAMP.

Às nutricionistas queridas e competentes Vivian Buonacorso, Lis Mie, Sharon Halaban, Juliana Gropp, Klara Rahmann e Patricia Rios, pelos momentos de alegria, carinho e trocas de experiências profissionais.

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

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 o apoio experimental.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de doutorado direto e apoio financeiro à realização desta pesquisa.

A meu irmão Alexandre, pelo carinho, amor, amizade, cuidado e apoio em todos os momentos.

Aos meus amigos, que souberam esperar e entender a minha ausência por estar realizando algo que tanto almejava.

A todos que, de alguma forma, fizeram parte desta tese. Muito obrigada!

“A vitória sobre si mesmo é a maior de todas as vitórias”.

Buda

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Ácidos graxos alimentares	2
1.2 Gorduras interesterificadas	5
1.3 Absorção das gorduras alimentares	10
2. Doença hepática gordurosa não alcoólica (nafld)	12
2.1 Definição e repercussões metabólicas da nafld	12
2.2 Ácidos graxos alimentares e esteatose hepática	16
3. Tecido adiposo e obesidade	17
3.1 Repercussões metabólicas do tecido adiposo e obesidade	17
3.2 Gorduras alimentares e metabolismo dos adipócitos	22
4. JUSTIFICATIVA	25
5. OBJETIVOS	26
5.1 Objetivo geral	26
5.2 Objetivos específicos	26
6. MATERIAL E MÉTODOS	27
6.1 Grupos experimentais	27
6.2 Tratamento experimental	28
6.3 Distribuição regioespecífica dos ácidos graxos na molécula do glicerol	30
6.3 Protocolo experimental	31
6.4 Extração dos tecidos	32
6.6 Análises bioquímicas	32
6.7 Avaliação da concentração hepática de colesterol e triglicérides	32
6.8 Determinação do perfil de ácidos graxos nas fezes	33
6.8.1 Extração da fração lipídica	33
6.9 Análise histológica e gradação da doença hepática	36

6.9.1 Hematoxilina e Eosina	36
6.9.2 Análise do infiltrado inflamatório de neutrófilos no parênquima hepático.....	36
6.9.3 Análise da fibrose no parênquima hepático	37
7. Análise histológica do tecido adiposo visceral	38
8. Imunohistoquímica.....	38
9. Immunoblot.....	38
10. Análise de expressão gênica por rt-qpcr em fígado e tecido adiposo visceral.....	40
11. Análise estatística.....	42
12. RESULTADOS	43
12.1 Consumo alimentar, ganho de peso e tecido adiposo dos animais	43
12.2 Análises bioquímicas.....	43
12.3 Área dos adipócitos, expressão gênica e síntese de proteínas no tecido adiposo visceral	47
12.4 Histologia do fígado e conteúdo de lípidos hepáticos	51
13. DISCUSSÃO	63
14. CONCLUSÃO	75
15. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
Anexo 1. Ressonância nuclear magnética das gorduras palmítico e palmítico interesterificada.....	91
Anexo 2. Ressonância nuclear magnética das gorduras esteárico e esteárico interesterificada.....	92
Anexo 3. Aprovação do comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.	93

LISTA DE ABREVIATURAS

ACAT	Acetil-CoA acetiltransferase
ACC	Acetil-CoA carboxilase
ALT	Alanina aminotransferas
Ap-1	Proteína ativadora -1
ApoA-1	Apolipoproteína A-1
ApoB-48	Apolipoproteína B-48
ApoB-100	Apolipoproteína B-100
ATGL	Lipase triglicérides do adiposo
BAX	Proteína X associada ao BCL-2
BCL-2	Célula-B de linfoma 2
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CCR-2	Receptor de quimiocina C-C tipo 2
CD 36	<i>Cluster</i> de diferenciação 36
CETP	Proteína de transferência de colesterol esterificado
CPT	Carnitina palmitoil tranferase
CYP7A1	Colesterol 7alfa-hidroxilase A1
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DGAT	Diacilglicerol aciltransferase
FABP 4 e 5	Proteína ligadora de ácidos graxos tipo 4 e 5
FAS	Ácido graxo sintase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HPRT	Hipoxantina guanina fosforribosil transferase
IκB	Inibidor do fator nuclear kappa B

Ikk	I kappa B quinase
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IFNγ	Interferon gama
IRS	Substrato de receptor de insulina 1
JNK	c-Jun N-terminal quinase
LHS	Lipase hormônio sensível
LCAT	Lecitina colesterol aciltransferase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLr-KO	Ablação gênica para o receptor de LDL
LPL	Lipoproteína lipase
LPS	Lipopolissacarídeo
LXR	Receptor X hepático
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócito 1
MTP	Proteína microsomal de transferência de triglicérides
NAFLD	Doença gordurosa hepática não alcoólica
NASH	Esteato-hepatite não alcoólica
NFkB	Factor nuclear kappa B
POLI	Dieta hiperlipídica contendo ácidos graxos poli-insaturados
PALM	Dieta hiperlipídica com maior concentração de ácido palmítico
PALM INTER	Dieta hiperlipídica contendo gordura interesterificada com maior concentração de ácido palmítico
ESTEAR	Dieta hiperlipídica com maior concentração de ácido esteárico

ESTEAR	Dieta hiperlipídica contendo gordura interesterificada com
INTER	maior concentração de ácido esteárico interesterificado
PGC-1β	Coativador gama do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma 1- beta
PKB/AKT	Proteína quinase B
PKC	Proteína quinase C
PPARγ	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma - gama
RNA	Ácido ribonucleico
Receptor B/E	Receptor de lipoproteína de baixa densidade
SCD-1	Estearoil-coenzima A dessaturase 1
SREBP-1c	Proteína de ligação ao elemento responsivo a esteroides-1c
SREBP-2	Proteína de ligação ao elemento responsivo a esteroides-2
TG	Triglicérides
TLR-4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
VCL	Veia centro lobular
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo de interesterificação..	8
Figura 2. Absorção da gordura alimentar no enterócito.	11
Figura 3. Evolução da esteatose hepática não alcoólica (NAFLD).	15
Figura 4. Obesidade, resistência à insulina e inflamação no tecido adiposo.	21
Figura 5. Resumo do protocolo experimental.....	30
Figura 6. Tecido adiposo epididimal dos camundongos LDLr-Ko que receberam, durante 16 semanas, dieta hiperlipídica diferindo na concentração de ácidos graxos e processo de interesterificação.	45
Figura 7. Análise da expressão de genes de tecido adiposo epididimal dissecados de camundongos LDLr-Ko, relacionados às vias inflamatórias, anti-inflamatória, lipolítica e lipogênica de camundongos LDLr-Ko.....	49
Figura 8. Secreção de proteínas de vias inflamatórias no tecido adiposo de camundongos LDLr-ko.....	50
Figura 9. Tecido hepático processado para análise histológica com HE e Picrossius Red para análise do conteúdo de colágeno (n=10).	55
Figura 10. Marcação de macrófagos ativados M1 em fígado de camundongos LDLr-ko.	56
Figura 11. Expressão de genes relacionados às vias inflamatórias, lipogênica e lipolítica do tecido hepático de camundongos LDLr-KO.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição média, em porcentagem, de ácidos graxos das diferentes gorduras utilizadas na fabricação das rações	29
Tabela 2. Distribuição regioespecífica dos ácidos graxos na molécula do glicerol em porcentagem	30
Tabela 3. Peso inicial, consumo alimentar, ganho de peso, tecido adiposo visceral e subcutâneo e diâmetro dos adipócitos de camundongos LDLr-KO submetidos às diferentes dietas experimentais por 16 semanas.	45
Tabela 4. Concentração plasmática de colesterol, triglicérides, ALT, glicemia e insulina de camundongos LDLr-Ko submetidos às diferentes dietas experimentais por 16 semanas.	46
Tabela 5. Análise do tecido hepático: peso do órgão, conteúdo de colesterol e triglicérides. Análise histológica: infiltrado de neutrófilo e concentração de colágeno.	53

RESUMO

Lavrador MSF. **Efeito da ingestão das gorduras interesterificadas sobre vias inflamatórias e metabólicas no fígado e tecido adiposo de camundongos LDLr-KO** [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Introdução: as gorduras interesterificadas, ricas em ácidos graxos saturados, vêm sendo utilizadas pela indústria alimentícia em substituição aos ácidos graxos trans. Os principais ácidos graxos saturados empregados no processo de interesterificação são o palmítico e o esteárico, os quais podem, respectivamente, apresentar efeitos deletérios ou serem neutros, do ponto de vista cardiovascular e metabólico. A quantidade de ácido esteárico na dieta é menor em comparação ao palmítico, e não está elucidada a implicação de seu alto consumo. O propósito deste estudo foi avaliar o efeito das gorduras interesterificadas contendo ácido palmítico ou ácido esteárico sobre as principais vias de sinalização envolvidas no metabolismo do tecido hepático e adiposo.

Métodos: camundongos machos LDLr-KO foram alimentados durante 16 semanas com dieta hiperlipídica (40% de energia em forma de gordura) contendo maior concentração de poli-insaturados (POLI), palmítico (PALM), palmítico interesterificado (PALM INTER), esteárico (ESTEAR) ou esteárico interesterificado (ESTEAR INTER). Determinaram-se a composição corporal, conteúdo de gordura no fígado, concentração plasmática de colesterol, triglicérides, glicose e insulina. A expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico e vias inflamatórias no tecido adiposo visceral e hepático foi determinada por RT-qPCR. Além disso, a síntese de proteínas e proteínas fosforiladas foi medida por *Immunoblotting*. O infiltrado de células inflamatórias no tecido hepático e histologia do tecido adiposo, bem como o conteúdo de colágeno do fígado, foram determinados por coloração com eosina e hematoxilina e Sirius Red, respectivamente.

Resultados: o processo de interesterificação não alterou parâmetros bioquímicos plasmáticos e as quantidades de CT e TG no tecido hepático. No entanto, ambas as gorduras interesterificadas induziram maior conteúdo de colágeno no fígado e fosforilação de JNK. Adicionalmente, o grupo ESTEAR INTER desenvolveu NASH, associada a maior infiltrado de neutrófilos. Por outro lado, PALM INTER induziu maior expansão do tecido adiposo, juntamente com hipertrofia de adipócitos, condições associadas à ativação da via de sinalização “upstream” do NFkB, observada para a fosforilação de IKK, o que contribuiu para maior teor de TNF α .

Conclusão: as gorduras interesterificadas enriquecidas com ácido palmítico induziram fibrose hepática, bem como a expansão do tecido adiposo, com hipertrofia dos adipócitos; e as gorduras contendo ácido esteárico induziram NASH em camundongos LDLr-KO.

Descritores: dieta hiperlipídica; ácidos graxos saturados; obesidade; inflamação; camundongos knockout; fígado gorduroso; esteatose hepática.

SUMMARY

Lavrador MSF. **Effect of interesterified fats intake on inflammatory and metabolic pathways in the liver and adipose tissue in *ldlr- ko* mice** [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Background: interesterified fats, rich in saturated fatty acids, have been used by the food industry as a substitute for trans fatty acids. The main saturated fatty acids used in the interesterification process are palmitic and stearic, which may, respectively, have deleterious effects or be cardiovascular and metabolic neutral.

Objective: to evaluate the effect of interesterified fats containing palmitic or stearic acids on signaling pathways involved in the hepatic and adipose tissue lipid metabolism.

Methods: Weaning male LDLr-KO mice were fed a high-fat diet (40% energy as fat) containing polyunsaturated (PUFA), palmitic (PALM), palmitic interesterified (PALM INTER), stearic (STEAR) or stearic interesterified (STEAR INTER) fats for 16 weeks. Body composition, liver fat content, total plasma cholesterol, triglycerides, glucose and insulin concentrations were determined. Gene expression involved in lipid metabolism and inflammation process in liver and white adipose tissue was determined by quantitative RT-PCR. Furthermore, amount of proteins and activated proteins were measured by Western blot. Hepatic and adipose tissue inflammatory cells infiltration as well as liver collagen content were determined by eosin and hematoxylin and Sirius Red staining, respectively.

Results: Interesterified process did not alter plasma biochemical parameters and amounts of TC and TG in hepatic tissue. However, both interesterified fats brought on a higher liver collagen content and JNK phosphorylation. Additionally, STEAR INTER group developed NASH associated with a higher neutrophil infiltration.

On the other hand, PALM INTER induced a higher adipose tissue expansion together with the enlargement of adipocytes, conditions associated with the activation of upstream NFkB signaling pathway as observed for IKK phosphorylation, contributing to higher TNF α protein content.

Conclusions: Interesterified fats containing stearic acid induced NASH and enriched with palmitic acid trigger on steatosis with fibrosis as well as hypertrophy and inflammatory signaling activation in the adipose tissue in LDLr-KO mice

Descriptors: diet, high fat; fatty acid; obesity; inflammation; mice, knockout; fatty liver; fatty acids, saturate

1. INTRODUÇÃO

A prevalência da obesidade vem crescendo significativamente nos últimos anos, sendo considerada um grave problema de saúde pública (Gluckman et al., 2011), em razão de sua associação com o Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) e as doenças cardiovasculares (Gregor & Hotamisligil, 2011), os quais compõem a relação das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as DCNT têm longa duração e, geralmente, lenta progressão. Hoje, já apresentam taxa de mortalidade superior à das doenças infecciosas. Por esse motivo, o relatório da OMS evidencia a importância de um plano de ação global para as DCNT, que visa reduzir o número de mortes prematuras em 25% até o ano de 2025 (WHO, 2015). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2013), a prevalência de obesidade no Brasil entre adultos é de 20,8%, sendo que 56,9% dos indivíduos maiores de 18 anos já apresentam sobrepeso. Nos Estados Unidos, 37,9% das pessoas têm obesidade e 70,7%, sobrepeso (Flegal et al., 2016). Embora esses números estejam estáveis na população norte-americana, observa-se um panorama contrário nos brasileiros, uma vez que a prevalência da obesidade vem crescendo significativamente nos últimos anos (IBGE, 2009).

Um dos principais fatores de risco modificáveis para o desenvolvimento das DCNT é o hábito alimentar (Mozaffarian, 2016), caracterizado pelo aumento do consumo de produtos industrializados, como os

ultraprocessados (IBGE, 2009), os quais contêm elevada concentração de açúcares, ácidos graxos saturados e *trans* (Monteiro et al., 2014; Mensink et al., 2003). Com relação ao consumo de gorduras alimentares, já está demonstrado que tanto a quantidade quanto o tipo de ácidos graxos podem influenciar a concentração plasmática de lípides e lipoproteínas, o metabolismo lipídico hepático e do tecido adiposo e o risco de doenças metabólicas e cardiovasculares (Fernandez-Real et al., 2003).

1.1 ÁCIDOS GRAXOS ALIMENTARES

Os ácidos graxos são classificados de acordo com o comprimento da cadeia de carbono em curta, média e longa; e também pela quantidade de duplas ligações em saturados, monoinsaturados, poli-insaturados ou *trans*.

Os ácidos graxos saturados são caracterizados pela ausência de duplas ligações na cadeia carbônica e apresentam estrutura molecular retilínea (Spritz & Mishkel, 1969). Em ordem decrescente, os principais encontrados nos alimentos são o ácido palmítico (16:0), o esteárico (18:0), o mirístico (14:0) e o láurico (12:0) (Kris-Etherton et al., 2005). O palmítico é o mais abundante na dieta (Kris-Etherton et al., 2005), sendo as carnes e o óleo de palma as suas principais fontes (Taco, 2011). O mirístico é encontrado no leite e seus derivados, enquanto a principal fonte do esteárico é o cacau (Taco, 2011). Já se encontra bem documentado na literatura que o alto consumo de ácidos graxos saturados eleva a concentração plasmática de colesterol (CT) e de lipoproteína de baixa densidade (LDL), aumentando

o risco cardiovascular (Kromhout et al., 1995; Fretts et al., 2016), em comparação aos poli-insaturados. Dentre os ácidos graxos saturados, o esteárico é o que se relaciona a menor risco de doenças metabólicas e cardiovasculares, em função de sua rápida dessaturação a ácido oleico, por meio da ação da enzima esteroil coenzima-A dessaturase 1 (SCD-1). Entretanto, não está elucidado na literatura se o alto consumo de esteárico (Kris-Etherton et al., 2005) seria deletério sob o ponto de vista metabólico e cardiovascular.

O aumento da colesterolemia em decorrência do consumo de ácidos graxos saturados pode ser explicado por diversos mecanismos, tais como: 1) redução da atividade, síntese proteica e expressão do RNA mensageiro (mRNA) de receptores hepáticos B/E, responsáveis pela captação das LDL, (Bennett et al., 1995; Horton 1993; Daumerie 1992); 2) apresentam estrutura retilínea, empacotando-se de maneira coesa, o que lhes confere maior ponto de fusão e aumenta a capacidade das partículas de LDL em armazenar colesterol (Spritz & Mishkel, 1969); 3) enriquecimento das partículas de LDL em colesterol, por meio da ativação da enzima acilcolesterol aciltransferase (ACAT) (Lee & Carr, 2004).

