RENATA DE PAULA ASSIS BOMBO

**Ação dos fitoesteróis sobre lesão aterosclerótica em
camundongos com ablação gênica do receptor de LDL**

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

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Dra. Ana Maria Pita
Lottenberg

**São Paulo
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Bombo, Renata de Paula Assis

Ação de fitoesteróis sobre lesão aterosclerótica em camundongos com ablação
gênica do receptor de LDL / Renata de Paula Assis Bombo. -- São Paulo, 2014.

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

Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Ana Maria Pita Lottenberg.

Descritores: 1.Fitoesteróis 2. Colesterol 3.Hipercolesterolemia
4.Aterosclerose 5.Camundongos Knockout 6.Dieta

USP/FM/DBD-185/14

Este estudo foi 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 desenvolvido com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP # 11/50239-4) e Bolsa de Doutorado (CNPq).

Ao meu marido, Jayme, pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza.

Sem você nenhuma conquista valeria a pena.

Amo-te e te amarei sempre.

*Aos meus queridos, Marina, Julia e Tiago,
os melhores filhos que uma mãe poderia ter.*

AGRADECIMENTOS

À Dra. Ana Maria Lottenberg, mais que uma orientadora, se tornou uma grande amiga. Muito obrigada pela oportunidade de ter realizado esse trabalho e por todos os ensinamentos recebidos, tanto acadêmicos como principalmente, de vida. Obrigada pelo carinho e pela atenção dedicados ao longo destes anos.

Ao Dr. Eder Quintão, que me proporcionou a oportunidade de voltar ao mundo acadêmico e que apresentou à Agrônoma o mundo da Aterosclerose. O senhor é uma inspiração a todos que têm a sorte de poder conviver ao seu lado. Para mim, é uma honra poder ter feito parte do seu grupo.

À Dra Edna Regina Nakandakare, obrigada por ter me aberto as portas do Laboratório de Lípidos. Obrigada pela confiança e pelo auxílio acadêmico durante esses anos.

À FAPESP e CNPq, pelo auxílio financeiro indispensável para a realização deste trabalho.

À Dra. Marisa Passarelli, obrigada pelas explicações tão importantes e pelas aulas maravilhosas de TRC e proteínas, as quais nunca me esquecerei. As “chaperonas” nunca mais saíram de minha mente.

À Dra. Valéria Sutti Nunes, obrigada por toda a sua ajuda técnica e intelectual indispensáveis para a conclusão deste trabalho. Obrigada, também, pelo seu carinho incansável.

À Dra. Patricia M. Cazita, minha querida amiga Paty, obrigada pela amizade fiel. Você se tornou aquela verdadeira amiga que aparece nos momentos mais difíceis, sem que precisemos chamar.

À Dra. Roberta M. Machado, obrigada pela amizade e pela ajuda técnica com os animais. Posso dizer, enfim, que superei o episódio do “tissue-tek”. Obrigada pela companhia no Rio, Milão e Recife. Sem você esse doutorado não teria sido o mesmo.

Ao Dr. Sérgio Catanozi, obrigada pela ajuda com os animais, e por me ensinar que os camundongos “se fingem de morto” em dias de muito frio.

À querida companheira Milessa S. Afonso, obrigada pela ajuda incansável no decorrer de todo esse tempo. Obrigada por estar sempre pronta a ajudar, mesmo quando eu estava longe. A sua colaboração, neste trabalho, foi muito valiosa.

À Maria Silvia Ferrari Lavrador, obrigada pelo apoio incondicional, pelas conversas durante as cirurgias. Valeu a experiência de termos compartilhado momentos que ficarão para a vida toda.

À Tatiana M. Venâncio, obrigada pela paciência em nos ensinar a fazer PCR. Você, com sua doçura, me ensinou muito.

À Fabiana Dias Ferreira, obrigada por estar sempre disponível a todos nós alunos, com sua delicadeza, sempre pronta a ajudar e resolver problemas.

À Dra. Márcia Koike, obrigada pela colaboração técnica nas leituras das lâminas de “oil red” e macrófagos. Sua competência é invejável.

Ao Prof. Dr. Chin Jia Lin, obrigada pela colaboração na interpretação dos resultados do PCR. O senhor sempre tão disponível e atencioso é um exemplo de dedicação profissional.

À Maria Aparecida Silva, obrigada pela ajuda na Comissão de Pós-Graduação.