Os ácidos graxos insaturados são classificados em função do número de duplas ligações, em mono e poli-insaturados, sendo os principais encontrados na alimentação, o oleico (18:1, ω -9), o linoleico (18:2, ω -6) e o linolênico (18:3, ω -3), presentes nos óleos vegetais. O oleico é o mais abundante nos alimentos (TACO, 2011) e apresenta efeito neutro sobre a colesterolemia, possivelmente por ser melhor substrato para a ACAT-1,

existente no fígado, a qual esterifica o colesterol livre, impedindo a supressão dos receptores de LDL (Grundy, 1991). Resultados do importante estudo PREDIMED apontam efeito cardioprotetor do oleico (Guasch-Ferré et al., 2014), tanto por associar-se a menor concentração plasmática de colesterol (Hammad et al., 2016), como por apresentar maior capacidade oxidativa comparado aos ácidos graxos saturados (Bergouignan et al., 2009).

De maneira geral, os ácidos graxos insaturados induzem menor síntese de colesterol quando comparados aos saturados (Bergouignan et al., 2009). Esses ácidos graxos possuem uma ou mais duplas ligações na cadeia carbônica que lhes conferem um ou mais ângulos levemente fechados (Spritz & Mishkel, 1969). Essas ligações favorecem o empacotamento dos fosfolípidos nas lipoproteínas, de modo a limitar o espaço para o armazenamento de moléculas de colesterol dentro das partículas de LDL (Spritz & Mishkel, 1969), e reduzem a colesterolemia, principalmente, por diminuírem a produção de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), precursoras das LDL (Spritz & Mishkel, 1969). Isso ocorre em razão de inibirem vias lipogênicas (Caputo et al., 2014) e por promoverem, em nível transcricional, o aumento da oxidação de gordura, em comparação aos saturados (Beynen & Katan, 1985; Lam et al., 2011).

Os ácidos graxos *trans* (elaídico; 18:1t) são produzidos por processo catalítico empregado pela indústria alimentícia, por meio de hidrogenação parcial dos óleos vegetais. Têm diversas implicações na síndrome metabólica, pois são fortemente ligados ao aumento de alterações

inflamatórias e da concentração plasmática de triglicérides (TG) e colesterol, associadas com a redução de lipoproteína de alta densidade (HDL) (Mensink et al., 2003). Assim como os saturados, aumentam o colesterol plasmático de maneira similar, inibindo o catabolismo da apolipoproteína B100 (Apo-B100) das LDL (Matthan et al., 2004). No entanto, têm efeito adverso adicional, pois reduzem a concentração da HDL-c, provavelmente por induzirem o catabolismo de apolipoproteína A1 (apo-A1) (Matthan et al., 2004) e, ao mesmo tempo, aumentarem a atividade da proteína de transferência de colesterol éster (CETP) (Gatto et al., 2003), induzindo maior enriquecimento de colesterol nas partículas de LDL. Dessa maneira, favorecem o desenvolvimento da placa aterosclerótica (Machado et al., 2012) e contribuem para maior risco cardiovascular (Lichtenstein, 2014). Além disso, apresentam implicação na gênese da obesidade e resistência à insulina (Saravanan et al., 2005), por suas ações deletérias, tanto nos parâmetros inflamatórios sistêmicos, como teciduais (fígado) (Longhi et al., 2016; El-Saed et al., 2016). Diante de sua relação com o aumento do risco cardiometabólico, estão sendo gradativamente substituídos pelas gorduras interesterificadas na indústria alimentícia.

1.2 GORDURAS INTERESTERIFICADAS

As gorduras interesterificadas são obtidas pela mistura de óleo vegetal com uma gordura totalmente hidrogenada, ou misturas de frações sólidas, como estearina de palma com ácido láurico, encontrado em óleo de coco (Tarrago-

Trani et al., 2006). A interesterificação possibilita o preparo de gorduras sólidas com ausência de isômeros *trans*, uma vez que, durante o seu preparo, ocorre a hidrogenação total dos óleos. Esse processo permite o rearranjo dos ácidos graxos na molécula de glicerol, formando TG com novas propriedades físicas, organolépticas e químicas (Tarrago-Trani et al., 2006).

Na produção dessas gorduras, predomina o método químico, apesar de o enzimático também ser viável. O primeiro utiliza o metóxido de sódio como catalisador e consiste em um processo que altera aleatoriamente a posição dos ácidos graxos na molécula de TG (**Figura 1**). O segundo usa lipases microbianas, que são mais seletivas, atuando nas posições sn-1 e sn-3 dos TG (Marangoni & Rousseau, 1995). Nas duas alternativas, a quantidade de cada tipo de ácido graxo que compõe a molécula de TG após interesterificação é exatamente a mesma existente nos óleos e gorduras utilizados para este processo (Tarrago-Trani et al., 2006).

Os ácidos graxos palmítico (este com maior frequência) e esteárico são os mais utilizados na indústria alimentícia em substituição à gordura *trans* (Berry, 2009). No final do processo de interesterificação, o seu rearranjo aleatório culmina com o enriquecimento de ácidos graxos saturados na posição sn-2 do glicerol (Tarrago-Trani et al., 2006), a qual é normalmente ocupada por poli-insaturados nos óleos vegetais (Berry, 2009; Zock et al., 1995; Nestel et al., 1995). Como a lipase pancreática hidrolisa ácidos graxos nas posições sn-1 e sn-3 dos triglicérides (Storch et al., 2008; Niot et al., 2009), aqueles localizados na posição sn-2 do glicerol não ficam

disponíveis para a ação das dessaturases no enterócito (Mortimer et al., 1988). Por esse motivo, grande quantidade de ácidos graxos saturados na posição sn-2 alcança tanto o fígado quanto o tecido adiposo (Carta et al., 2015) e pode exercer ações deletérias sobre o metabolismo de hepatócitos e adipócitos.

O efeito dessas gorduras sobre o perfil lipídico plasmático e aspectos metabólicos foi muito pouco explorado até o momento. As investigações publicadas apresentam resultados controversos. Demonstrou-se, em indivíduos saudáveis, que o consumo de gorduras interesterificadas preparadas com óleo de palma por um período de três semanas não interferiu na concentração plasmática de triglicérides em jejum, quando comparado à ingestão de óleo de palma (Meijer & Weststrate, 1997). No período pós-prandial, observou-se que essas gorduras induziram menor concentração plasmática de triglicérides em mulheres saudáveis pós-menopausadas (Yli-Jokipii et al., 2001), em adultos jovens (Sanders et al., 2011) e em hipertrigliceridêmicos (Hall et al., 2014), em comparação ao óleo de palma. No entanto, o resultado foi oposto em indivíduos obesos (Robinson et al., 2009), nos quais as gorduras interesterificadas preparadas com óleo de soja rico em ácido oleico provocaram elevação da trigliceridemia pós-prandial, sugerindo que o grau de adiposidade prévia possa interferir na resposta ao seu consumo.

Com relação ao colesterol plasmático, o efeito das gorduras interesterificadas também tem se mostrado controverso. Demonstrou-se, em indivíduos normais, que as gorduras interesterificadas preparadas com ácido

palmítico induziram maior razão LDL/HDL e glicemia de jejum quando comparadas ao óleo de palma (Sundram et al., 2007). Em indivíduos hipercolesterolêmicos, as gorduras interesterificadas não alteraram a concentração plasmática de LDL-c, em comparação ao óleo de palma (Nestel et al., 1995). Mostrou-se, ainda, que o ácido graxo saturado na posição sn-2 pode prejudicar o metabolismo de LDL-c e da atividade da lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), enzima envolvida na fase inicial do transporte reverso de colesterol dos tecidos extra-hepáticos para o fígado (Hayes, 2001).

Figura 1. Processo de interesterificação. Óleos vegetais são misturados a gorduras totalmente hidrogenadas, saturadas, sob ação de catalisadores e elevada temperatura. São formadas gorduras interesterificadas com o mesmo número de ácidos graxos presentes nos óleos e gorduras iniciais. Legenda: Sat: ácidos graxos saturados; poli: ácidos graxos poli-insaturados.

Com relação ao efeito das gorduras enriquecidas com ácido esteárico, há apenas um estudo na literatura que avaliou o seu efeito sobre a lipemia pós-prandial. Nessa investigação, os autores evidenciaram menor concentração plasmática de triglicérides pós-prandiais com manteiga de cacau (rica em esteárico; sn-1 e sn-3), em comparação ao óleo de soja. Adicionalmente, encontrou-se nesse estudo, menor atividade do fator VII coagulante (Sanders et al., 2003). Posteriormente, o consumo de alimentos ricos em ácido esteárico também se relacionou com maior concentração de fibrinogênio plasmático, quando comparado à ingestão de dieta com elevado teor de palmítico ou oleico, após cinco semanas de tratamento. Destacou-se, ainda, a participação do esteárico na cascata de coagulação (Baer et al., 2004).

O efeito das gorduras interesterificadas sobre o perfil lipídico plasmático também foi avaliado em diversas investigações conduzidas em animais. Em ratos, gorduras interesterificadas ricas em ácido palmítico induziram menor concentração plasmática de colesterol quando comparadas ao óleo de palma (Ohara et al., 2009), além de maior expressão do receptor hepático de LDL (Reena et al., 2011) e do gene da enzima colesterol 7 α -hidroxilase (CYP7A1), a qual é responsável pela síntese de ácidos biliares, a partir do colesterol hepático (Reena et al., 2011).

A elucidação dos efeitos metabólicos da substituição de ácidos graxos *trans* por gorduras interesterificadas, as quais vêm sendo amplamente utilizadas no preparo de margarinas e outros alimentos industrializados, é de

grande relevância para a nutrição humana, especialmente pelo fato de tais produtos serem fontes importantes de ácidos graxos saturados.

1.3 ABSORÇÃO DAS GORDURAS ALIMENTARES

Aproximadamente 98% dos volumes de gordura alimentar são compostos por triglicérides (Thomson et al., 1989) e o consumo médio dos três principais ácidos graxos da dieta é de cerca de 6% de palmítico (16:0) e 6% de linoleico (18:2 ω -6), sendo que o de esteárico não ultrapassa (18:0) 3% das calorias totais (Wilke & Clandinin, 2005). O processo de absorção das gorduras só é possível a partir da hidrólise dos TG, a qual se inicia minimamente no estômago, por meio da enzima lipase gástrica (Carrière et al., 1993), e é concluída pela lipase pancreática no intestino (Shi & Burn, 2004). Essas lipases hidrolisam as ligações na posição sn-1 e sn-3 do glicerol na molécula de TG, resultando na liberação de ácidos graxos livres e na manutenção do ácido graxo da ligação sn-2 com a molécula de glicerol, absorvido como 2-monoacilglicerol (Storch et al., 2008).

Tanto os monoacilgliceróis como os ácidos graxos livres, quando em maior concentração, são absorvidos na vilosidade intestinal por difusão passiva e, sob menor concentração, por proteínas facilitadoras (Niot et al., 2009; Ramírez et al., 2001). Os ácidos graxos livres de cadeia muito longa (acima de 20 carbonos), em razão de serem extremamente hidrofóbicos, são absorvidos apenas pelo receptor *cluster de diferenciação 36* (CD36), considerado uma proteína facilitadora (Drover et al., 2008).

No interior do enterócito, os TG são formados por meio da reesterificação de ácidos graxos livres ao 2-monoacilglicerol proveniente da dieta ou, em pequena proporção no estado alimentar, pela ação da glicerol-3-fosfatase, que esterifica ácidos graxos livres aleatórios nas três posições da molécula de glicerol (Ramírez et al., 2001). Além disso, a taxa de absorção dos ácidos graxos da posição sn-2 da molécula de TG parece ser maior (Hunter, 2001; Carvajal et al., 2000; Ramírez et al., 2001) em comparação à forma de ácido graxo livre.

As moléculas de TG absorvidas por meio dos quilomícrons preservam a maioria dos ácidos graxos da posição sn-2 originais da dieta (Bysted et al., 2005; Carvajal et al., 2000). Os TG dos quilomícrons sofrem ação da enzima lipoproteína lipase, aderida ao endotélio dos tecidos extra-hepáticos (Mortimer et al., 1988), liberando ácidos graxos para a circulação, que serão preferencialmente depositados no tecido adiposo (Shi & Burn, 2004) e em menor escala no músculo.

Figura 2. Absorção da gordura alimentar no enterócito. Os triglicérides alimentares sofrem ação da enzima lipase pancreática na luz intestinal,

especificamente nas posições sn-1 e sn-3, sendo absorvidos dois ácidos graxos livres e um sn2-monoacilglicerol. No interior do enterócito, o sn2-monoacilglicerol é reesterificado a TG, utilizando dois ácidos graxos aleatórios. Legenda: col: colesterol; TG: triglicérides; AG: ácidos graxos; MGL: monoacilglicerol; ApoB48: apolipoproteína B48.

Após a sua hidrólise, esses quilomícrons transformam-se em remanescentes de quilomícron, os quais são captados pelo fígado por meio de receptores específicos (Mortimer et al., 1988; Shi & Burn, 2004). Em função de o ácido graxo na posição sn-2 ser preservado no remanescente de quilomícron, já se demonstrou maior conteúdo de ácidos graxos saturados incorporados à fosfolípide no fígado de ratos alimentados com gorduras interesterificadas, quando comparadas ao óleo de palma (Carta et al., 2015). Provavelmente, essa maior chegada de ácidos graxos saturados possa ser deletéria sobre o metabolismo lipídico hepático.

2. DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA (NAFLD)

A doença hepática gordurosa não alcoólica (*Nonalcoholic Fatty Liver Disease* -NAFLD) é uma das principais causas de anomalias crônicas no fígado (Argo et al., 2009). A sua prevalência é de 30% na população em geral e de 35% a 50% em indivíduos obesos (Festi et al., 2004).

2.1 DEFINIÇÃO E REPERCUSSÕES METABÓLICAS DA NAFLD

A NAFLD é uma condição clínica de amplo espectro que compreende desde esteatose até esteatohepatite não alcoólica (*Nonalcoholic Steatohepatitis* - NASH), podendo evoluir para fibrose, cirrose e carcinoma

hepatocelular (Serfaty & Lemoine, 2008). A esteatose é definida pela concentração superior a 5% dos TG nos hepatócitos (Rector et al., 2008). Apesar da etiologia e a progressão da NAFLD ainda não estarem totalmente estabelecidas, foi demonstrado que aproximadamente 60% dos ácidos graxos que compõem o TG hepático são provenientes da lipólise do tecido adiposo, 25% da lipogênese *de novo* e 15% da dieta (Donnelly et al., 2005; Trauner et al., 2010).

Apontada como umas das alterações metabólicas que compõem a síndrome metabólica, a NAFLD está diretamente associada à resistência à insulina, obesidade central, hipertrigliceridemia e redução nas concentrações plasmáticas de HDL e DM2. De fato, alguns estudos demonstraram que aproximadamente 90% dos indivíduos com NAFLD apresentam um ou mais componentes da síndrome metabólica, sendo que 30% exibiam todos os fatores (Targher & Arcaro, 2007; Rector et al., 2008).

O desenvolvimento da NAFLD está associado com o alto consumo de calorias e de gorduras, culminando em elevada concentração de AG no período pós-prandial, como demonstrado em indivíduos insulino-resistentes (Westerbacka et al., 2005), e maior formação de TG no fígado. Ao investigar os principais genes envolvidos na NAFLD, Westerbacka et al. (2007) encontraram maior expressão naqueles envolvidos no transporte e lipólise de ácidos graxos, recrutamento de monócitos/macrófagos e inflamação, dentre eles: proteínas ligadoras de ácidos graxos 4 e 5 (FABP 4 e 5), lipoproteína lipase, proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) e receptor ativado por proliferadores do peroxissomo gama-2, (PPAR γ -2).

Realmente, a expressão de PPAR γ no tecido hepático encontra-se aumentada em obesos e com resistência à insulina e se relaciona diretamente com a indução da proteína de ligação ao elemento responsivo a esteróides (SREBP-1c) (Pettinelli & Videla, 2011). Adicionalmente, o PPAR γ também está relacionado à redução na expressão de proteínas referentes à secreção hepática de VLDL-c, como a apoB e a proteína microsomal de transferência de TG (MTP). O SREBP-1c exerce a sua atividade transcricional sobre genes lipogênicos, como SCD-1, ácido graxo sintase (FAS) e acetil coA carboxilase (ACC) (Haas et al., 2008), concomitantemente ao aumento da enzima diacilglicerol acil transferase (DGAT) (Casaschi et al., 2005).

Esse aumento na lipogênese hepática também está associado ao prejuízo da β -oxidação mitocondrial e à redução na secreção de VLDL (Rector et al., 2008; Fabbrini et al., 2008).

Juntos, esses fatores contribuem para a progressão da NAFLD e incorrem em um quadro de NASH (Sutter et al., 2015), cujas características histopatológicas são esteatose com lesão hepatocelular, inflamação e vários graus de fibrose (Liu et al., 2016), além de corpos de Mallory, acúmulo de neutrófilos ao redor do hepatócito e de linfócitos e macrófagos no parênquima hepático (Kumar et al., 2010). Por esses motivos, a fisiopatologia de NASH está fortemente associada ao aumento de biomarcadores inflamatórios, lipotoxicidade e estresse oxidativo e do retículo endoplasmático (Cusi, 2009). Além disso, a secreção de citocinas inflamatórias ativa células de Kupffer e células estreladas, contribuindo para

o desenvolvimento de fibrose hepática (Liu et al., 2016), principalmente nos tratos portais e ao redor das vênulas hepáticas terminais (Kumar et al., 2010). Adicionalmente, o próprio estresse oxidativo e a peroxidação lipídica contribuem para maior produção de colágeno (Basaranoglu et al., 2013).

Figura 3. Evolução da esteatose hepática não alcoólica (NAFLD). Maior fluxo de ácidos graxos por: aumento da lipólise do tecido adiposo e da ingestão calórica e hiperinsulinemia → ativação de fatores de transcrição da via lipogênica (ChREBP e SREBP), culminando em maior lipogênese com crescimento da concentração de ácidos graxos e TG. 2- Esteatose: presença de resistência à insulina (RI), maior secreção de VLDL e maior taxa de β-oxidação mitocondrial como tentativa de normalizar o conteúdo lipídico do tecido hepático. 3- Progressão da doença com manutenção de elevada taxa de fluxo de ácido graxo livre e lipotoxicidade: disfunção mitocondrial, peroxidação lipídica aumentada, ativação da via inflamatória – JNK, NFkB e apoptose. 4 - Fibrose: maior concentração de macrófagos, células estreladas

e o hepatócito determinarão o grau de resposta fibrogênica e progressão para cirrose. Adaptado de Cusi, 2009.

2.2 ÁCIDOS GRAXOS ALIMENTARES E ESTEATOSE HEPÁTICA

Os ácidos graxos modulam diversos fatores de transcrição envolvidos no metabolismo lipídico, diferenciação celular e resposta inflamatória (Wellen & Hotamisligil, 2005). O consumo de dieta rica em ácidos graxos saturados contribui para o desenvolvimento da esteatose hepática (Wang et al., 2006), por ativar a expressão de DGAT-1 e SCD-1. Estas enzimas promovem lipogênese hepática e dessaturação dos ácidos graxos, respectivamente, (Casaschi et al., 2005) por induzir estresse de retículo (Wang et al., 2006).

Na vigência de NAFLD, independentemente da presença de obesidade, observa-se maior infiltrado de macrófagos e concentração de ceramidas no tecido adiposo (Kolak et al., 2007). As ceramidas estão associadas com a inibição da fosforilação da proteína quinase B (PKB/AKT), que é limitante na via de sinalização da insulina, prejudicando o metabolismo da glicose no tecido hepático (Maedler et al., 2001). Estudo em células revelou que a resistência à insulina induzida pelo ácido palmítico pode ser explicada por sua ação sobre a síntese de ceramidas (Schmitz-Peiffer, 1999).

É importante enfatizar que dietas hiperlipídicas enriquecidas com ácidos graxos saturados ou poli-insaturados induzem o mesmo grau de esteatose hepática (Machado et al., 2010), evidenciando que, além do tipo

de ácidos graxos, a quantidade de gordura também pode exercer efeitos deletérios sobre o infiltrado de lípidos no fígado (Machado et al., 2010).

3. TECIDO ADIPOSEO E OBESIDADE

3.1 REPERCUSSÕES METABÓLICAS DO TECIDO ADIPOSEO E OBESIDADE

O tecido adiposo, até duas décadas atrás, era considerado apenas um tecido com função de armazenar o excesso de energia na forma de gordura, em células especializadas, os adipócitos. Hotamisligil, Shargill & Spiegelman (1993), demonstraram que os adipócitos também desempenhavam função endócrina, por secretar citocina inflamatória, o $TNF\alpha$ (fator de necrose tumoral) capazes de induzir resistência à insulina e altamente secretadas em indivíduos obesos. Posteriormente, observou-se função mais ampla, sendo capaz de secretar diferentes tipos de citocinas inflamatórias, tais como o IL-6, (interleucina-6), IL-1 β (interleucina -1 β) e MCP-1 (Wellen & Hotamisligil, 2003), anti-inflamatória como adiponectina e hormônios, como a resistina e leptina (Greenberg & Obin, 2006; Weisberg et al., 2005).

A obesidade leva ao desequilíbrio na secreção desse grupo de substâncias, que culmina em alterações metabólicas importantes, como a resistência à insulina, tanto local quanto sistêmica (Coenen et al., 2007).

A resistência à insulina decorrente da obesidade, prejudica não apenas a captação de glicose em tecidos sensíveis, mas também a atenuação da lipólise (Guilherme et al., 2008). Durante o desenvolvimento da obesidade com hipertrofia dos adipócitos, aumento de ácidos graxos e TG circulantes,

além do acúmulo de lípidos no músculo, fígado e pâncreas, gerando um estado de lipotoxicidade e apoptose, condições implicadas na gênese de DCNT (Boden & Shulman, 2002).

O tecido adiposo expandido, na obesidade, secreta MCP-1, levando ao recrutamento de monócitos, que se diferenciam em macrófagos no tecido, levando ao aumento da secreção de adipocinas inflamatórias (Suganami & Ogawa, 2010). O TNF α não só induz estado inflamatório e recrutamento de macrófagos como também a lipólise por atenuar a atividade da antilipolítica da insulina que também está prejudicada em estados de resistência (Guilherme et al., 2008).

Em um estudo, camundongos submetidos a dieta hiperlipídica e à infusão crônica de recombinante de MCP-1 tiveram aumento de MCP-1 circulantes, além de desenvolverem resistência à insulina e apresentarem maior infiltrado de macrófagos no tecido adiposo, com aumento no conteúdo hepático de TG (Tateya et al., 2010). Além disso, em animais com ablação gênica de mcp-1 e do receptor de quimiocina C-C tipo 2 (CCr-2), também submetidos a dieta hiperlipídica apresentaram menor infiltrado de macrófagos no tecido adiposo, bem como resposta inflamatória e resistência à insulina diminuídas (Weisberg et al., 2006), demonstrando a relação entre gordura alimentar – macrófagos e resistência à insulina.

Os macrófagos infiltrados no tecido adiposo, assim como outras células do sistema imune, são a principal fonte de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL1- β e TNF α), que podem ter ação tanto parácrina quanto potencialmente endócrina, causando diminuição na sensibilidade à ação da insulina

(Greenberg & Obin, 2006). Em especial, a IL-6 inibe ação da lipoproteína lipase e aumenta a concentração plasmática de VLDL e ácidos graxos livres. (Andreozzi et al., 2007).

O conteúdo de macrófagos do tecido adiposo de animais obesos pode chegar a 40- 50% do total de células, número cinco vezes superior quando comparado ao volume encontrado nos de peso normal (Weisberg et al., 2006; Lumeng et al., 2007). O infiltrado de macrófagos no tecido de animais obesos apresenta perfil pró-inflamatório em comparação com os de peso normal (Olefsky & Glass, 2010; Lumeng et al., 2007). Além disso, a perda de peso é acompanhada pela redução de marcadores inflamatórios, bem como conteúdo de macrófagos (Greenberg & Obin, 2006).

O infiltrado de macrófagos no tecido adiposo de indivíduos normais e obesos difere não apenas em quantidade, mas também na proporção das subpopulações dessas células. Essas subpopulações são definidas, funcionalmente, por estados de polarização distintos, denominados M1 (via clássica de ativação com característica pró-inflamatória) e M2 (via alternativa de ativação com características anti-inflamatórias) (Itoh et al., 2011).

A heterogeneidade das subpopulações é reflexo da plasticidade e versatilidade dessas células, em resposta a diferentes estímulos ambientais, diferindo na expressão de receptor, produção de citocinas, função efetora e repertório de quimiocinas (Dalma et al., 2011). A forma M1, ou macrófagos ativados classicamente, pode ser induzida *in vitro* por mediadores inflamatórios como lipopolissacárides (LPS) e *interferon gamma* (IFN γ) e se relaciona com aumento da expressão das citocinas pró-inflamatórias, IL-6,

TNF- α , MCP-1 (Harford et al., 2011). Em decorrência do ambiente inflamado, há um bloqueio na ação da insulina nos adipócitos, devido à ativação de serinas quinases / *kappa* B quiinase beta (IKK β) e c-Jun N-terminal kinases (JNK), frequentemente encontradas em animais obesos, promovendo forte associação entre a inflamação e resistência à insulina (RI) (Lumeng et al., 2007). Além disso, na presença de RI há prejuízo da inibição da lipólise no estado pós-alimentar, aumentando a secreção de ácidos graxos (Morigny et al., 2016).

Macrófagos da classe M2 são induzidos pela exposição à IL-4 e IL-13 e se caracterizam por baixa expressão de citocinas pró-inflamatórias e elevada secreção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10. Adicionalmente, associam-se à ativação de fatores de transcrição envolvidos na oxidação de ácidos graxos e biogênese mitocondrial no tecido adiposo, que inclui PPAR γ e o coativador do receptor ativado por proliferadores de peroxissomos 1-beta PGC-1 β (Vats et al., 2006).

Macrófagos polarizados M1 estão relacionados à inflamação e destruição de tecidos, enquanto o estado polarizado M2 possui fenótipo anti-inflamatório e função associada a reparo de tecido e angiogênese (Harford et al., 2011). Estudo demonstrou que animais submetidos a dieta hiperlipídica apresentaram não apenas aumento no conteúdo dos macrófagos, como mudança na polarização dos macrófagos existentes no tecido adiposo, passando do estado M2 para M1, dentre outras consequências, prejudicando a capacidade de reparo tecidual (Lumeng et al., 2007).

Figura 4. Obesidade, resistência à insulina e inflamação no tecido adiposo. Na obesidade ocorre hipertrofia de adipócitos, maior infiltrado de macrófagos, inflamação, resistência à insulina e aumento da lipólise. Macrófagos M1 e ácidos graxos saturados presentes no tecido adiposo hipertrofiado ativam receptores TLR4 contidos na membrana celular dos adipócitos, promovendo a fosforilação de serinas quinases (IKK e JNK), capazes de ativar o NF-κB e AP-1, respectivamente. Estes se dirigem ao núcleo e iniciam a transcrição de citocinas e quimiocinas inflamatórias (TNFα, IL-1β, IL-6, MCP-1), envolvidas em vias de sinalização inflamatória, as quais serão traduzidas nos ribossomos. A ativação dessas serinas quinases também age na via de sinalização da insulina, ao fosforilar em serina os IRS, bloqueando a fosforilação da PI3K e, consequentemente, AKT, pois ambas são ativadas mediante fosforilação em tirosina quinase do IRS. A AKT inativa não sinaliza a translocação do GLUT4 para membrana celular, caracterizando resistência à insulina. Ao mesmo tempo, a AKT inativa não consegue bloquear a fosforilação da HSL, a qual fosforila continuamente a perilipina, quebrando o complexo com CGI-58, ativando, assim, a ATGL, com subsequente aumento da lipólise dos TG armazenados nas gotículas de gordura, e liberando os AGL, que serão direcionados ao fígado. Legenda: TLR4: Toll Like receptor 4; IKK: I kappa B quinase; JNK: c-

Jun N-terminal quinases; NF- κ B: fator nuclear kappa B; AP-1: proteína ativadora 1; TNF α : fator de necrose tumoral alfa; IL-1 β : interleucina 1 beta, IL-6: interleucina 6, MCP-1: fator quimioatraente de macrófago 1; IRS: substrato do receptor de insulina; PI3K: fosfatidilinositol quinase 3; AKT: proteína quinase B; GLUT4: transportador de glicose 4; ATGL: lipase do adipócito; HSL: lipase hormônio sensível; CGI-58: identificação gênica comparativa-58; TG: triglicérides; AGL: ácidos graxos livres.

3.2 GORDURAS ALIMENTARES E METABOLISMO DOS ADIPÓCITOS

Os ácidos graxos alimentares atuam em vias metabólicas no tecido adiposo, modulando a expressão de genes envolvidos na lipogênese, lipólise, diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos e liberação de citocinas anti ou pró-inflamatórias (Manickam et al., 2010; Oster et al., 2010). Participam, também, da modulação da expressão de PPAR γ , fator de transcrição envolvido na adipogênese, diferenciação de adipócitos e sensibilidade à insulina (Sauma et al., 2006). Estudos *in vivo* em camundongos e *in vitro* mostraram que os ácidos graxos saturados não alteraram a expressão de PPAR γ (Manickam et al., 2010; Saravanan et al., 2005; Oster et al., 2010), mas são capazes de induzir aumento na atividade deste gene em adipócitos humanos (Sauma et al., 2006).

Estudos *in vitro* mostraram que os ácidos graxos saturados aumentam a atividade e expressão do fator nuclear kappa B (NF κ B) em adipócitos, culminando com a elevação na expressão e na secreção das citocinas inflamatórias IL-6 e TNF α e redução da citocina anti-inflamatória IL-10 (Bradley et al., 2008; Saravanan et al., 2005). Em razão de os ácidos graxos saturados serem ligantes de *Toll Like Receptor 4* (TLR4) em células

como macrófagos (Suganami et al., 2007), são capazes de ativar via de sinalização inflamatória, por meio da expressão do NFkB, *downstream* a fosforilação da I kappa B kinase beta (IKK β) (Youssef-Elabd et al., 2012). Em condições de repouso, os dímeros de NFkB estão ligados às proteínas I kappa B inibitória (I κ B) (Oeckinghaus et al., 2011). A ativação do NFkB ocorre via degradação do complexo NFkB-I κ B, induzida por fosforilação da IKK. As proteínas I κ B fosforiladas são alvos para a ubiquitinação e degradação proteossômica, que, assim, liberta o NFkB para que possa translocar-se ao núcleo (Oeckinghaus et al., 2011), ligando-se a regiões específicas. Isso permite a transcrição de genes envolvidos na resposta inflamatória, como as citocinas TNF α e IL-1 β (Hoffmann & Baltimore, 2006).

Células sensíveis à insulina, como os adipócitos, apresentam receptores para TNF α na membrana celular. O TNF α ativado induz a fosforilação dos receptores de insulina em serinas quinases, como JNK, IKK β e proteína quinase C (PKC), resultando em resistência à insulina nos adipócitos, por impedir a fosforilação dos substratos de receptor de insulina (IRS) em tirosinas quinases (Samuel & Shulman, 2012). A ativação dessa via inflamatória também induz o aumento na expressão de MCP-1, favorecendo, assim, o acréscimo do infiltrado de macrófagos no tecido adiposo (Coenen et al., 2007).

Alguns estudos têm encontrado forte associação entre o consumo de ácidos graxos *trans* e saturados e a modulação de citocinas inflamatórias, demonstrando incremento na expressão gênica (Saravanan et al., 2005; Bradley et al., 2008), especialmente em comparação com os ácidos graxos

poli-insaturados (Baer et al., 2004). A maior ingestão de ácidos graxos saturados reduz a expressão de adiponectina e aumenta a de resistina. Ambas apresentam ações contrárias. A primeira atua expandindo a sensibilidade à insulina e a β -oxidação, ao passo que a segunda inibe a fosforilação da subunidade beta do IR-1, levando à resistência à ação deste hormônio (Qatanani et al., 2009).

4. JUSTIFICATIVA

Em razão das ações deletérias dos ácidos graxos *trans*, as atuais diretrizes nacionais e internacionais recomendam a sua retirada da dieta, por se relacionarem ao aumento do risco de doenças metabólicas e cardiovasculares. Em substituição aos ácidos graxos *trans*, a indústria alimentícia vem utilizando óleos fontes de ácidos graxos saturados, como o palmítico ou esteárico, tanto na sua configuração original, como na forma interesterificada (Hunter, 2006). Até o momento, publicaram-se poucos estudos sobre a ação dessas gorduras do ponto de vista cardiovascular e também metabólico. Recente publicação do nosso grupo mostrou que gorduras interesterificadas enriquecidas com ácido palmítico induziram maior desenvolvimento de placa aterosclerótica em camundongos LDLr-KO (Afonso et al., 2016). Em razão de a doença cardiovascular estar intimamente relacionada a alterações metabólicas, tal investigação apresenta como hipótese o fato de que a maior incorporação de ácidos graxos saturados provenientes das gorduras interesterificadas poderia exercer ações deletérias sobre o metabolismo lipídico hepático e do tecido adiposo, mecanismos que não se encontram elucidados na literatura.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de dieta hiperlipídica preparada com gordura interesterificada, enriquecida com ácido graxo palmítico ou esteárico, sobre o metabolismo lipídico hepático e do tecido adiposo em camundongos com ablação gênica para o receptor de LDL (LDLr-KO).

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito do consumo de gorduras interesterificadas sobre:

- O acúmulo de lípidos e genes envolvidos no metabolismo lipídico hepático.
- A morfologia do tecido adiposo e hepático.
- A expressão gênica e conteúdo proteico de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, enzimas lipogênicas e lipolíticas nos tecidos adiposo e hepático.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Utilizaram-se camundongos LDLr-KO (C57BL/6J; Jackson Laboratory, Bar Harbor, EUA). Esse modelo foi escolhido pelo fato de os animais apresentarem perfil de lipoproteína e suscetibilidade à aterosclerose semelhantes a humanos, em resposta ao consumo de gorduras. Dessa forma, é considerado adequado para estudo de síndrome metabólica, com avaliação dos tecidos hepático e adiposo (Srivastava et al., 2006; Bell et al., 2007; Wang et al., 2009; Subramanian et al., 2008; Machado et al., 2010; Bieghs et al., 2012).

Bieghs et al. (2012) investigaram diferentes modelos de animais que mantivessem inflamação característica de NASH após consumo prolongado de dieta hiperlipídica. Após três meses de tratamento, apenas os camundongos LDLr-KO sustentaram a resposta inflamatória em comparação aos C57BL6, demonstrando infiltrado de macrófagos, neutrófilos e células T, assim como maior expressão de Tnf, Mcp-1 e Cd68.