À Claudia Souza, obrigada pelas cotações, compras de material e toda a parte burocrática envolvida na realização deste trabalho.

À Senaria Eguti, obrigada pela ajuda no esclarecimento de dúvidas burocráticas, que sempre nos acompanham.

À Rosibel, obrigada pelo seu trabalho. Nada seria possível sem o seu cafezinho matinal.

Aos amigos mais jovens, Rodrigo, Juliana, Ligia, Paula, Diego, Gabriela, Adriana, Camila, Fernanda, Karol, Lis, obrigada por tornar o laboratório um ambiente tão agradável de se trabalhar. Sentirei muita falta de toda essa “moçada”.

Ao Dr. Simão Lottenberg, querido médico e amigo, um agradecimento especial, afinal, foi por meio de você que tudo começou.

Agradeço a todos os que sempre me apoiaram, que apostaram em mim e que, com certeza, são os que mais compartilham comigo minha alegria nesse momento especial.

*“Se enxerguei mais longe, foi porque
estava sobre os ombros de gigantes”.*
(Isaac Newton).

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Fitoesteróis	7
1.1.1 Mecanismos envolvidos na redução do colesterol.....	9
1.1.2 Competição no momento da absorção	9
1.1.3 Estímulo da excreção transintestinal de colesterol (TICE).....	12
1.1.4 Formas de consumo dos fitoesteróis	13
1.2 Fitoesteróis e aterosclerose	14
1.2.1 Estudos com humanos.....	14
1.2.2 Estudos epidemiológicos	16
1.2.3 Estudos com células	19
1.2.4 Estudos em animais.....	20
2 JUSTIFICATIVA	25
3 OBJETIVO.....	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1 Animais	29
4.2 Protocolo alimentar	29
4.3 Lípides plasmáticos	31
4.4 Perfil de lipoproteínas	31
4.5 Preparo das artérias para análise da área de lesão	31
4.6 Análise da área de depósito de lípides	32
4.7 Determinação do conteúdo de macrófago na área de lesão aterosclerótica por imuno-histoquímica	32
4.8 Cromatografia gasosa/espectrometria de massa (CG/MS).....	33
4.8.1 Medida da concentração de fitoesteróis no plasma	33

4.8.2 Medida da concentração de esteróis nas artérias, fígado, intestino e baço	35
4.9 Análise de expressão de RNA mensageiro por RTq-PCR em tempo real dos macrófagos de peritônio e do fígado de camundongos.....	36
4.9.1 Extração do RNA e avaliação da integridade.....	36
4.9.2 RTq-PCR em tempo real.....	37
4.10 Análise estatística	39
5 RESULTADOS	42
6 DISCUSSÃO.....	51
7 CONCLUSÃO.....	60
8 REFERÊNCIAS	62
APÊNDICES	

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCA1	<i>ATP-binding cassette transporter A1</i>
ABCG1	<i>ATP-binding cassette transporter G1</i>
ABCG5	<i>ATP-binding cassette transporter G5</i>
ABCG8	<i>ATP-binding cassette transporter G8</i>
ACAT	Acilcolesterol aciltransferase
Apo A-I	Apolipoproteína A-I
Apo B-48	Apolipoproteína B-48
Apo E	Apolipoproteína E
ApoE Ko	Ablação gênica para a apolipoproteína E
CD36	<i>Cluster differentiation 36</i>
CE	Colesterol éster
CETP	Proteína transferidora de colesterol esterificado
CL	Colesterol livre
CML	Célula muscular lisa
CT	Colesterol total
DCV	Doença cardiovascular
FE	Fitoesteróis
FL	Fosfolípidos
FPLC	Cromatografia em gel de filtração
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
HMG-CoA redutase	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase
IL-10	Interleucina-10
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de massa corpórea
LCAT	Lecitina colesterol aciltransferase
LDL-c	Lipoproteínas de baixa densidade
LDLr-KO	Ablação gênica para o receptor de LDL
LXR	Receptor X hepático (<i>Liver X receptor</i>)
mRNA	RNA mensageiro