Em outro estudo, camundongos LDLr-KO também submetidos a dieta hiperlipídica apresentaram mais fibrose, junto com aumento de peso, com inflamação de tecido adiposo, e desenvolveram aterosclerose, em comparação ao seu *background* (Neuhofer et al., 2014).

6.2 TRATAMENTO EXPERIMENTAL

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CEP 026/12) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (**Anexo 3**).

Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa ($55 \pm 10\%$) controladas e ciclo claro/escuro de 12 horas. Tanto as dietas quanto água foram oferecidas *ad libitum*.

Após o desmame, os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos de 20 (**Figura 5**), os quais foram denominados: Poli-insaturados (POLI), Palmítico (PALM), Palmítico Interesterificado (PALM INTER), Esteárico (ESTEAR) e Esteárico Interesterificado (ESTEAR INTER).

As rações com palmítico ou esteárico apresentaram maior porcentagem desses ácidos graxos principalmente nas posições sn-1 e sn-3 da molécula de triglicérides. As preparadas com palmítico interesterificado ou esteárico interesterificado continham maior porcentagem desses, principalmente na posição sn-2 da molécula de triglicérides.

Os camundongos foram submetidos a dieta hiperlipídica (40% do valor calórico total, sob a forma de gordura), preparada pela Nutriexperimental (Campinas, SP, Brasil), seguindo as recomendações do *American Institute of Nutrition* (Reeves et al., 1993). A composição de ácidos graxos das gorduras é apresentada na tabela 1. Nas cinco dietas, a concentração de ácidos graxos monoinsaturados foi normalizada para evitar efeitos específicos destes. A quantidade de ácidos graxos saturados foi a

mesma, tanto nas dietas preparadas com óleos, como naquelas preparadas com gorduras interesterificadas.

O consumo alimentar e o peso dos animais foram monitorados semanalmente durante todo o experimento.

Tabela 1. Composição média, em porcentagem, de ácidos graxos das diferentes gorduras utilizadas na fabricação das rações.

ÁCIDOS GRAXOS	POLI (%)	PALM (%)	PALM INTER (%)	ESTEAR (%)	ESTEAR INTER (%)
C12:0	0	0,24	0,22	0,06	0,07
C14:0	0,07	0,92	0,95	0,11	0,08
C16:0	5,49	40,00	40,82	5,82	5,02
C18:0	3,17	5,06	4,60	39,72	40,47
C18:1tr	0,05	0,22	0,08	0,26	0,07
C18:1c	39,94	39,89	39,68	40,35	40,38
C18:2tr	0,25	0,72	0,39	0,27	0,12
C18:2c,c	45,55	11,33	11,70	9,79	10,16
C18:3tr	0,14	0,10	0,08	0,20	0,06
C18:3c,c,c	3,12	0,30	0,41	0,88	1,26
C20:0	0,47	0,43	0,39	1,05	1,06
C20:1	0,72	0,29	0,22	0,46	0,34
C22:0	0,68	0,11	0,10	0,71	0,68
Outros	0,05	0,02	0,05	0,06	0,02
Total SAFA	9,89	46,76	47,10	47,47	47,38
Total MUFA	40,66	40,18	39,90	40,81	40,72
Total PUFA	48,67	11,63	12,11	10,67	11,42
Total TRANS	0,44	1,04	0,55	0,73	0,25

Os óleos foram desenvolvidos e doados pela Cargill Agrícola S/A.

Figura 5. Resumo do protocolo experimental

6.3 DISTRIBUIÇÃO REGIOESPECÍFICA DOS ÁCIDOS GRAXOS NA MOLÉCULA DO GLICEROL

Determinou-se a posição do ácido graxo na molécula do glicerol por método quantitativo de gorduras por Ressonância Nuclear Magnética, segundo metodologia descrita previamente por Vlahov et al. (1998) e Silva et al. (2010).

Tabela 2. Distribuição regioespecífica dos ácidos graxos na molécula do glicerol, em porcentagem.

Ácidos Graxos	Posição	PALM (%)	PALM INTER (%)	ESTEAR (%)	ESTEAR INTER (%)
Saturados	sn-1,3	67,7	50,4	56,2	48,9
	sn-2	9,7	49,0	47,3	45,3
Monoinsaturados	sn-1,3	25,2	37,0	34,2	40,2
	sn-2	65,1	37,5	36,8	41,4
Poli-insaturados	sn-1,3	7,1	12,7	9,6	10,9
	sn-2	25,2	13,5	15,9	15,4

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

A tabela 2 apresenta os resultados da ressonância nuclear magnética, indicando a mudança do ácido graxo palmítico da posição sn-1 e sn-3 para a sn-2 da molécula do glicerol, com maior porcentagem nesta, após o processo de interesterificação (**Anexo 1 e 2**).

Nos óleos vegetais, a sn-2 dos triglicérides contém principalmente ácidos graxos insaturados, sendo que, na gordura interesterificada, essa posição é ocupada por saturados.

6.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Após 16 semanas de consumo de dieta hiperlipídica, os animais foram mantidos em privação alimentar por 12 horas e anestesiados com Ketamina (100 mg/kg, *ip*, Ketalar; Parke-Davis, São Paulo, SP, Brasil) e Xylazina (10 mg/kg, *ip*, Rompum; Bayer S.A, São Paulo, SP, Brasil). Em seguida, foram dessangrados pela veia subclávia. Coletou-se o sangue em tubos contendo EDTA (0,1%). Após dessangrados, os animais foram perfundidos com solução gelada de cloreto de sódio a 0,9%, pelo ventrículo esquerdo.

Realizou-se a coleta de fezes, 1 semana antes do sacrifício por um período de 24 horas, utilizando-se gaiolas metabólicas individuais.

6.4 EXTRAÇÃO DOS TECIDOS

Após laparotomia, o fígado e o tecido adiposo branco subcutâneo da região abdominal e visceral da região epididimal foram extraídos e pesados.

Do fígado e tecido adiposo visceral, foram retirados um fragmento de aproximadamente 1,0 cm³ e colocados em frasco contendo formol a 10%, em banho para adequada fixação. O restante destes tecidos foi, imediatamente, congelado em nitrogênio líquido e estocados em ultracongelador (-80°C).

6.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

O plasma foi obtido por centrifugação por 10 min, 3000 rpm a 4°C e armazenado a -80°C. A concentração plasmática de CT e TG foi determinada por Kit enzimático-colorimétricos (Roche Diagnostics, Alemanha). Glicose e alanina aminotransferase (ALT) foram determinadas com a utilização de kits enzimático-colorimétricos (Labitest Diagnóstica, Brasil).

6.7 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO HEPÁTICA DE COLESTEROL E TRIGLICÉRIDES

Realizou-se a extração de lípides hepáticos segundo Carr et al., (1993). Aproximadamente 200 mg de fígado foram homogeneizados e os lípides, extraídos com 6 mL de solução (2:1) de clorofórmio: metanol. As

fases foram separadas pela adição de H_2SO_4 a 0,05%. A fase inferior foi removida e adicionado 1 mL de clorofórmio contendo 0,5% de Triton X-100, para solubilização dos lípides. Em seguida, mantiveram-se os tubos sob nitrogênio em temperatura ambiente, para evaporação total do solvente. Os tubos foram lavados com clorofórmio e, em seguida, novamente submetidos a evaporação sob nitrogênio. Após adição de 1 mL de água destilada, receberam banho com agitação (37°C por 15 min) e a amostra homogeneizada em vortex. A mistura foi utilizada para determinação do conteúdo de CT e TG, com o uso de *kits* enzimático-colorimétricos (Roche Diagnostics-Mannheim, Alemanha).

6.8 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NAS FEZES

6.8.1 EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO LIPÍDICA

Extraíram-se os lípides das fezes conforme método preconizado por Folch et al. (1957). Para isso, foram pesados aproximadamente 200 mg de tecido e, para análise da gordura das fezes, utilizou-se o conteúdo coletado durante 24 horas, uma semana antes do sacrifício.

Em cada amostra foi adicionado 1 mL de metanol, havendo homogeneização por um minuto. Em seguida, adicionou-se 2 mL de clorofórmio e a amostra foi novamente homogeneizada por mais dois minutos. Filtrou-se a mistura obtida e o resíduo contido no filtro foi homogeneizado com 3 mL da solução clorofórmio: metanol (2:1), por mais três minutos, e filtrado novamente. O tubo de extração foi lavado com 2 mL de clorofórmio e o resíduo remanescente no filtro foi lavado com 1 mL de

metanol. O filtrado foi armazenado em uma proveta e o volume, medido para acréscimo de 2,5 mL de cloreto de potássio a 0,88%. Após essa etapa, agitou-se manualmente a mistura e a fase superior foi aspirada. Aferiu-se, a seguir, o volume residual com a finalidade de adicionar $\frac{1}{4}$ da solução metanol: água (1:1). Após uma hora da agitação, a fase superior foi aspirada e a solução restante filtrada em sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado em rotaevaporador micronal (modelo B525, Piracicaba, Brasil), a 35°C.

O conteúdo de lípidos foi suspenso em 2 mL de clorofórmio, transferido para tubos de vidro com tampa rosqueada e o solvente foi evaporado com nitrogênio gasoso. Para a saponificação dos ácidos graxos, adicionaram-se 3,125 µg do padrão interno (ácido heptadecanoico, concentração 2,5 mg/mL) e 1 mL de hidróxido de potássio (KOH) diluído em etanol (1 mol/L). Posteriormente, ocorreu incubação por uma hora, a 60°C. Para a obtenção da fração lipídica, foram adicionados 1 mL de água milliQ e 2 mL de hexana, com posterior agitação. A seguir, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos, a 2.000 rpm, e o sobrenadante, transferido para outro tubo de vidro. Acrescentou-se 2 mL de hexana e a centrifugação foi repetida. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, juntando-se com a primeira extração. Finalmente, as amostras foram submetidas a evaporação a vácuo, à temperatura ambiente, utilizando-se equipamento EZ-2 plus (Genevac, EUA).

Realizou-se a esterificação da fração lipídica pelo método de Kramer et.al. (1997). A seguir, adicionaram-se 300 µl de trifluoreto de boro (BF₃-

14%) e 100 µl de tolueno à fração lipídica e se aqueceu em banho-maria, a 50°C, por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram resfriadas em água corrente e se adicionaram 5mL de ácido acético glacial, 0,5 mL de água destilada e 1 mL de hexana. Para a secagem das amostras, seguiram-se as mesmas etapas utilizadas na saponificação.

Para finalizar, as amostras foram ressuspendidas em 200 µL de hexana, transferidas para tubos *insert vial* e analisadas em cromatógrafo a gás (Shimatizu GC-2010, Kyoto, Japão), utilizando-se coluna de sílica fundida SP-2560 (bis-cianopropilpolisiloxana) de 10 m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,2 µm de espessura da fase estacionária. O gás de arraste foi o hélio e a razão de divisão da amostra no injetor, 1:50. Os picos foram identificados comparando-se os tempos de retenção dos padrões de metil éster (Supelco 18919, Bellefonte, EUA). As áreas foram quantificadas por meio do programa *Postrun Annalyses*.

6.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA E GRADAÇÃO DA DOENÇA HEPÁTICA

6.9.1 HEMATOXILINA E EOSINA

O fragmento do fígado foi colocado em frasco contendo formol a 10% e posteriormente processado com álcool, em crescentes concentrações (70%, 80%, 95% e 100%), xilol e parafina. Em seguida, os fragmentos emblocados em parafina foram seccionados em cortes de 4,0 µm e fixados em lâminas de microscopia.

A análise histológica do fígado foi realizada utilizando-se cortes de tecido hepático e corados com hematoxilina/eosina (HE). Determinaram-se as variáveis histológicas por análise cega, utilizando-se o método adaptado de *Nonalcoholic Fat Liver Disease Activity Score*, definido pelo *Pathology Committee of the NASH Clinical Research Network* (Kleiner et al., 2005). O escore é determinado pela soma dos graus de esteatose (0-3), inflamação lobular (0-3), balonização (0-2) e fibrose (0-2). Valor de escore igual ou superior a cinco é compatível com o diagnóstico de NASH; valores entre três e quatro podem ser alocados nas categorias de ausência, presença ou provável NASH; e inferiores a três indicam ausência de NASH.

6.9.2 ANÁLISE DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO DE NEUTRÓFILOS NO PARÊNQUIMA HEPÁTICO

Lâminas de tecido hepático coradas com HE foram avaliadas em microscópio de luz, em aumento de 40x. Os neutrófilos foram identificados

pelo aspecto nuclear e citoplasmático e contados em 20 campos do parênquima hepático ($3,4 \text{ mm}^2/\text{lâmina}$), adaptado de Abdelmegeed et al. (2013). Os neutrófilos das regiões central ou periportal, bem como os presentes no interior de granulomas, não foram considerados. O infiltrado inflamatório de neutrófilos presente no parênquima hepático é apresentado em número de células/ mm^2 .

6.9.3 ANÁLISE DA FIBROSE NO PARÊNQUIMA HEPÁTICO

Lâminas de tecido hepático coradas com *Picrossirius red* foram avaliadas em microscópio de luz, em aumento de 20x. A fibrose foi considerada em quatro formações distintas: perisinusoidal, periportal, cicatrização (*bridging*) e cirrose. Atribuiu-se escore de zero a três, conforme descrição proposta por Kleiner et al. (2005): zero – fibrose ausente; um – fibrose perisinusoidal ou periportal; dois - fibrose perisinusoidal e periportal; três – *bridging* ou cirrose. Ainda para o escore um, há as seguintes subdivisões: 1a – fibrose leve em zona 3 perisinusoidal; 1b - fibrose moderada em zona 3 perisinusoidal; 1c – fibrose periportal.

O conteúdo de colágeno foi avaliado nas mesmas lâminas da classificação do escore de fibrose para a gradação da doença hepática. O volume de colágeno foi expresso como percentual em relação ao perímetro do vaso da veia centro lobular (VCL) e tríade portal pelo programa Leica Qwim.

7. ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO ADIPOSEO VISCERAL

Seguindo mesmo protocolo da histologia do fígado, um fragmento do tecido adiposo visceral foi colocado em frasco contendo formol a 10% e processado, fixado e corado igualmente ao tecido hepático.

Lâminas coradas com HE foram avaliadas e fotografadas em microscópio de luz, em aumento de 20x. O diâmetro dos adipócitos foi avaliado para obtenção da área (μm^2) pelo programa Image J. Mensuraram-se 70 a 100 adipócitos por animal, avaliando-se 10 animais por grupo.

8. IMUNOHISTOQUÍMICA

Lâminas com tecido hepático fixado em parafina foram submetidas a marcação simples, usando-se o anticorpo anti-integrin- αM (CD11b+) (H61) (SC286644; rabbit polyclonal, Santa Cruz), de acordo com protocolo previamente descrito por Araújo et al. (2004). Realizaram-se análise e documentação dos resultados utilizando-se o microscópio de imunofluorescência Leica FW 4500 B.

9. IMMUNOBLOT

O tecido adiposo visceral e hepático congelados foram homogeneizados em tubos de ensaio, contendo 2 mL do tampão de extração em cada um, durante 20 segundos, com o processador polytron® PTA 20S (modelo PT 10/35, Brinkmann Instruments, Westbury, NY, EUA),

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% (Merck) em todas as amostras, mantidas em gelo. Após 40 minutos, os materiais extraídos e homogeneizados foram centrifugados, utilizando-se o sobrenadante para as demais etapas.

Alíquotas contendo 100 µg de proteína por amostra foram aplicadas sobre gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de 1,5 mm de espessura. No mesmo gel, foi aplicada amostra padrão de proteínas com pesos moleculares conhecidos. Realizou-se a eletroforese em cuba de minigel da Bio Rad (Mini-Protean) (Hercules, CA, EUA), com solução tampão para eletroforese, previamente diluída. O SDS-PAGE foi submetido a 25 Volts, inicialmente, 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 duas horas, sob refrigeração contínua em gelo. As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas foram incubadas em solução bloqueadora por duas horas, à temperatura ambiente, para diminuir a ligação inespecífica de proteínas. A seguir, as membranas foram lavadas com solução basal por três sessões de cinco minutos e incubadas com os anticorpos específicos. Após a incubação, foram mantidas sob agitação

constante, por 10 horas, a 4°C. Em seguida, lavadas novamente com solução basal por três sessões de cinco minutos. Posteriormente, foram incubadas por duas horas em solução com o anticorpo secundário marcado com peroxidase e lavadas três vezes, por cinco minutos cada. Às membranas, adicionou-se 1,0 mL de cada reagente do kit de quimioluminescência (super signal West Pico Luminol). Foram reveladas no fotodocumentador (Gel Doc 2000, Bio-Rad). Após exposição e registro das bandas no fotodocumentador, a quantificação das bandas foi feita em programa de leitura Un-Scan-It gel 6.1.

Analísaram-se as proteínas FAS_ácido graxo sintase (#4233L; rabbit polyclonal) e p-IKB α (#9246L rabbit polyclonal) pela Cell Signaling (Danvers, MA, USA); p-IKK (sc23470R; goat polyclonal) e p-JNK (sc6254 mouse monoclonal) pela Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA); e IL-1 β (BIOL-503505, mouse & rat monoclonal); e TNF- α (BIOL-506101 mouse & rat monoclonal) pela BioLegend (San Diego, CA, EUA).

10. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR EM FÍGADO E TECIDO ADIPOSEO VISCERAL

O tecido hepático e adiposo visceral foram macerados e ressuspendidos 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 18 e 28s, bem como a quantificação

do RNA total foram determinadas em Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

O RNA extraído foi convertido a cDNA, por transcrição reversa, utilizando-se o kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A reação foi processada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Waltham, MA, EUA), de acordo com o protocolo do produto, partindo-se de uma concentração inicial de 500 ng de RNA/μL. Em seguida, foi realizada a análise da expressão gênica por amplificação do cDNA, em tempo real. Utilizaram-se sondas marcadas com FAM, adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), identificadas pelos códigos: IL-10 (Mm00439614_m1, *Il10*), IL-1β (Mm00434228_m1, *Il1b*), IL-6 (Mm00550338_m1, *Il6*), TNF-α (Mm00443258_m1, *Tnf*), MTP (Mm00435015_m1, *Mttp*), SREBP-1c (Mm00446190_m1, *Srebf1*), PPARγ (Mm00435015_m1, *Pparg*), PPARα (Mm00440939_m1, *Ppara*), FAS (Mm00662319_m1, *Fasn*), CPT-1a (Mm01231183_m1, *Cpt1a*), SCD-1 (Mm00772290_m1, *Scd1*), PGC1α (Mm00447183_m1, *Ppargc1a*), HSL (Mm00495359_m1, *Lipe*), ATGL (Mm00503040_m1, *Pnpla2*), Perilipin 1 (Mm00558672_m1, *Plin1*), Adiponectin (Mm00456425_m1, *Acrp30*) e HPRT (Mm03024075_m1, *Hprt*), β-2m (Mm00437762_m1, *B2m*).

A programação da amplificação foi: um ciclo de 2 minutos, a 50°C; um ciclo de 10 minutos, a 95°C; e 40 ciclos intercalando 15 segundos, a 95°C, e um minuto, a 60°C. As reações de PCR em tempo real foram realizadas no aparelho *Step One Plus Real Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster

City, CA, EUA). Os valores de expressão gênica foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, no qual $\Delta C_t = C_t \text{ gene alvo} - C_t \text{ do controle endógeno}$, considerando-se a eficiência do ensaio (90 a 110%) (Livak e Schmitgen, 2001).

11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Apresentaram-se os resultados em média $\pm$ erro padrão e para resultados de biologia molecular média $\pm$ desvio padrão. A significância estatística foi testada por ANOVA *One-way* seguido do teste de Newman-Keuls para dados paramétricos ou por Kruskal-Wallis para dados não paramétricos. Foi considerado o nível de significância de 5% para todas as análises ($P < 0,05$). A avaliação dos dados foi feita com uso do programa *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

12. RESULTADOS

12.1 CONSUMO ALIMENTAR, GANHO DE PESO E TECIDO ADIPOSE DOS ANIMAIS

Os grupos de animais apresentaram média de peso inicial e consumo alimentar similares durante as 16 semanas ao longo do estudo (**Tabela 3**). O ganho de peso foi igual entre os grupos POLI, PALM e PALM INTER. Entretanto, PALM INTER foi maior do que ESTEAR e ESTEAR INTER.

A formação de tecido adiposo visceral e subcutâneo dos animais do grupo PALM INTER foi maior em relação à dos demais. Além disso, o tecido adiposo epididimal desses animais apresentou adipócitos de maior diâmetro, com características de hipertrofia celular (**Tabela 3**). Em contrapartida, os animais do grupo ESTEAR, na comparação com os demais, tiveram menor formação de tecido adiposo visceral e subcutâneo, sem diferença no ganho de peso em relação a POLI e ESTEAR INTER.

Quanto ao conteúdo e teor de gordura fecal, os grupos ESTEAR e ESTEAR INTER apresentaram maior peso em comparação aos demais (**Tabela 3**).

12.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As concentrações plasmáticas de CT, TG, insulina e glicose dos animais que consumiram ambas as dietas ricas em ácido palmítico (PALM e PALM INTER) foram maiores, na comparação com os grupos POLI, ESTEAR E ESTEAR INTER (**Tabela 4**), demonstrando que o processo de

interesterificação não altera as concentrações plasmáticas desses parâmetros. No tocante à concentração de ALT, proteína de fase aguda que sugere desenvolvimento de lesão hepática, não houve diferença entre os grupos.

A concentração plasmática de TG foi maior nos animais que ingeriram dietas enriquecidas com ácidos graxos saturados (PALM, PALM INTER, ESTEAR e ESTEAR INTER), quando comparados ao grupo POLI. Dessa maneira, o maior consumo de ácido graxo esteárico, antes ou após a interesterificação, não elevou a concentração plasmática de colesterol, assim como os demais saturados (PALM E PALM INTER). No entanto, exercem efeitos semelhantes na concentração plasmática de triglicérides **(Tabela 4)**.

Tabela 3. Peso inicial, consumo alimentar, ganho de peso, tecido adiposo visceral e subcutâneo e diâmetro dos adipócitos de camundongos LDLr-KO submetidos às diferentes dietas experimentais por 16 semanas.

	POLI	PALM	PALM INTER	ESTEAR	ESTEAR INTER
PESO INICIAL (g)	13,45 ±0,60	13,46 ±0,82	13,93 ±0,71	13,70 ±0,66	14,58 ±0,61
CONSUMO (g)	2,88 ± 0,09	3,15 ± 0,29	3,16 ± 0,20	3,48 ± 0,19	3,30 ± 0,10
GANHO DE PESO (g)	16,01 ±0,82 ^{a,b}	16,12 ±0,83 ^{a,b}	18,10 ±1,02 ^a	14,20 ±0,74 ^b	14,32 ±0,71 ^b
TA VISCERAL (g/100g de peso corporal)	3,22 ±0,22 ^b	3,33 ±0,29 ^b	4,04 ±0,14 ^a	2,01 ±0,22 ^c	2,76 ±0,29 ^b
ÁREA DOS ADIPÓCITOS (µm ²)*	3101 ±244,8 ^b	2804 ±234,4 ^b	4356 ±449,9 ^a	2821 ±213,7 ^b	2110 ±238,1 ^b
TA SUBCUTANEO (g/100g de peso corporal)	1,68 ± 0,13 ^b	1,63 ± 0,14 ^b	2,17 ± 0,11 ^a	1,12 ± 0,01 ^c	1,53 ± 0,45 ^b
PESO DAS FEZES (g/por 24 horas)*	0,13 ± 0,02 ^b	0,13 ± 0,01 ^b	0,13 ± 0,02 ^b	0,34 ± 0,04 ^a	0,29 ± 0,03 ^a
GORDURA NAS FEZES (mg/por 24 horas)*	12,43 ±1,44 ^b	7,97 ±0,73 ^b	9,29 ±1,23 ^b	32,51 ±14,24 ^a	15,67 ±4,2 ^a

Legenda: TA = tecido adiposo. n = 13-19; *n=10. Dados apresentados em média±EP; médias na mesma linha com letras distintas são significativamente diferentes (p<0,05), sendo a>b>c; o teste estatístico: One-way ANOVA, seguindo de pós-teste de Newman-Keuls. GORDURA NAS FEZES foi analisado pelo teste não paramétrico *Kruskal Wallis* seguido pelo pós-teste de Dunn.

Figura 6. Tecido adiposo epididimal dos camundongos LDLr-KO que receberam, durante 16 semanas, dieta hiperlipídica diferindo na concentração de ácidos graxos e processo de interesterificação. O grupo PALM INTER apresenta adipócitos hipertrofiados em comparação aos demais grupos. Lâminas com

tecido processado para análise histológica com HE (n=10). Fotos representativas em 20X. Legenda: POLI dieta com gordura rica em ácidos graxos polinsaturados, PALM:dieta com gordura rica em ácido palmítico, PALM INTER dieta com gordura rica em ácido palmítico interesterificado, ESTEAR dieta com gordura rica em ácido esteárico e ESTEAR INTER dieta com gordura rica em ácido esteárico interesterificado.

Tabela 4. Concentração plasmática de colesterol, triglicérides, ALT, glicemia e insulina de camundongos LDLr-KO submetidos às diferentes dietas experimentais por 16 semanas.

	POLI	PALM	PALM INTER	ESTEAR	ESTEAR INTER
COLESTEROL (mg/dL)	320,7 ± 12,66 ^b	499,2 ±22,48 ^a	526,8 ±20,65 ^a	342,6 ± 21,83 ^b	363,9 ± 22,46 ^b
TG (mg/dL)	129,9 ± 12,37 ^b	308,8 ±22,48 ^a	302,8 ±20,65 ^a	238,7 ±21,83 ^a	236,9 ±22,46 ^a
ALT (mg/dL)	37,73 ±12,37	61,29 ±7,63	51,63 ±12,24	48,35 ±14,38	57,97 ±14,13
GLICOSE (mg/dL)	231,7 ±12,97 ^{b,c}	336,2 ±33,90 ^a	328,1 ±27,63 ^a	210,5 ±20,06 ^c	287,7 ±15,65 ^b
INSULINA (mg/dL)	0,33 ±0,03 ^b	0,84 ±0,12 ^a	0,71 ±0,09 ^a	0,28 ±0,05 ^b	0,23 ±0,03 ^b

Dados apresentados em média ±EP; letras diferentes representam p<0,05, com a>b; n = 13–19. O teste estatístico: One-way ANOVA, seguido de pós-teste: Newman-Keuls. TG, ALT e GLICOSE foram analisados pelo teste não paramétrico *Kruskal Wallis* seguido pelo pós-teste de Dunn. Legenda: TG: triglicérides; ALT: alanina transaminase.

12.3 ÁREA DOS ADIPÓCITOS, EXPRESSÃO GÊNICA E SÍNTESE DE PROTEÍNAS NO TECIDO ADIPOSEO VISCERAL

O grupo PALM INTER apresentou maior formação de tecido adiposo visceral com hipertrofia de adipócitos (**Tabela 3**), o que levou à investigação de vias moleculares relacionadas à inflamação e lipólise. A análise da expressão de genes envolvidos em vias inflamatória e anti-inflamatória não diferiu entre os grupos (**Figura 7 A-F**). No entanto, o grupo PALM INTER teve menor expressão da proteína ATGL (*gene Ppla2*) em relação a PALM, sem apresentar diferença na expressão das demais enzimas lipolíticas como perilipina (*gene plin1*) e lipase hormônio sensível (*gene lipe*). Ambos os grupos ricos em ácido esteárico apresentaram maior expressão da enzima SCD-1 (**Figura 7F**).

Figura 7. Análise da expressão de genes de tecido adiposo epididimal relacionados às vias inflamatórias, anti-inflamatória, lipolítica e lipogênica de camundongos LDLr-KO.

Tecido adiposo visceral epididimal foi dissecado de camundongos LDLr-KO alimentados com dietas hiperlipídicas contendo ácidos graxos polinsaturados (POLI), 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 padronizados para Hipoxantina guanina fosforribosil transferase (HPRT) e normalizados para a expressão de amostras de tecido adiposo de camundongos alimentados com uma dieta contendo 7% de energia como gordura. Os dados foram verificados quanto à normalidade antes da análise estatística. Realizou-se teste de ANOVA, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls. As significações estatísticas são representadas por letras diferentes ($p < 0,05$) com $a > b$. Os dados foram apresentados como média $\pm$ DP ($n=5-7$). A gordura interesterificada rica em palmítico reduziu a expressão da enzima lipolítica ATGL (*Pp1a2*), comparada com a mesma gordura não interesterificada. A expressão de proteínas envolvidas no processo de lipólise, como perilipina (Plin1) e lipase hormônio sensível (Lipe), não apresentou diferença. Os grupos ESTEAR e ESTEAR INTER tiveram maior expressão da enzima de dessaturação SCD-1 em relação a POLI. **Legenda:** Plin1: perilipina-1; Lipe: lipase hormônio sensível; Adipoc: adiponectina; Tnf α : fator de necrose tumoral; Pp1a2: lipase triglicérides de adipócito; SCD1: Esteroil CoA-dessaturase-1.

A análise da síntese de proteínas no tecido adiposo (**Figura 8 A-D**) foi realizada nos grupos PALM, PALM INTER e POLI, pois não houve tecido suficiente para executar nos grupos ESTEAR e ESTEAR INTER. Embora não tenha sido encontrada diferença na transcrição de citocinas inflamatórias entre os grupos, PALM INTER apresentou maior inflamação tecidual constatada pela elevada concentração do TNF α no tecido adiposo epididimal (**Figura 8 A**). Atribuiu-se tal aumento à maior ativação da via *upstream* do NF-kB, com maior fosforilação da serina quinase IKK α/β (**Figura 8 C**).

Figura 8. Secreção de proteínas de vias inflamatórias no tecido adiposo visceral. Tecido adiposo visceral epididimal dissecado de camundongos LDLr-KO alimentados com dietas hiperlipídicas contendo ácidos graxos polinsaturados (POLI), 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. Realizou-se teste de ANOVA, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls. As significações estatísticas são representadas por letras diferentes ($p < 0,05$) com $a > b$. Os dados foram apresentados como média $\pm$ DP ($n = 5-7$). O grupo PALM INTER apresentou maior TNF α e atividade de IKK (maior pIKK). Legenda: P: grupo poli; PALM: grupo palmítico; PIN: grupo palmítico interesterificado. Gráficos: A: TNF α , B: IL-1 β , C: pIKK, D: pJNK. Para cada banda foi realizada a normalização.

12.4 HISTOLOGIA DO FÍGADO E CONTEÚDO DE LÍPIDES HEPÁTICOS

O peso do fígado, corrigido para o peso total do animal, foi igual em todos os grupos estudados, assim como o conteúdo de colesterol e triglicérides (**Tabela 5**).

A análise histológica do tecido hepático demonstrou presença de NAFLD nos animais de todos os grupos e apenas no grupo ESTEAR INTER apresentou lesões com características de NASH (**Figura 9**). Para essa análise foram determinados escores para quatro parâmetros histológicos, adaptados de Kleiner et al. (2005). Os resultados da soma dos escores dos animais que consumiram as dietas POLI (escore 2) e ESTEAR (escore 2) foram menores do que três, indicando ausência de NASH. Ambos apresentaram esteatose entre 5% e 33% de gordura (escore 1) e fibrose leve (escore 1). No grupo POLI, a esteatose teve característica azonal e fibrose, especialmente o tipo periportal. No grupo ESTEAR, a esteatose foi periportal e a fibrose, principalmente na zona 3, próxima à veia centrolobular. Em ambos os grupos, houve ausência de inflamação e balonização.

Os grupos que consumiram dietas enriquecidas com ácido palmítico, antes e após o processo de interesterificação, manifestaram estágio intermediário para NASH (escore 3 e 4), com esteatose entre 33% e 66% azonal (escore 2). O grupo PALM sofreu inflamação e balonização entre zero e mínimo (escore 0 – 1) e fibrose leve periportal (escore 1). A dieta PALM INTER

induziu balonização de grau mínimo (escore 1), ausência de inflamação (escore 0) e fibrose moderada em zona perisinusoidal (escore 1) (**Figura 9**).

O grupo ESTEAR INTER, único com escore compatível a NASH (escore 5), apresentou maior grau de fibrose, presente tanto na VCL, como tríade portal (escore 2). Nesse grupo, não se observou balonização (escore 0), mas houve esteatose entre 33% e 66% (escore 2) e inflamação mínima (escore 1). O infiltrado de neutrófilos corroborou a análise histológica, na qual ESTEAR INTER apresentou elevada infiltração neutrofílica, em comparação aos demais (**Tabela 5**).

Posteriormente, quantificou-se conteúdo de colágeno no parênquima hepático nas duas regiões utilizadas para determinação do escore na VCL e tríade portal (**Figura 9**). Os grupos ESTEAR INTER e PALM INTER registraram maior conteúdo de colágeno na VCL, diferindo dos demais (POLI, PALM e ESTEAR). Além disso, o grupo PALM INTER também apresentou maior formação de colágeno na região da tríade portal, na comparação com os demais (**Tabela 5**).

O infiltrado de macrófagos da classe M1 (anti-CD11b) no tecido hepático foi avaliado qualitativamente por imunofluorescência (**Figura 10**). As imagens apontaram maior infiltrado de macrófagos M1 no tecido dos animais do grupo PALM e ESTEAR, em relação aos demais.

Tabela 5. Análise do tecido hepático: peso do órgão, conteúdo de colesterol e triglicérides. Análise histológica: infiltrado de neutrófilo e concentração de colágeno.

	POLI	PALM	PALM INTER	ESTEAR	ESTEAR INTER
Peso do Fígado (g/100g peso corporal)	4,35 ±0,60	4,72 ±1,09	4,48 ±0,57	4,51 ±0,43	4,37 ±0,73
Colesterol g/100g fig	1,67 ± 0,3	2,06 ± 0,6	1,70 ± 0,38	1,65 ± 0,42	1,88 ± 0,43
Triglicérides g/100g fig	15,02 ±7,73	16,67 ±11,19	15,63 ±5,42	16,45 ±8,43	13,50 ±5,42
Infiltrado de neutrófilos (cel/mm ²)	1,76 ±0,79 ^b	2,24 ±0,90 ^b	2,96 ±1,85 ^b	1,95 ±0,83 ^b	6,10 ±3,9 ^a
Fração de volume de colágeno VCL (%)	24,34 ±0,77 ^b	14,66 ±7,27 ^b	34,84 ±20,31 ^a	15,20 ±9,85 ^b	31,55 ±13,03 ^a
Fração de volume de colágeno na tríade (%)	25,86 ±9,87 ^b	31,80 ±14,17 ^b	51,20 ±9,70 ^a	32,00 ±14,93 ^b	36,60 ±18,45 ^b

Dados apresentados em média ±DP; letras diferentes representam $p < 0,05$, com $a > b$; $n = 13-19$; os neutrófilos contados em 20 campos do parênquima hepático $n=8-10$. Na análise do conteúdo de colágeno $n=10$. VCL : Veia centrolobular. O teste estatístico: One-way ANOVA, pós-teste: Newman-Keuls.