MTP	Proteína microssomal de transferência de triglicérides
PCR	Proteína C Reativa
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxisoma (<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>)
QM	Quilomícron
SCAP	Proteína ativadora da clivagem do SREBP
SREBP	Proteína de ligação ao elemento responsivo a esteroide
TG	Triglicérides
TRC	Transporte reverso do colesterol
VCT	Valor calórico total
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição percentual dos ácidos graxos presentes na gordura utilizada no preparo da dieta30
Tabela 2	Comparação com os tempos de retenção e os espectros de massa da curva-padrão35
Tabela 3	Consumo alimentar, ganho de peso, peso do fígado, tecido adiposo epididimal, dos animais LDLr-KO alimentados com dietas-controle e FE por 16 semanas.42
Tabela 4	Concentrações plasmáticas de lípides (triglicérides e colesterol) e lipoproteínas dos animais LDLr-KO alimentados com dietas-controle e FE por 16 semanas.44
Tabela 5	Análise de esteróis no plasma44
Tabela 6	Análise de esteróis na artéria45
Tabela 7	Expressão de RNA mensageiro dos genes envolvidos no efluxo/influxo de colesterol em macrófagos46
Tabela 8	Concentração de triglicérides e colesterol no fígado47
Tabela 9	Expressão de RNA mensageiro dos genes lipolíticos e lipogênicos no fígado48
Tabela 10	Concentrações de esteróis no fígado ($\mu\text{g}/100\text{ mg}$ fígado) de camundongos LDLr-KO alimentados com dietas-controle e FE por 16 semanas.....48
Tabela 11	Concentrações de esteróis no baço ($\mu\text{g}/\text{g}$ baço) de camundongos LDLr-KO alimentados com dietas-controle e FE por 16 semanas.....49
Tabela 12	Análise de esteróis no intestino ($\mu\text{g}/\text{g}$ intestino) de camundongos LDLr-KO alimentados com dietas-controle e FE por 16 semanas.....49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Transporte reverso de colesterol. A HDL promove o efluxo de colesterol de tecidos periféricos, incluindo macrófagos da parede arterial, e transporta-o para o fígado, para que este possa ser excretado. O ABCA1 transporta FL e CL para partículas de apo A-I pobres em lípidos, gerando pre- β -HDL e HDL. O ABCG1 promove efluxo de colesterol de macrófagos para HDL maduras. A LCAT esterifica o colesterol nas HDL. O CE das HDL pode retornar ao fígado e ser captado por receptores SR-BI, ou pela ação da CETP ser trocado por TG.	4
Figura 2	Estrutura dos esteróis.	8
Figura 3	Estrutura da micela e mecanismo de competição entre colesterol e FE no interior dessa estrutura: A – suplementação alimentar de FE; B – mecanismo de competição no interior da micela: o FE possui maior afinidade físico-química pela micela, dificultando a solubilização e incorporação do colesterol em seu interior; C – maior excreção fecal de colesterol.	10
Figura 4	Absorção dos esteróis no enterócito: A – aproximação da micela na borda em escova do enterócito; B – o colesterol e os FE não esterificados, isto é, na forma livre (CL e FL), entram na célula através da proteína transportadora de esteróis NPC1L1 C – o CL é esterificado pela ACAT2 no retículo endoplasmático (RE), assim como uma pequena parte dos FL também pode ser esterificada por meio dessa mesma enzima; D – a maior parte dos FL retorna à luz intestinal através das proteínas transportadoras ABCG5 e ABCG8 – o CE, juntamente com o fitoesterol éster, TG e apoB 48 CG, formam os QM, que são carregados pelo sistema linfático.	11
Figura 5	Esquema ilustrativo do TICE (excreção transintestinal de colesterol). É um sistema ativo presente na porção proximal do intestino delgado e envolve o transporte de colesterol nas membranas apical e basolateral dos enterócitos de volta para a luz intestinal. Adaptado de Le May <i>et al.</i> , 2013.	12

Figura 6	Anatomia do coração de camundongos. A distância entre B e C é de, aproximadamente, $250 \pm 58 \mu\text{m}$ e, entre C e D, $280 \pm 67 \mu\text{m}$. A área avaliada compreende a distância entre C e D (Paigen B <i>et al.</i> , 1987).....	32
Figura 7	Perfil lipídico das lipoproteínas dos animais LDLr-KO alimentados com dietas-controle e FE por 16 semanas.	43
Figura 8	Desenvolvimento de aterosclerose. A área de lesão foi determinada na raiz aórtica dos animais LDLr-KO alimentados por 16 semanas com as dietas-controle e FE. Cortes consecutivos foram analisados para (A) infiltrado lipídico, marcados por Oil Red-O; (B) infiltrado de macrófagos (anti-CD68). Os seguintes parâmetros foram quantificados: (C) área de lesão aterosclerótica (n=10); (D) área de macrófagos (n=9).....	45
Figura 9	Correlação entre concentração de campesterol e β -sitosterol na artéria e lesão aterosclerótica. Correlação de Spearman.	46
Figura 10	Correlações entre concentração de plasmática β -sitosterol e área de macrófago (A) e área de lesão (B). Correlação de Spearman.	47

RESUMO

Bombo RPA. *Ação dos fitoesteróis sobre lesão aterosclerótica em camundongos com ablação gênica do receptor de LDL* [Tese]. São Paulo: [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Introdução: Os fitoesteróis (FE) são reconhecidos por reduzirem a concentração plasmática de LDL-colesterol, sendo importantes coadjuvantes no tratamento da hipercolesterolemia moderada. Entretanto, estudos publicados recentemente demonstram resultados conflitantes em relação à eficiência dos FE na prevenção da aterosclerose. Além disso, algumas investigações evidenciaram que o aumento da concentração plasmática de FE está positivamente relacionado ao risco de desenvolvimento de aterosclerose. Com a finalidade de elucidar a sua ação sobre esses parâmetros, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de FE no desenvolvimento da aterosclerose em camundongos com ablação gênica para o receptor de LDL (LDLr-KO). **Métodos:** Os animais foram alimentados durante 16 semanas, com dieta rica em gordura (40% do valor calórico total da dieta), suplementada (grupo FE; 2%, n=10) ou não (Controle; n=10) com FE. Foram avaliadas as concentrações plasmáticas e hepáticas de colesterol, triglicérides, FE (β -sitosterol, campesterol e latosterol). Na aorta dos animais, determinaram-se as concentrações de colesterol total, colesterol livre e éster e FE, além do infiltrado de macrófagos e infiltrado de lípidos. Nos macrófagos do peritônio dos animais, os quais assemelham-se aos presentes na artéria, avaliou-se a expressão de RNA mensageiro dos genes envolvidos no efluxo e influxo de colesterol (ABCA1, ABCG1, LOX1 e CD36). Também determinou-se as concentrações de FE no intestino e baço dos animais. **Resultados:** Conforme esperado, o consumo de FE induziu elevação plasmática dos principais FE, campesterol e de β -sitosterol, reduzindo a concentração de colesterol no plasma. Houve aumento nas concentrações hepáticas de triglicérides e FE, entretanto, não foram observadas diferenças entre os grupos nas expressões de RNA mensageiro de genes lipolíticos (CPT, PPAR alfa) e lipogênicos (SREBP1-c, MTP, LXR e PPAR gamma) no fígado. Não houve, também, alteração no SREBP2, gene relacionado à síntese de colesterol. O conteúdo de colesterol total na artéria foi menor nos animais do grupo FE, não diferindo entre as formas livre e éster. As concentrações de FE na artéria foram iguais entre os grupos. A área de lesão no grupo FE foi menor em relação ao grupo-controle. A suplementação com FE induziu redução na expressão de RNA mensageiro de ABCG1, não interferindo na expressão dos outros genes estudados na artéria. **Conclusão:** Os achados deste estudo demonstram que a elevação de FE no plasma não induziu o seu acúmulo na parede da artéria e preveniu o desenvolvimento da aterosclerose.

Descritores: Fitoesteróis; Colesterol; Hipercolesterolemia; Aterosclerose; Camundongos *Knockout*; Dieta.