A) POLI:

SCORE: 2,
ausência de
NASH

B) PALM:

SCORE: 3,
intermediário
para NASH

C) PALM INTER:

SCORE: 4, intermediário
para NASH; maior % de
colágeno na VCL e tríade

D) ESTEAR:

SCORE: 2,
ausência de
NASH

E) ESTEAR INTER:

SCORE: 5, NASH;
maior % de
colágeno VCL

Figura 9. Corte de tecido hepático processado para análise histológica com HE (esquerda) e Picrossius Red (direita). Fotomicrografias representativas em 40X de tecido hepático dos camundongos LDLr-KO alimentados com dietas hiperlipídicas contendo ácidos graxos polinsaturados (POLI), 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). A) grupo Poli score =2; B) grupo PALM score=3; C) grupo PALM INTER score = 4; D) grupo ESTEAR score = 2; E) ESTEAR INTER score = 5 compatível a NASH. Resultados do conteúdo de colágeno (Picrossius Red) : o grupo PALM INTER apresentou maior conteúdo de colágeno na VCL e tríade portal, grupo ESTEAR INTER na VCL. Legenda: VCL: veia centro lobular.

Figura 10. Fotomicrografias do tecido hepático com marcação de macrófagos ativados M1. Fotomicrografias de tecido hepático dos camundongos LDLr-KO alimentados com dietas hiperlipídicas contendo ácidos graxos polinsaturados (POLI), 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 anticorpo anti-CD11b para determinação do infiltrado de macrófagos ativados M1 da via inflamatória. As setas representam marcação de macrófago M1 e o quadrado tracejado compreende região com elevada concentração de macrófagos M1 marcados. Fotomicrografias sob aumento de 20x.

12.5 EXPRESSÃO GÊNICA E CONTEÚDO DE PROTEÍNAS ANALISADAS NO TECIDO HEPÁTICO

Para investigar os mecanismos e vias de sinalização responsáveis pelo aparecimento de NASH no grupo ESTEAR INTER e maior grau de fibrose em ambos os grupos que receberam dieta interesterificada, analisou-se a expressão de genes envolvidos no metabolismo de lípidos e resposta inflamatória no fígado. A expressão do gene da enzima SCD-1 foi três vezes maior no grupo PALM INTER em relação ao grupo POLI, e duas vezes maior em relação ao PALM ($p < 0,05$). O grupo ESTEAR INTER não teve diferença estatística na expressão da SCD1 comparado a ESTEAR e POLI, mesmo apresentando média de expressão duas vezes maior. (**Figura 11**).

Figura 11. Expressão de genes relacionados às vias inflamatórias, lipogênica e lipolítica do tecido hepático de camundongos LDLr-KO.

Tecido hepático foi dissecado de camundongos LDLr-KO alimentados com dietas hiperlipídicas contendo ácidos graxos polinsaturados (POLI), 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 padronizados para Hipoxantina guanina fosforribosil transferase (HPRT) e normalizados para a expressão de amostras de tecido adiposo de camundongos alimentados com uma dieta contendo 7% de energia como gordura. Os dados foram verificados quanto à normalidade antes da análise estatística. Realizou-se teste de ANOVA, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls. As significações estatísticas são representadas por letras diferentes ($p < 0,05$) com $a > b$. Os dados foram apresentados como média $\pm$ DP ($n = 5-7$).

A análise das proteínas envolvidas nas vias de sinalização inflamatória no fígado (**Figura 12**) demonstrou que as gorduras interesterificadas (PALM INTER e ESTEAR INTER) ativaram, significativamente, a serina quinase JNK, com maior concentração na forma fosforilada em relação aos demais (**Figura 12 E**). Os grupos PALM e ESTEAR apresentaram maior concentração de citocinas inflamatórias TNF α e IL-1 β , em comparação a POLI e demais grupos que consumiram dieta interesterificada (**Figura 12 A e B**), corroborando os resultados da análise de imunofluorescência com marcação de macrófagos M1.

O grupo ESTEAR manifestou, ainda, maior ativação da proteína IKB α (**Figura 12 D**). A síntese da enzima lipogênica FAS foi aumentada nos grupos dos animais que ingeriram dieta rica em ácido esteárico (ESTEAR INTER e ESTEAR), em relação aos demais (**Figura 12 F**).

Após a observação de maior ativação da serina JNK nos grupos que consumiram dietas interesterificadas, analisou-se a síntese de proteínas relacionadas à apoptose celular caspase 3, Bcl2 e BAX (**Figura 12 G, H e I**). O grupo PALM INTER apresentou maior concentração de caspase 3 em comparação a PALM e POLI, indicando aumento de atividade apoptótica. O resultado está em concordância com maior ativação da JNK, serina quinase, que também atua na ativação de vias apoptóticas, além de vias inflamatórias. Ao mesmo tempo, o grupo PALM INTER registrou menor secreção da proteína antiapoptótica BCL-2, que regula diretamente o processo de ativação das caspases. O grupo ESTEAR INTER, que também apresentou maior pJNK (JNK fosforilada), não demonstrou diferença na secreção das proteínas apoptóticas

(caspase 3 e BAX) e antiapoptóticas (BCL-2), em comparação a ESTEAR. No entanto, houve maior caspase 3 e menor BCL-2 em relação ao grupo POLI.

Figura 12. Secreção de proteínas inflamatórias, lipogênicas, apoptótica e antiapoptóticas do tecido hepático de camundongos LDLr-KO. Tecido

hepático dos camundongos LDLr-KO alimentados com dietas hiperlipídicas contendo ácidos graxos polinsaturados (POLI), 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). Legenda: P: grupo poli; PA: grupo palmítico; PIN- grupo palmítico interesterificado; ES- grupo esteárico; EIN- grupo esteárico interesterificado. Gráficos: A: TNF α , B: IL1 β , C: pIKK β/α , D: pI κ B α , E: pJNK, F: FAS, G: Caspase 3, H: Bcl2, i. Bax. (n=4-6)

13. DISCUSSÃO

Estudos prévios já demonstraram a influência de determinados ácidos graxos saturados na gênese de alterações metabólicas, aumentando o risco da doença cardiovascular (Mozaffarian, et al., 2010; Bonanome & Grundy, 1988; Temme et al., 1996). Os principais resultados desta investigação foram os de evidenciar os efeitos deletérios das gorduras interesterificadas sobre vias de sinalização inflamatórias e apoptóticas no fígado e hipertrofia de adipócito, bem como inflamação do tecido adiposo visceral epididimal em camundongos LDLr-KO. Durante o processo de interesterificação, a posição sn-2 da molécula do glicerol é enriquecida principalmente com o ácido palmítico ou esteárico, ambos utilizados neste trabalho.

Camundongos LDLr-KO, quando submetidos a dieta hiperlipídica, manifestam alterações metabólicas importantes, como NAFLD/NASH (Bieghs et al., 2012), obesidade, síndrome metabólica e Diabetes Mellitus (Bell et al., 2007; Wang et al., 2009; Neuhofer et al., 2014, Srivastava et al., 2006). Além disso, desenvolvem perfil lipídico semelhante a humanos (Zadelaar et al., 2007). Assim, trata-se de um modelo adequado para investigar a hipótese levantada neste estudo.

A mensuração da quantidade de gordura nas fezes é um método validado para a avaliação de sua absorção intestinal. Nesta investigação, ESTEAR e ESTEAR INTER apresentaram maior peso e teor de gordura fecal em comparação a todos os demais, sendo esse resultado esperado, uma vez que o

esteárico tem maior ponto de fusão em relação aos demais ácidos graxos, o que dificulta sua incorporação para formação das micelas (Imaizumi et al., 1993). Esse resultado já foi demonstrado em estudo com camundongos submetidos a dieta hiperlipídica contendo ácido esteárico, palmítico ou oleico, o qual revelou que o enriquecimento da alimentação com o esteárico induziu menor depósito de gordura corporal, juntamente com maior excreção de gordura fecal (Gouk et al., 2013; Gouk et al., 2014). Em hamsters, não se observou alteração no peso, tecido adiposo e peso das fezes, em comparação a dietas enriquecidas com demais ácidos graxos saturados (Imaizumi et al., 1993), embora tenham apresentado maior perda de gordura fecal.

Poucos trabalhos avaliaram o efeito das gorduras interesterificadas sobre o processo de absorção de gorduras. Estudo realizado com aves jovens não mostrou diferença na absorção, quando se comparou PALM com PALM INTER (Vilarrasa et al., 2014). Resultado semelhante foi observado nesta investigação, pois não se constatou diferença no teor de gordura das fezes, na comparação de PALM *versus* PALM INTER e ESTEAR *versus* ESTEAR INTER.

Com a finalidade de avaliar o efeito das gorduras interesterificadas sobre possíveis alterações metabólicas, procurou-se investigar a sua ação sobre parâmetros bioquímicos, os quais são muito influenciados por dietas hiperlipídicas com alto teor de gordura saturada. A literatura é recorrente em afirmar que o excesso de ácido palmítico induz aumento da concentração plasmática de colesterol em animais (Spady & Dietschy, 1985; Nicolosi et al., 1990) e em humanos (Bonanome & Grundy, 1988; Temme et al., 1996).

Corroborando esse resultado, o presente estudo demonstrou que tanto o grupo PALM quanto o PALM INTER apresentaram maior colesterolemia em relação ao POLI e aos animais alimentados com dietas enriquecidas com ácido graxo esteárico. Existem várias explicações para esse resultado na literatura. Uma das mais importantes é o fato de o ácido palmítico diminuir a expressão e a atividade dos receptores B/E, responsáveis pela captação das partículas de LDL, enquanto o esteárico tem efeito neutro (Bennett et al., 1995; Horton, 1993; Daumerie, 1992). Tal ação do esteárico deve-se ao fato de ser substrato da enzima SCD-1, sendo, assim, rapidamente convertido em ácidos graxos monoinsaturados, como o oleico (Bonanome & Grundy, 1988), uma vez que essa enzima introduz uma dupla ligação na posição D9 do ácido graxo (Guillou et al., 2010). A SCD-1 é altamente expressa no tecido adiposo e no fígado de animais, após consumo de ácidos graxos saturados, em comparação aos monoinsaturados (Flowers & Ntambi 2008), por meio de mecanismo que pode envolver a sub-regulação do PGC-1 β e subsequente coativação de SREBP-1c (Lin et al., 2005). Como era esperado, em nosso trabalho o ácido graxo esteárico não induziu maior concentração plasmática de colesterol, quando comparado às dietas enriquecidas com o palmítico (Kris-Etherton et al., 2005).

No presente estudo, o processo de interesterificação não influenciou o colesterol plasmático total, quando foram comparados os grupos PALM a PALM INTER e ESTEAR a ESTEAR INTER. Observaram-se resultados semelhantes em estudos prévios, realizados por Kritchevsky et al. (2000), com coelhos alimentados com gorduras interesterificadas enriquecidas em ácido palmítico ou

esteárico, por 15 semanas (Kritchevsky et al., 2000). Em humanos, o consumo de gordura interesterificada rica em ácido palmítico não elevou a colesterolemia, em comparação à ingestão de óleo de palma, tanto em indivíduos saudáveis (Filippou et al., 2014), como em adultos hipercolesterolêmicos moderados (Nestel et al., 1995).

Apesar de ambas as gorduras interesterificadas não terem influenciado a concentração plasmática de colesterol, estudo recente de nosso grupo mostrou enriquecimento de colesterol nas partículas LDL em camundongos alimentados com PALM INTER, em comparação a PALM, condição que resultou em maior lesão aterosclerótica, juntamente com maior infiltrado de macrófagos (Afonso et al., 2016).

Contradizendo os nossos resultados, Reena et al., (2011) demonstraram efeito hipocolesteremiante com a gordura interesterificada decorrente de maior expressão hepática do receptor de LDL e da proteína de ligação ao elemento responsivo a esteroides 2 (SREBP2), que induz a síntese de colesterol, em comparação com a mesma gordura sem passar pelo processo de interesterificação (Reena et al., 2011). No entanto, a gordura experimental foi preparada com óleo de coco e óleo de gergelim, o que lhe conferiu menor quantidade de ácidos graxos saturados (30% das calorias totais) e maior de poli-insaturados (32%). Uma das limitações em relação aos estudos dessas gorduras deve-se à utilização de diferentes métodos de interesterificação, assim como ao uso de distintos tipos e quantidades de ácidos graxos, condição que muitas vezes dificulta a comparação do resultado entre os vários trabalhos.

Apesar disso, sabe-se que, na prática industrial, os ácidos graxos palmítico e esteárico são os mais utilizados (Berry, 2009).

Os ácidos graxos saturados também estão relacionados com o aumento da concentração plasmática de triglicérides, uma vez que, no fígado, induzem vias de sinalização lipogênica mediadas pelo principal fator de transcrição de enzimas lipogênicas, o SREBP-1c, que codifica as enzimas FAS e ACC (Haas et al., 2008). Na sequência, ocorre a incorporação dos ácidos graxos para a formação de triglicérides via DGAT (Casaschi et al., 2005). Vale salientar que a ativação do SREBP-1c e, conseqüentemente, das enzimas lipogênicas ocorrem via ativação do seu coativador PGC-1 β (Lin et al., 2005).

Como esperado, nesta investigação os animais alimentados com dietas enriquecidas com ácido graxo saturado, tanto palmítico quanto esteárico, apresentaram maior concentração plasmática de triglicérides, em comparação com POLI. O processo de interesterificação não influenciou a trigliceridemia, uma vez que não foi encontrada diferença quando se compararam as dietas enriquecidas com PALM *versus* PALM INTER e ESTEAR *versus* ESTEAR INTER. Resultados semelhantes com relação à concentração plasmática de TG no jejum foram observados em humanos saudáveis, após três semanas de ingestão de óleo de palma interesterificado, em comparação com o óleo de palma (Zock et al., 1995; Meijer & Weststrate, 1997). Por outro lado, a concentração plasmática de triglicérides pós-prandial, após consumo agudo de gorduras interesterificadas, foi menor tanto em mulheres pós menopausa (Yli-Jokipii et al., 2001) e jovens saudáveis (Sanders et al., 2011), quanto em

adultos que apresentavam TG elevados em jejum (Hall et al., 2014). Nas três investigações utilizaram-se refeições preparadas com 50g a 75g de gordura interesterificada rica em ácido palmítico ou óleo de palma (~65% Kcal em gordura/refeição).

No tocante à ingestão de gordura interesterificada enriquecida com o ácido esteárico, estudo com humanos mostrou menor concentração de TG pós-prandial após consumo agudo, assim como menor atividade do fator VII coagulante. Nesse trabalho, os autores compararam a gordura interesterificada com óleo de soja (rico em ácido graxo insaturado) e a manteiga de cacau (rica em esteárico; sn-1 e sn-3) (Sanders et al., 2003).

Uma vez que a concentração plasmática de glicose e insulina também é influenciada pelas gorduras alimentares (Yubero-Serrano et al., 2015), uma das hipóteses deste estudo foi a de avaliar o efeito da mudança na posição dos ácidos graxos na molécula de glicerol das gorduras interesterificadas sobre tais parâmetros. Apesar de o processo de interesterificação não ter alterado a glicemia e insulinemia, observou-se aumento na concentração plasmática de glicose e insulina no grupo PALM e PALM INTER, em relação aos demais. De fato, a exposição em longo prazo ao palmitato culmina tipicamente na morte das células beta por apoptose (Maedler et al., 2001) e na diminuição da produção de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) induzida pela glicose, um determinante significativo para prejuízo de secreção de insulina (Tian et al., 2015). Além disso, a exposição crônica do ácido palmítico promove a síntese de ceramidas (Maedler et al., 2001), o que contribui para a inibição da AKT, etapa

limitante na via de sinalização da insulina, comprometendo a captação de glicose (Schmitz-Peiffer et al., 1999). Estudo recente também mostrou que a via do ácido palmítico-ceramida-AKT modifica a sensibilidade à insulina, principalmente nas células intestinais, já que o intestino delgado é capaz de produzir ceramidas rapidamente, a partir de ácido palmítico (Tran et al., 2016).

Estudo conduzido com humanos avaliou o efeito da dieta normocalórica enriquecida com gordura interesterificada preparada com ácido esteárico, em comparação com alimentação contendo ácido palmítico (Sundram et al., 2007). Os autores observaram que o processo de interesterificação elevou a glicemia de jejum. Não obstante, não se observou alteração na insulinemia (Sundram et al., 2007).

Outro trabalho também conduzido com humanos, comparando alimentação enriquecida com palmítico à mesma dieta após processo de interesterificação, demonstrou que esse ácido graxo na posição sn-2 não prejudica a secreção de insulina e a homeostase da glucose (Filippou et al., 2014). Provavelmente, os diferentes resultados foram obtidos pelo fato de a gordura interesterificada utilizada por Sundram et al. (2007) ser composta com ácido esteárico, enquanto Filippou et al. (2014) utilizaram ácido palmítico. Ambos os trabalhos compararam as gorduras interesterificadas com óleo de palma.