SUMMARY

Bombo RPA. *Phytosterols effects over atherosclerotic lesion in mice with ablation of the LDL receptor gene* [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Introduction: The plasma cholesterol-reducing effect of phytosterols (PS) is well recognized and they are considered important adjuncts in the treatment of moderate hypercholesterolemia. However, recent studies have shown conflicting results regarding the efficiency of PS in the prevention of atherosclerosis. In addition, some studies showed that the increase in plasma PS concentration is positively correlated to the risk of atherosclerosis. In order to elucidate its action on these parameters, the objective of this study was to evaluate the effects of PS supplementation in the development of atherosclerosis in LDL receptor knock-out mice (LDLr - KO). **Methods:** The animals were fed during 16 weeks with high fat diet (40 % of calories as fat), supplemented (PS group, 2%, n = 10) or not (Control, n = 10) with PS. Plasma and liver concentrations of cholesterol, triglycerides, PS (β - sitosterol, campesterol and lathosterol) were evaluated. In the aorta of the animals, the concentrations of total cholesterol, free cholesterol, cholesterol ester and PS, besides macrophage and lipids infiltration were determined. The mRNA expression of genes involved in cholesterol efflux and influx (ABCA1, ABCG1, LOX1 and CD36) were evaluated, in peritoneum macrophage, which resemble those present in the artery. It was also determined the intestine and spleen PS concentrations from the animals of both groups. **Results:** As expected, PS supplementation induced increasing plasma concentration of the main PS, campesterol and β -sitosterol and reducing cholesterol plasma concentration. It was observed an increase so intestine and spleen PS concentrations. There was an increase in hepatic triglyceride concentrations and PS, however, no differences were observed between the groups of hepatic mRNA expression of lipolytic (CPT, PPAR α) and lipogenic genes (SREBP1c, MTP, CPT, LXR, and PPAR gamma). There was no difference on SREBP2, gene related to cholesterol synthesis. The content of total cholesterol in the artery was lower in PS group animals however did not differ between the free and ester forms. Artery PS concentrations did not differ between groups. The lesion area in the PS group was lower than in the control group. PS supplementation induced reduction in mRNA expression of ABCG1, not affecting the expression of other genes studied in artery. **Conclusion:** The findings of this study demonstrate that the elevation of plasma PS concentration did not induce its accumulation in the arterial wall and prevented the development of atherosclerosis.

Descriptors: Phytosterols; Cholesterol; Hypercholesterolemia; Atherosclerosis; Knockout mice; Diet.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A aterotrombose apresenta maior prevalência entre as principais causas de mortalidade, acometendo, aproximadamente, 52% da população mundial, superando o câncer (24%) e as doenças infecciosas (19%) (Guilbert, 2001). Relaciona-se diretamente à concentração plasmática de colesterol, cuja importância foi evidenciada nos vários estudos epidemiológicos que mostraram sua correlação com diversos eventos cardiovasculares (Murray *et al.*, 1997; Kuller, 2000; Libby, 2002; Cui *et al.*, 2007). A colesterolemia representa, juntamente com o tabagismo, a hipertensão arterial e o Diabetes Mellitus, um dos principais fatores de risco para doença cardiovascular (DCV) (Wilson *et al.*, 1998).

Conduas terapêuticas com o objetivo de reduzir e tratar fatores de risco, especialmente a elevação da concentração plasmática de colesterol, promoveram diminuição significativa da mortalidade por DCV em diversos países (Menotti *et al.*, 2007).

A concentração plasmática de colesterol desempenha papel central na gênese da aterosclerose, processo que se inicia com a retenção, agregação e modificação das partículas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) na camada íntima (Skalén *et al.*, 2002), sendo captadas por macrófagos da parede arterial, os quais se transformam em células espumosas (*foam cells*). Os macrófagos das lesões ateroscleróticas expressam diferentes receptores *scavengers*, dentre eles, LOX1 (*Lectin-like oxLDL receptor*) e CD36 (*Cluster of differentiation 36*) (Ross, 1999), os quais captam partículas de LDL que sofreram modificações, como oxidação e/ou glicação (Rosenson *et al.*, 2012).

A LOX-1 reconhece as LDL oxidadas presentes nas células endoteliais e tem sua regulação aumentada por essas partículas, pela angiotensina II, pela endotelina, por citocinas e pelo *shear-stress*, todos participantes do processo de aterosclerose. Esse receptor está aumentado nas artérias de

animais hipertensos, dislipidêmicos e diabéticos (Mehta *et al.*, 2006). O aumento de LOX-1 tem sido identificado em lesões ateroscleróticas de diversas espécies animais e humanas, não somente no endotélio, mas, também, na neovasculatura da placa aterosclerótica. Também está, frequentemente, colocalizado em células apoptóticas (Mehta *et al.*, 2006). A inibição do LOX-1 está associada com a atenuação da aterosclerose (Mehta *et al.*, 2006).

Já o receptor CD36, além de estar envolvido na captação das LDL modificadas, parece contribuir para um processo de inflamação crônica na artéria, uma vez que participa da sinalização de vias pró-inflamatórias (Moore; Freeman, 2006).