Embora em nossa investigação, as duas dietas enriquecidas com ácido palmítico aumentaram concentração plasmática de glucose e insulina, não houve diferença entre PALM *versus* PALM INTER e ESTEAR *versus* ESTEAR

INTER. Portanto, o conjunto desses resultados iniciais mostra que a interesterificação das gorduras não alterou os parâmetros bioquímicos.

Outro parâmetro relevante para a avaliação da ação das gorduras sobre alterações metabólicas é o de investigar o seu efeito sobre o desenvolvimento da obesidade e expansão do tecido adiposo em animais. Até o momento, poucos estudos avaliaram esses parâmetros. Em um deles, observou-se que a ingestão por camundongos, durante a gestação e lactação, de gordura rica em ácido palmítico ou interesterificada enriquecida com palmítico predispõe a prole ao desenvolvimento da obesidade na vida adulta. Isso indica que as gorduras interesterificadas influenciam negativamente a epigenética (Magri et al., 2015). De acordo com outro estudo, o consumo de dieta enriquecida com palmítico na posição sn-2 induziu maior concentração de fosfolípidos em adipócitos, com maior acúmulo desse ácido graxo (Carta et al., 2015).

A presente investigação foi a primeira a avaliar a influência das gorduras interesterificadas sobre o metabolismo do tecido adiposo, bem como sobre vias de sinalização inflamatória dos adipócitos. Já está bem definido que a obesidade é caracterizada pela expansão do tecido adiposo com grandes adipócitos (Coenen et al., 2007), infiltração de células pró-inflamatórias e subsequente maior secreção de biomarcadores inflamatórios (Olesfsky & Glass, 2010). Consequentemente, essas condições contribuem para o comprometimento da sensibilidade à insulina no tecido adiposo (Chen et al., 2016) e a lipólise não controlada (Gutierrez et al., 2009). Um achado importante

de nossa investigação foi o fato de PALM INTER ter induzido maior expansão do tecido adiposo com hipertrofia de adipócitos.

Esses resultados conduziram-nos a investigar os mecanismos moleculares subjacentes envolvidos na hipertrofia dos adipócitos. Já foi demonstrado em células 3T3-L1 que o tratamento com ácido palmítico aumenta tanto a expressão como a secreção de $\text{TNF}\alpha$, bem como a atividade de NF- κB , quando comparado com adipócitos não tratados (Bradley et al., 2008). Nossa investigação não mostrou diferença significativa entre as diferentes dietas experimentais sobre a expressão gênica de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias. Tal fato pode ser explicado provavelmente devido à alta concentração de ômega-6 no grupo que recebeu ácidos graxos poli-insaturados, os quais induzem resposta inflamatória (James et al., 2000). Com relação à avaliação do conteúdo proteico, o grupo PALM INTER apresentou maior concentração da proteína $\text{TNF}\alpha$, em comparação aos demais. Uma possível explicação para isso é a maior incorporação de ácido palmítico nos fosfolípidos dos adipócitos, observada em estudo prévio realizado em ratos (Carta et al., 2015). A hipertrofia dos adipócitos e a secreção de $\text{TNF}\alpha$ são as mais relevantes contribuintes para o desenvolvimento da resistência à insulina no tecido adiposo (Hotamisligil et al., 1993). O $\text{TNF}\alpha$ estimula a lipólise por atenuar a atividade da antilipolítica da insulina (Guilherme et al., 2008), impedindo a sua ação sobre a supressão da lipólise, o que eleva a liberação de ácidos graxos livres, os quais serão direcionados para o fígado, induzindo a lipogênese e contribuindo para o desenvolvimento de NAFLD,

concomitantemente a um quadro de resistência hepática à ação da insulina (Ebbert & Jensen, 2013, Westerbacka et al., 2007, Rosselli et al., 2014, Bugianesi et al., 2005).

O aumento intracelular e liberação de citocinas inflamatórias levam à maior expressão de MCP-1 pelos adipócitos hipertrofiados, induzindo o aumento do infiltrado de macrófagos (Coenen et al., 2007). Além disso, os macrófagos do tecido adiposo expandido também podem secretar $\text{TNF}\alpha$, induzidos pela via de sinalização de $\text{IKK}\beta$ - $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ / $\text{NF}\kappa\text{B}$ ou JNK-MAP4K4-AP1 (JNK - proteína ativadora de mitógeno quinase 4-AP-1) (Guilherme et al., 2008). Tanto $\text{IKK}\beta$ como JNK são serina-quinases que prejudicam a via de sinalização da insulina, com redução da ação antilipolítica desta, culminando no aumento da liberação de ácidos graxos e induzindo a inflamação do tecido adiposo (DeFronzo & Tripathy, 2009). Em nossa investigação, os animais do grupo PALM INTER apresentaram maior nível de fosforilação de $\text{IKK}\alpha/\beta$. Isso demonstra ativação da via de sinalização de $\text{IKK}\beta$ - $\text{NF-}\kappa\text{B}$, que induz a transcrição de mediadores pró-inflamatórios, como $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , $\text{TNF}\alpha$, e também contribui para o desenvolvimento de RI e NAFLD (Malaguarnera et al., 2009).

Já está documentado que o consumo de ácidos graxos saturados induz maior formação de tecido adiposo, em comparação aos poli-insaturados, seguido de maior grau de inflamação e hipertrofia dos adipócitos (Westerbacka et al., 2005; Malhi et al., 2006). Os dados deste estudo confirmam esses resultados e adicionam uma nova informação, sendo o primeiro a demonstrar

que o ácido graxo saturado na posição sn-2 do glicerol induz ações deletérias no tecido adiposo.

A última etapa deste trabalho foi identificar o impacto das gorduras interesterificadas sobre o metabolismo de lípidos hepáticos, uma vez que dieta rica em gordura, principalmente em ácidos graxos saturados, desempenha importante papel na progressão da NAFLD (Westerbacka et al., 2005; Sutter et al., 2015), podendo progredir para inflamação e fibrose (Liu et al., 2016).

Nossos resultados não demonstraram diferenças na concentração hepática de triglicérides entre os grupos, uma vez que todos os animais desenvolveram NAFLD, como consequência da dieta rica em gordura. Resultados semelhantes foram encontrados no mesmo modelo animal submetido a uma dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados ou poli-insaturados (Machado et al., 2010).

O grupo PALM INTER também manifestou menor secreção de citocinas inflamatórias, porém com maior fibrose e apoptose, em comparação com PALM e POLI, apresentando, também, maior ativação de JNK (JNK fosforilada - pJNK) e maior conteúdo proteico de caspase 3 e BAX, respectivamente. Os processos de fibrose e apoptose são eventos tardios durante a progressão da NAFLD (Sutter et al., 2015), que ocorrem geralmente após maior grau de inflamação (Kumar et al., 2010). Isso pode explicar a menor secreção de TNF α e IL-1 β , em comparação a PALM. Tal fenômeno ocorre porque a JNK é considerada uma serina quinase envolvida não apenas na via de sinalização inflamatória, como também apoptótica (Malhi et al., 2006), ativando proteínas como Bax. Já foi

demonstrado *in vitro* que hepatócitos tratados com AGS, palmítico e esteárico induziram o mesmo grau de esteatose, com maior apoptose, via fosforilação de JNK, quando comparados a AGM (Malhi et al., 2006) e, ainda que o consumo de dieta rica em ácidos graxos saturados induz fibrose precoce no fígado, em uma via independente de TLR4 (Sutter et al., 2015; Geng et al., 2013).

Além disso, ESTEAR INTER induziu aumento de fosforilação de JNK sem expressar marcadores de apoptose. No entanto, esse foi o único grupo apresentando escore compatível a NASH, juntamente com maior infiltração de neutrófilos, mesmo com menor absorção de gordura, em comparação com o grupo POLI e ambos os PALM.

14. CONCLUSÃO

Os resultados desta investigação mostraram que a gordura interesterificada enriquecida com ácido palmítico induziu maior expansão de tecido adiposo com hipertrofia de adipócitos e inflamação. Além disso, levou a maior grau de fibrose hepática e apoptose, em relação à PALM. A dieta enriquecida com ácido esteárico provocou NASH em camundongos LDLr-KO, com aumento do infiltrado de neutrófilos e estágio de fibrose.

15. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelmegeed MA, Banerjee A, Jang S, et al. CYP2E1 potentiates binge alcohol-induced gut leakiness, steatohepatitis, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2013;65:1238-45.
- Andreozzi F, Laratta E, Procopio C, et al. Interleukin-6 impairs the insulin signaling pathway, promoting production of nitric oxide in human umbilical vein endothelial cells. *Mol Cell Biol*. 2007;27(6):2372–2383.
- Afonso MS, Lavrador MS, Koike MK, et al. Dietary interesterified fat enriched with palmitic acid induces atherosclerosis by impairing macrophage cholesterol efflux and eliciting inflammation. *J Nutr Biochem*. 2016;32:91-100.
- Araujo EP, Amaral ME, Filiputti E, et al. Restoration of insulin secretion in pancreatic islets of protein-deficient rats by reduced expression of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. *J Endocrinol*. 2004;181(1):25-38.
- Argo CK, Caldwell SH. Epidemiology and natural history of non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis*. 2009;13(4):511-31.
- Baer DJ, Judd JT, Clevidence BA, Tracy RP. Dietary fatty acids affect plasma markers of inflammation in healthy men fed controlled diets: a randomized cross over study. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(6):969–973.
- Basaranoglu M, Basaranoglu G, Sentürk H. From fatty liver to fibrosis: a tale of "second hit". *World J Gastroenterol*. 2013;19(8):1158-65.
- Bell TA 3rd, Kelley K, Wilson MD, Sawyer JK, Rudel LL. Dietary fat-induced alterations in atherosclerosis are abolished by ACAT2-deficiency in ApoB100 only, LDLr^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(6):1396-402.
- Beynen AC, Katan MB. Why do polyunsaturated fatty acids lower serum cholesterol? *Am J Clin Nutr*. 1985;42(3):560-3.
- Bennett AJ, Billett MA, Saler AM, Mangiavane EH, et al. Modulation of hepatic apolipoprotein B, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and low-density lipoprotein receptor mRNA and plasma lipoprotein concentrations by defined dietary fats. *Biochem J*. 1995;311:167–73.
- Bergouignan A, Momken I, Schoeller DA, Simon C, Blanc S. Metabolic fate of saturated and monounsaturated dietary fats: the Mediterranean diet revisited from epidemiological evidence to cellular mechanisms. *Prog Lipid Res*. 2009;48(3-4):128-47.

- Berry S. Triacylglycerol structure and interesterification of palmitic and stearic acid-rich fats: an overview and implications for cardiovascular disease. *Nutr Res Rev* 2009; 22: 3–17.
- Bieghs V, Van Gorp PJ, Wouters K, et al. LDL receptor knock-out mice are a physiological model particularly vulnerable to study the onset of inflammation in non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One*. 2012;7(1):e30668.
- Boden G, Shulman GI. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and β -cell dysfunction. *Eur J Clin Invest*. 2002; 32: 14–23.
- Bonanome A, Grundy SM. Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. *N Engl J Med*. 1988;318(19):1244-8.
- Bradley RL, Fisher FF, Maratos-Flier E. Dietary fatty acids differentially regulate production of TNF- α and IL-10 by murine 3T3-L1 adipocytes. *Obesity*. 2008; 16:938–944.
- Bugianesi E, McCullough AJ, Marchesini G. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology*. 2005;42(5):987-1000.
- Bysted A, Hølmer G, Lund P, Sandström B, Tholstrup T. *Eur J Clin Nutr*. 2005; 59: 24–34.
- Carta G, Murru E, Lisai S, Sirigu A, Piras A, Collu M, Batetta B, Gambelli L, Banni S. Dietary triacylglycerols with palmitic acid in the sn-2 position modulate levels of N-acyl ethanolamides in rat tissues. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120424.
- Carvajal O, Nakayama M, Kishi T, et al. Effect of medium-chain fatty acid positional distribution in dietary triacylglycerol on lymphatic lipid transport and chylomicron composition in rats. *Lipids*. 2000;35(12):1345-51.
- Caputo M, De Rosa MC, Rescigno T, et al. Binding of polyunsaturated fatty acids to LXRA and modulation of SREBP-1 interaction with a specific SCD1 promoter element. *Cell Biochem Funct*. 2014;32(8):637-46.
- Carr TP, Andresen CJ, Rudel LL. Enzymatic determination of triglyceride, free cholesterol, and total cholesterol in tissue lipid extracts. *Clin Biochem*. 1993; 26(1):39-42.
- Carrière F, Lauguer R, Barrowman JA, et al. Gastric and pancreatic lipase levels during a test meal in dogs. *Scand. J Gastroenterol*. 1993;28(5):443-54.

- 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; 54:403–409.
- Chen Y, Wu Z, Zhao S, Xiang R. Chemical chaperones reduce ER stress and adipose tissue inflammation in high fat diet-induced mouse model of obesity. *Sci Rep*. 2016;6:27486.
- Coenen KR, Gruen ML, Chait A, Hasty AH. Diet-induced increase in adiposity, but not plasma lipids, promote macrophage infiltration into white adipose tissue. *Diabetes*. 2007;56(3):564–573.
- Cusi K. Nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes mellitus. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2009;16(2):141-9.
- Dalmas E, Clément K, Guerre-Millo M. Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. *Trends Immunol*. 2011;32(7):307-14.
- Daumerie CM, Woollett LA, Dietsch JM. Fatty acids regulate hepatic low density lipoprotein receptor activity through redistribution of intracellular cholesterol pools. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:10797–801.
- DeFronzo RA, Tripathy D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2009;32 Suppl 2:S157-63.
- Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1343-51.
- Drover VA, Nguyen DV, Bastie CC, et al. CD36 mediates both cellular uptake of very long chain fatty acids and their intestinal absorption in mice. *J Biol Chem*. 2008;283(19):13108-15.
- Ebbert JO & Jensen MD. Fat depots, free fatty acids, and dyslipidemia. *Nutrients*. 2013;5:498e508.
- El-Saed A, Masaki K, Okamura T, et al. ERAJump Study Group.. The Associations of C-Reactive Protein with Serum Levels of Polyunsaturated Fatty Acids and Trans Fatty Acids Among Middle-Aged Men from Three Populations. *J Nutr Health Aging*. 2016;20(1):16-21.
- Fabbrini E, Mohammed BS, Magkos F, Korenblat KM, Patterson BW, Klein S. Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and

- women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2008;134(2):424-31.
- Fernández-Real JM, Broch M, Vendrell J, Ricart W. Insulin resistance, inflammation, and serum fatty acid composition. *Diabetes Care*. 2003; 26(5):1362–1368.
- Festi D, Colecchia A, Sacco T, Bondi M, Roda E, Marchesini G. Hepatic steatosis in obese patients: clinical aspects and prognostic significance. *Obes Rev*. 2004; 5(1):27-42.
- Filippou A, Teng KT, Berry SE, Sanders TA. Palmitic acid in the sn-2 position of dietary triacylglycerols does not affect insulin secretion or glucose homeostasis in healthy men and women. *Eur J Clin Nutr*. 2014;68(9):1036-41.
- Flegal KM, Kruszon-Moran D, Carroll MD, Fryar CD, Ogden CL. Trends in Obesity Among Adults in the United States, 2005 to 2014. *JAMA*. 2016;315(21):2284-91.
- Flowers MT, Ntambi JM. Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism. *Curr opin lipidol*. 2008;19(3):248-256.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957;226(1):497-509.
- Fretts AM, Mozaffarian D, Siscovick DS, et al. Associations of Plasma Phospholipid SFAs with Total and Cause-Specific Mortality in Older Adults Differ According to SFA Chain Length. *J Nutr*. 2016;146(2):298-305.
- Gatto LM, Sullivan DR, Samman S. Postprandial effects of dietary trans fatty acids on apolipoprotein(a) and cholesteryl ester transfer. *Am J Clin Nutr*. 2003;77(5):1119-24.
- Geng T, Hu W, Broadwater MH, et al. Fatty acids differentially regulate insulin resistance through endoplasm reticulum stress-mediated induction of tribbles homologue 3: A potential link between dietary fat composition and the pathophysiological outcomes of obesity. *Diabetologia*. 2013;56(9):2078–2087.
- Gluckman PD, Hanson M, Zimmet P, Forrester T. Losing the war against obesity: the need for a developmental perspective. *Sci Transl Med*. 2011;3(93):93cm19.

- Gouk SW, Cheng SF, Mok JS, Ong AS, Chuah CH. Long-chain SFA at the sn-1, 3 positions of TAG reduce body fat deposition in C57BL/6 mice. *Br J Nutr.* 2013;110(11):1987-95.
- Gouk SW, Cheng SF, Mok JS, Ong AS, Chuah CH. Stearic acids at sn-1, 3 positions of TAG are more efficient at limiting fat deposition than palmitic and oleic acids in C57BL/6 mice. *Br J Nutr.* 2014;111(7):1174-80.
- Greenberg AS, Obin MS. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(2):461S-465S.
- Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol.* 2011;23:415-445.
- Grundy SM. George Lyman Duff Memorial Lecture. Multifactorial etiology of hypercholesterolemia. Implications for prevention of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb.* 1991;11(6):1619-35.
- Guasch-Ferré M, Hu FB, Martínez-González MA, et al. Olive oil intake and risk of cardiovascular disease and mortality in the PREDIMED Study. *BMC Med.* 2014;12:78.
- Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(5):367-77.
- Guillou H, Zadavec D, Martin PG, Jacobsson A. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res.* 2010;49(2):186-99.
- Gutierrez DA, Puglisi MJ, Hasty AH. Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia. *Curr Diab Rep.* 2009;9(1):26-32.
- Haas JT, Miao J, Chanda D, et al. Hepatic insulin signaling is required for obesity-dependent expression of SREBP-1c mRNA but not for feeding-dependent expression. *Cell Metab.* 2012;15(6):873-84.
- Hall WL, Fiuza Brito M, Huang J, et al. An interesterified palm olein test meal decreases early-phase postprandial lipemia compared to palm olein: a randomized controlled trial. *Lipids.* 2014;49(9):895-904.
- Hammad S, Pu S, Jones PJ. Current Evidence Supporting the Link Between Dietary Fatty Acids and Cardiovascular Disease. *Lipids.* 2016;51(5):507-17.

- Harford KA, Reynolds CM, McGillicuddy FC, Roche HM. Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue. *Proc Nutr Soc.* 2011;70(4):408-17.
- Hayes KC. Synthetic and modified glycerides: effects on plasma lipids. *Curr Opin Lipidol.* 2001;12:55-60.
- Hoffmann A, Baltimore D. Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. *Immunol Rev.* 2006;210:171-86.
- 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;92:743-9.
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993;259(5091):87-91.
- Hunter JE. Studies on effects of dietary fatty acids as related to their position on triglycerides. *Lipids.* 2001;36(7):655-68.
- Hunter JE. Dietary trans fatty acids: review of recent human studies and food industry responses. *Lipids.* 2006;41:967-92.
- IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Trabalho e Rendimento, Pesquisa Nacional de Saúde. 2013. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv94522.pdf>
- IBGE. Pesquisa de orçamento Familiar 2008-2009. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv45419.pdf>
- Imaizumi K, Abe K, Kuroiwa C, Sugano M. Fat containing stearic acid increases fecal neutral steroid excretion and catabolism of low density lipoproteins without affecting plasma cholesterol concentration in hamsters fed a cholesterol-containing diet. *J Nutr.* 1993;123(10):1693-702.
- Itoh M, Suganami T, Hachiya R, Ogawa Y. Adipose tissue remodeling as homeostatic inflammation. *Int J Inflam.* 2011;2011:720926.
- James MJ, Gibson RA, Cleland LG. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:343S-8S.

- Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. *Hepatology*. 2005;41(6):1313-21.
- Kolak M, Westerbacka J, Velagapudi VR, et al. Adipose tissue inflammation and increased ceramide content characterize subjects with high liver fat content independent of obesity. *Diabetes*. 2007;56:1960-1968.
- Kramer JK, Fellner V, Dugan ME, Sauer FD, Mossoba MM, Yurawecz MP. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. *Lipids*. 1997;32(11):1219-28.
- Kris-Etherton PM, Griel AE, Psota TL, et al. Dietary stearic acid and risk of cardiovascular disease: intake, sources, digestion, and absorption. *Lipids*. 2005; 40(12):1193-200.
- 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.
- Kromhout D, Menotti A, Bloemberg B, et al. Dietary saturated and trans fatty acids and cholesterol and 25-year mortality from coronary heart disease: the Seven Countries Study. *Prev Med*. 1995; 24(3):308-15.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Renovação, regeneração e reparo dos tecidos. In: Robbins and Cotran's Pathologic Basis of Disease. Ed. Elsevier. 2010 Health Sciences, Philadelphia, PA pp. 19–26.
- Lam YY, Hatzinikolas G, Weir JM, et al. Insulin-stimulated glucose uptake and pathways regulating energy metabolism in skeletal muscle cells: the effects of subcutaneous and visceral fat, and long-chain saturated, n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1811(7-8):468-75.
- Lee JY, Carr TP. Dietary fatty acids regulate acyl-CoA: cholesterol acyltransferase and cytosolic cholesteryl ester hydrolase in hamsters. *J Nutr*. 2004;134(12):3239-44.
- Lichtenstein AH. Dietary trans fatty acids and cardiovascular disease risk: past and present. *Curr Atheroscler Rep*. 2014;16(8):433.
- Lin J, Yang R, Tarr PT, et al. Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1 coactivation of SREBP. *Cell*. 2005;120:261–273.

- Liu W, Baker RD, Bhatia T, Zhu L, et al. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(10):1969-87.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25(4):402-8.
- Longhi R, Almeida RF, Machado L, et al. Effect of a trans fatty acid-enriched diet on biochemical and inflammatory parameters in Wistar rats. *Eur J Nutr.* 2016. 56(3):1003-1016.
- Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2007;117(1):175-84.
- Machado RM, Stefano JT, Oliveira CPMS, et al. Intake of trans fatty acids causes nonalcoholic steatohepatitis and reduces adipose tissue fat content. *J. Nutr.* 2010;140:1127–1132.
- Maedler K, Spinas GA, Dyntar D, Moritz W, Kaiser N, Donath MY. Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on b-cell turnover and function. *Diabetes* 2001;50:69–76.
- Magri TP, Fernandes FS, Souza AS, et al. Interesterified fat or palm oil as substitutes for partially hydrogenated fat in maternal diet can predispose obesity in adult male offspring. *Clin Nutr.* 2015;34(5):904-10.
- Malaguarnera M, Di Rosa M, Nicoletti F, Malaguarnera L. Molecular mechanisms involved in NAFLD progression. *J Mol Med (Berl).* 2009;87(7):679-95.
- Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem.* 2006;281(17):12093-101.
- Manickam E, Sinclair Aj, Cameron-Smith D. Suppressive actions of eicosapentaenoic acid on lipid droplet formation in 3T3-L1 adipocytes. *Lipids Health Dis.* 2010;9:57.
- Marangoni AG, Rousseau D. Engineering triacylglycerols: the role of interesterification. *Trends Food Sci Technol.* 1995;6:329-335.
- Matthan NR, Welty FK, Barrett PH, et al. Dietary hydrogenated fat increases high-density lipoprotein apoA-I catabolism and decreases low-density lipoprotein apoB-100 catabolism in hypercholesterolemic women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 1092-1097.

- Meijer GW, Weststrate JA. Interesterification of fats in margarine: effect on blood lipids, blood enzymes, and hemostasis parameters. *Eur J Clin Nutr.* 1997;51:527-534.
- 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;77:1146-1155.
- Monteiro CA, Moubarac JC, Cannon G, Ng SW, Popkin B. Ultra-processed products are becoming dominant in the global food system. *Obes Rev.* 2013;14 Suppl 2:21-8.
- Morigny P, Houssier M, Mouisel E, Langin D. Adipocyte lipolysis and insulin resistance. *Biochimie.* 2016;125:259-66.
- Mortimer BC, Simmonds WJ, Joll CA, Stick RV, Redgrave TG. Regulation of the metabolism of lipid emulsion model lipoproteins by a saturated acyl chain at the 2-position of triacylglycerol. *J Lipid Res.* 1988;29(6):713-20.
- Mozaffarian D. Dietary and Policy Priorities for Cardiovascular Disease, Diabetes, and Obesity: A Comprehensive Review. *Circulation.* 2016;133(2):187-225.
- Mozaffarian D, Micha R, Wallace S. Effects on coronary heart disease of increasing polyunsaturated fat in place of saturated fat: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS Med.* 2010;7(3):e1000252.
- Nestel PJ, Noakes M, Belling GB, et al. Effect on plasma lipids of interesterifying a mix edible oils. *Am J Clin Nutr.* 1995;62:950-955.
- Neuhofer A, Wernly B, Leitner L. An accelerated mouse model for atherosclerosis and adipose tissue inflammation. *Cardiovasc Diabetol.* 2014;13:23.
- Niot I, Poirier H, Tran TT, Besnard P. Intestinal absorption of long-chain fatty acids: evidence and uncertainties. *Prog Lipid Res.* 2009;48(2):101-15.
- Nicolosi RJ, Stucchi AF, Kowala MC, et al. 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.

- Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat Immunol*. 2011;12(8):695-708.
- Ohara N, Naito Y, Kasama K, *et al*. 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.
- Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol*. 2010; 72: 219-46.
- Oster Rt, Tishinsky Jm, Yuan Z, Robinson Le. Docosahexaenoic acid increases cellular adiponectin mRNA and secreted adiponectin protein, as well as PPAR γ mRNA, in 3T3-L1 adipocytes. *Appl Physiol Nutr Metabol*. 2010; 35: 783-739.
- Pettinelli P, Videla LA. Up-regulation of PPAR mRNA expression in the liver of obese patients: an additional reinforcing lipogenic mechanism to SREBP-1c induction. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(5):1424-30.
- Qatanani M, Szwegold NR, Greaves DR, Ahima RS, Lazar MA. Macrophage-derived human resistin exacerbates adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice. *J Clin Invest*. 2009; 119: 531–539.
- Ramírez M, Amate L, Gil A. Absorption and distribution of dietary fatty acids from different sources. *Early Hum Dev*. 2001;65 Suppl:S95-S101.
- 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.
- Rector RS, Thyfault JP, Wei Y, Lbdah JA. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: An update. *World J Gastroenterol*. 2008;14(2):185-192.
- 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, *et al*. Wright AJ. Influence of interesterification of a stearic Acid-rich spreadable fat on acute metabolic risk factor. *Lipids*. 2009;44:17-26.

- Rosselli M, Lotersztajn S, Vizzutti F, Arena U, Pinzani M, Marra F. The metabolic syndrome and chronic liver disease. *Curr Pharm Des.* 2014;20(31):5010-24.
- Sanders TA, Berry SE, Miller GJ. Influence of triacylglycerol structure on the postprandial response of factor VII to stearic acid-rich fats. *Am J Clin Nutr.* 2003; 77:777–82.
- Sanders TA, Berry SE, Baumgartner S, et al. Palmitic acid in the sn-2 position of triacylglycerols acutely influences postprandial lipid metabolism. *Am J Clin Nutr.* 2011;94(6):1433-41.
- Saravanan N, Haseeb A, Ehtesham NZ, Ghafoorunissa. Differential effects of dietary saturated and trans-fatty acids on expression of genes associated with insulin sensitivity in rat adipose tissue. *Eur J Endocrinol.* 2005;153:159–165.
- Sauma L, Stenkula KG, Kjølhede P, et al. PPAR-gamma response element activity in intact primary human adipocytes: effects of fatty acids. *Nutrition.* 2006;22:60-68.
- Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell.* 2012;148(5):852-71.
- Serfaty L, Lemoine M. Definition and natural history of metabolic steatosis: clinical aspects of NAFLD, NASH and cirrhosis. *Diabetes Metab.* 2008;34(6 Pt 2):634-7.
- Sessler AM, kaur N, Palta JP, Ntambi JM. Regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 mRNA stability by polyunsaturated fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 1996; 271:29854- 29858.
- Shi Y, Burn P. Lipid metabolic enzymes: emerging drug targets for the treatment of obesity. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(8):695-710.
- Silva RC, Soares DF, Lourenço MB, et al. Structured lipids obtained by chemical interesterification of olive oil and palm stearin. *Food Sci Technol.* 2010;43: 752–8.
- Srivastava RA, Jahagirdar R, Azhar S, Sharma S, Bisgaier CI. Mol Cell Biochem. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha selective ligand reduces adiposity, improves insulin sensitivity and inhibits atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Mol Cell Biochem.* 2006;285(1-2):35-50.

- Spady DK, Dietschy JM. Dietary saturated triacylglycerols suppress hepatic low density lipoprotein receptor activity in the hamster. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(13):4526-30.
- 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.
- Storch J, Zhou YX, Lagakos WS. Metabolism of apical versus basolateral sn-2-monoacylglycerol and fatty acids in rodent small intestine. *J Lipid Res*. 2008;49(8):1762-9.
- Subramanian S, Han CY, Chiba T, et al. Dietary cholesterol worsens adipose tissue macrophage accumulation and atherosclerosis in obese LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(4):685-91.
- Suganami T, Tanimoto-Koyama K, Nishida J, et al. 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;27:84-91.
- Suganami T, Ogawa Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J Leukoc Biol*. 2010;88(1):33-9.
- 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*. 2007;4:3.
- Sutter AG, Palanisamy AP, Lench JH, et al. Dietary Saturated Fat Promotes Development of Hepatic Inflammation through Toll-Like Receptor 4 in Mice. *J Cell Biochem*. 2015;9999:1-9.
- Schmitz-Peiffer C, Craig DL, Biden TJ. Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. *J Biol Chem*. 1999;274(34):24202-10.
- TACO. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - 4ª Edição- 2011. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/tabela.php?ativo=tabela>.
- Targher G, Arcaro G. Non-alcoholic fatty liver disease and increased risk of cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2007;191:235-240.

- 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.
- Tateya S, Tamori Y, Kawaguchi T, et al. An increase in the circulating concentration of monocyte chemoattractant protein-1 elicits systemic insulin resistance irrespective of adipose tissue inflammation in mice. *Endocrinology.* 2010;151(3):971-9.
- Temme EH, Mensink RP, Hornstra G. Comparison of the effects of diets enriched in lauric, palmitic, or oleic acids on serum lipids and lipoproteins in healthy women and men. *Am J Clin Nutr.* 1996;63(6):897-903.
- Thomson AB, Keelan M, Garg ML, Clandinin MT. Intestinal aspects of lipid absorption: in review. *Can J Physiol Pharmacol.* 1989;67(3):179-91.
- Tian G, Sol ER, Xu Y, Shuai H, Tengholm A. Impaired cAMP generation contributes to defective glucose-stimulated insulin secretion after long-term exposure to palmitate. *Diabetes.* 2015;64(3):904-15.
- Tran TT, Postal BG, Demignot S, et al. Short-term palmitate supply impairs intestinal insulin signaling via ceramide production. *J Biol Chem.* 2016;291(31):16328-38.
- Trauner M, Arrese M, Wagner M. Fatty liver and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1801(3):299-310.
- Vats D, Mukundan L, Odegaard JL, et al. Oxidative metabolism and PGC-1 β attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell Metab.* 2006;4:13–24.
- Vlahov G. Regiospecific analysis of natural mixtures of triglycerides using quantitative ^{13}C nuclear magnetic resonance of acyl chain carbonyl carbons. *Mag Reson Chem.* 1998;36:359–62.
- Vilarrasa E, Tres A, Bayés-García L, Parella T, Esteve-Garcia E, Barroeta AC. Re-esterified palm oils, compared to native palm oil, do not alter fat absorption, postprandial lipemia or growth performance in broiler chicks. *Lipids.* 2014;49(8):795-805.
- Wang D, Wei Y, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology.* 2006;147:943–951.

- 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.
- Weisberg SP, Hunter D, Huber R, et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J. Clin. Invest.* 2006;116:115-124.
- Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1785-8.
- Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest.* 2005;115:1111-1119.
- Westerbacka J, Kolak M, Kiviluoto T, et al. Genes involved in fatty acid partitioning and binding, lipolysis, monocyte/macrophage recruitment and inflammation are overexpressed in the human fatty liver of insulin-resistant subjects. *Diabetes*. 2007;56:2759-2765.
- Westerbacka J, Lammi K, Häkkinen AM, et al. Dietary fat content modifies liver fat in overweight nondiabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:2804-2809.
- Wilke MS, Clandinin MT. Influence of dietary saturated fatty acids on the regulation of plasma cholesterol concentration. *Lipids*. 2005;40(12):1207-13.
- WHO. Noncommunicable diseases prematurely take 16 million lives annually, WHO urges more action, 2015. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/noncommunicablediseases/en>.
- Yli-Jokipii K, Kallio H, Schwab U, et al. Effects of palm oil and transesterified palm oil on chylomicron and VLDL triacylglycerol structures and postprandial lipid response. *J Lipid Res.* 2001;42:1618–1625.
- Youssef-Elabd EM, McGee KC, Tripathi G, et al. Acute and chronic saturated fatty acid treatment as a key instigator of the TLR-mediated inflammatory response in human adipose tissue, in vitro. *J Nutr Biochem.* 2012;23(1):39-50.
- Yubero-Serrano EM, Delgado-Lista J, Tierney AC, et al. Insulin resistance determines a differential response to changes in dietary fat modification on

metabolic syndrome risk factors: the LIPGENE study. *Am J Clin Nutr.* 2015;102(6):1509-17.

Zadelaar S, Kleemann R, Verschuren L, et al. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1706–21.

Zock PL, de Vries JH, de Fouw NJ, Katan MB. Positional distribution of fatty acids in dietary triglycerides: effects on fasting blood lipoprotein concentrations in humans. *Am J Clin Nutr.* 1995;61(1):48-55.

ANEXO 1. Ressonância Nuclear Magnética das gorduras Palmítico (acima) e Palmítico Interesterificada (abaixo).

ANEXO 2. Ressonância Nuclear Magnética das gorduras Esteárico (acima) e Esteárico Interesterificada (abaixo).

ANEXO 3. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

À

Profa. Dra. Edna Regina Nakandakare/Dra. Ana Maria Pita Lottenberg

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 03.10.2012 tomou conhecimento que 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.” contempla o sub-projeto intitulado: “Efeito da ingestão da gordura interesterificada sobre vias inflamatórias e metabólicas no fígado e tecido adiposo de camundongos LDLr-KO” que será Doutorado da(o) aluna(o) Maria Silvia Ferrari Lavrador, tendo como orientador(a) Dra. Ana Maria Pita Lottenberg.

CEP-FMUSP, 04 de outubro de 2012.

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