Essa captação proporciona o enriquecimento do macrófago com colesterol e seus metabólitos, como os oxisteróis, os quais se ligam a receptores nucleares como o LXR (Receptor X hepático), proporcionando a transcrição gênica dos transportadores da família dos *ATP-binding cassette* (ABC) ABCA1 e ABCG1 (Adorni *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2013). Dessa forma, esses transportadores são primordiais na etapa inicial do transporte reverso de colesterol (Wang *et al.*, 2007).

O transportador ABCA1 é responsável por efluxar o colesterol dos macrófagos para a apolipoproteína A1 (apoA1), principal proteína encontrada na superfície das partículas de HDL (lipoproteínas de alta densidade) (von Eckardstein *et al.*, 2001), enquanto o ABCG1 efluxa o colesterol para partículas mais maduras de HDL. Os dois transportadores agem conjuntamente (Rothblat *et al.*, 2010). Este processo, conhecido como transporte reverso de colesterol (TRC), tem como finalidade a remoção de colesterol de células periféricas, como o macrófago arterial, direcionando-o para o fígado, para posterior secreção na bile (Figura 1) (Rosenson *et al.*, 2012). O desequilíbrio entre a captação e o efluxo de colesterol é um dos determinantes para a formação das *foam cells* e, portanto, da aterosclerose (Pennings *et al.*, 2006).

Figura 1 - Transporte reverso de colesterol. A HDL promove o efluxo de colesterol de tecidos periféricos, incluindo macrófagos da parede arterial, direcionando-o para o fígado, para que este possa ser excretado na bile. O ABCA1 transporta FL e CL para partículas de apo A-I pobres em lípidos, gerando pré-β-HDL e HDL. O ABCG1 promove efluxo de colesterol de macrófagos para HDL maduras. A LCAT esterifica o colesterol nas HDL. O CE das HDL pode retornar diretamente ao fígado por meio do reconhecimento a receptores SR-BI, ou indiretamente, por meio das partículas de VLDL e LDL, para as quais o colesterol é transferido pela ação da CETP, que simultaneamente transfere TG para as HDL.

O ABCA1 é fundamental na biogênese das partículas de HDL-colesterol e na homeostase de colesterol, atuando sobre o efluxo de colesterol em macrófagos (Rader, 2006). Desde a descoberta da relação inversa entre a concentração de HDL e doença cardiovascular, modificações no metabolismo da HDL e expressão de ABCA1 têm sido consideradas potenciais alvos de intervenções terapêuticas no combate à aterosclerose (Aiello *et al.*, 2002). Resultados de estudo com camundongos hiperlipidêmicos demonstraram que a completa deficiência de ABCA1 ocasionou a diminuição das concentrações de lípidos plasmáticos e severo acúmulo de *foam cells* na pele e no útero dos animais, sem afetar o desenvolvimento de aterosclerose (Aiello *et al.*, 2002). Entretanto, quando foi realizada a inativação do ABCA1 nos monócitos, houve um marcante

aumento no desenvolvimento da aterosclerose, sem afetar as concentrações lipídicas do plasma dos animais (Aiello *et al.*, 2002).

Assim como o ABCA1, o ABCG1 exerce papel importante no efluxo de colesterol e sua expressão no macrófago pode proteger contra a aterosclerose. Estudo em camundongo com ablação gênica para o receptor de LDL indicou que o efeito da deficiência de ABCG1 no desenvolvimento da lesão depende do estágio da aterosclerose (Meurs *et al.*, 2012). Estudo anterior indicou que o aumento da expressão de ABCG1 no mesmo modelo animal aumentou a aterosclerose, apesar do seu papel de promover o efluxo de colesterol das células (Basso *et al.*, 2006).

À medida que recentes evidências sustentam um potencial papel deletério do ABCG1 no desenvolvimento da aterosclerose e incidência de doença cardiovascular em humanos, mais investigações se fazem necessárias para se explorar o completo espectro de ação do ABCG1 a esse respeito (Le Goff; Dallinga-Thie, 2011).

O acúmulo da concentração plasmática de colesterol pode ser de causa primária ou secundária. A forma primária caracteriza-se por um defeito no gene do receptor de LDL (receptor B/E), o qual ocasiona o aumento dessas partículas na circulação. Entre as causas secundárias, destacam-se o Diabetes Mellitus, doença que induz a glicação das partículas de LDL (Soran *et al.*, 2011), diminuindo a sua afinidade por receptores B/E (Passarelli *et al.*, 1997). Além disso, outras causas, como a síndrome metabólica (Lutsey *et al.*, 2008) e a alimentação (Billett *et al.*, 2000), também podem contribuir com a elevação da concentração plasmática de colesterol.

Embora o colesterol alimentar (em média, 300 mg/dia) induza elevação da colesterolemia, sua contribuição para a totalidade do colesterol presente na luz intestinal em humanos é pequena; a bile é sua principal fonte (800 a 1.200 mg/dia) (Mok *et al.*, 1979). Apesar da constatação de que populações com alto consumo de colesterol apresentam maior incidência de aterosclerose (Stamler *et al.*, 1988), há consenso na literatura de que a quantidade e o tipo de gordura alimentar, mais que o próprio colesterol,

relacionam-se com a elevação da concentração plasmática de colesterol total e do LDL-col (NCEP, 2002).

A terapia medicamentosa introduzida há várias décadas e indicada no tratamento da hipercolesterolemia inclui diversos fármacos absorvíveis, como as estatinas, as quais são drogas inibidoras da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) (*The Scandinavian Simvastatin Survival Study*, 1994; Nissen *et al.*, 2005; Jacobson, 2006), enzima-chave para a síntese do colesterol. Posteriormente, foi desenvolvido o ezetimiba, droga inibidora da absorção intestinal de colesterol (Bays *et al.*, 2008). O uso da terapia combinada ezetimiba-estatina está bem estabelecido quando se necessita de uma redução adicional do LDL-c (Morrone *et al.*; Kawashiri *et al.*, 2012). O ezetimiba inibe a absorção intestinal do colesterol pelo bloqueio da *Niemann-Pick C1-like protein 1* (NPC1L1), proteína envolvida na absorção do colesterol e dos FE (Garcia-Calvo *et al.*, 2005).

Entretanto, apesar de reduzir a colesterolemia, os efeitos do ezetimiba mostraram-se controversos, sem evidências de benefícios no desenvolvimento da aterosclerose, como demonstrado nos estudos ENHANCE (*Ezetimibe and Simvastatins in Hypercholesterolemia Enhances Atherosclerosis Regression*) (Toth *et al.*, 2012) e SEAS (*Simvastatin Ezetimibe and Aortic Stenosis*) (Bang *et al.*, 2012). Desta forma, toda a controvérsia envolvendo o uso do ezetimiba indica que esta droga ainda não pode ser considerada uma segunda escolha isolada depois das estatinas (Wierzbicki *et al.*, 2013).

Existem evidências substanciais, resultantes de estudos clínicos controlados aleatoriamente, de que alguns alimentos e componentes alimentares podem reduzir significativamente as concentrações de LDL-colesterol. Substâncias como proteína de soja, β -glucanos e sementes oleaginosas, quando consumidas individualmente em doses predeterminadas, reduzem, aproximadamente, apenas 3% o LDL-c (Harland, 2012). Fibras e mucilagens empregadas como preparações puras são pouco eficazes, pois requerem volume ingerido elevado (Brown *et al.*,

1999). Já os FE, cuja ação hipercolesterolêmica já foi descrita há mais de 40 anos, passaram a ter aplicabilidade clínica apenas nos últimos anos, em consequência de modificações químicas que permitiram sua maior solubilidade em alimentos ricos em gordura, particularmente nas margarinas (Wester, 2000).

Diversos estudos na literatura demonstraram a sua eficiência no tratamento da hipercolesterolemia moderada (Katan, 2003). Desta maneira, o *National Cholesterol Education Program* (NCEP- ATPIII, 2002) incluiu, a partir de 2002, a recomendação da ingestão de 2 a 3g de FE para o tratamento da hipercolesterolemia moderada. Nas duas propostas de tratamento, o NCEP preconiza uma dieta com controle de gordura total e de gordura saturada, além da retirada de ácidos graxos na forma trans. Não obstante, persistem dúvidas sobre a eficiência dos FE na prevenção da aterosclerose.

1.1 Fitoesteróis

Os FE são constituintes naturais de plantas, presentes em sementes e óleos vegetais, e estão relacionados estruturalmente com o colesterol, diferenciando-se na cadeia lateral pela introdução de um grupo etil ou metil (Figura 2). São encontrados normalmente nos vegetais, sendo os mais abundantes o β -sitosterol, campesterol e estigmasterol, predominando o β -sitosterol (Ostlund, 2002). Por não serem sintetizados no organismo animal, são originados unicamente da dieta e são minimamente absorvidos (de Jong *et al.*, 2003). Por essa razão, suas concentrações plasmáticas (0,3 a 1,7 mg/dL) são muito menores que a concentração de colesterol (150 a 260 mg/dL).

Os fitoestanois, escassos na natureza, são produzidos sinteticamente pela saturação dos FE naturais, os quais possuem dupla ligação presente no anel esterol. A saturação do sitosterol resulta no sitostanol; a do campesterol, no campestanol. Estima-se que a absorção intestinal dos

fitostanóis varie de 0,02 a 0,3%, enquanto a dos FE, embora também muito baixa, esteja na faixa de 0,4 a 5%. Dessa forma, as concentrações de fitoesteróis no plasma são bem menores em comparação aos FE (Weingärtner *et al.*, 2009). O campesterol e o β -sitosterol são utilizados em investigações metabólicas como marcadores tanto de absorção de colesterol como de FE, ao passo que outros “esteróis não colesterol”, como latosterol, esqualeno, desmosterol e colesteno, precursores do colesterol, são marcadores de síntese de colesterol e suas concentrações no plasma relacionam-se inversamente com a absorção do colesterol (Miettinen *et al.*, 1989; Miettinen *et al.*, 1990; Miettinen, Gylling, 2003; Gylling *et al.*, 2004; Matthan *et al.*, 2009).

Figura 2 – Estrutura dos esteróis.

A utilização dos FE com o objetivo de diminuir o colesterol no plasma foi, inicialmente, limitada por sua baixa solubilidade na gordura, o que dificulta sua incorporação em alimentos industrializados, e também pela descoberta posterior das estatinas, drogas muito mais eficazes na redução da colesterolemia (Rosenthal, 2000). Após o desenvolvimento de métodos que possibilitaram a esterificação do FE, foi possível sua incorporação mais

eficiente na gordura alimentar, sendo adicionado, inicialmente, às margarinas. Outros alimentos, como queijo cremoso, molhos para salada, iogurte e leite, também estão sendo enriquecidos com ésteres de FE ou de fitoestanol (Law, 2000).

Uma dieta habitual fornece, em média, 150 a 400 mg/dia de FE (Weihrauch *et al.*, 1978; Katan *et al.*, 2003), e sua eficiência na redução da colesterolemia entre 10 e 15% foi observada com o consumo de 0,8 a 4 g/dia (Patel *et al.*, 2006). Investigações iniciais em seres humanos utilizaram doses elevadas de FE, pois acreditava-se que eram necessárias para impedir a absorção do colesterol (Grundy *et al.*, 1969). Uma revisão de, aproximadamente, 40 estudos observou que a dose de 2 g/dia de FE resultou na redução de 10% do LDL-colesterol e que quantidades maiores não potencializam substancialmente essa ação (Katan *et al.*, 2003).

1.1.1 Mecanismos envolvidos na redução do colesterol

O efeito hipocolesterolêmico dos FE pode ser explicado por dois mecanismos: competição no momento da absorção e estímulo da excreção transintestinal (TICE).

1.1.2 Competição no momento da absorção

A ação hipocolesterolêmica dos FE pode ser explicada por um mecanismo de competição com o colesterol nas micelas, estruturas compostas de ácidos biliares, ácidos graxos, diglicerídeos, monoglicerídeos, fosfolípides, lisofosfolípides, ácidos graxos, colesterol, FE e vitaminas lipossolúveis (Figura 3) (Law, 2000). Tanto os FE como os fitoestanois, por serem muito hidrofóbicos, possuem grande afinidade físico-química pela micela na luz intestinal, interferindo, assim, na solubilização do colesterol nessa estrutura, favorecendo a maior permanência em seu interior em

detrimento do colesterol (Ikeda *et al.*, 1988; Rosenthal, 2000; Law, 2000; Nissinen *et al.*, 2002). Dessa forma, o colesterol é deslocado para fora dessa estrutura, aumentando a sua excreção nas fezes (Figura 3). Essa ação parece ser independente da quantidade de colesterol ingerida, como também do horário de administração dos FE, conforme demonstrado em pacientes hipercolesterolêmicos (Kassis *et al.*, 2008).

Figura 3 – Estrutura da micela e mecanismo de competição entre colesterol e FE no interior dessa estrutura: A – suplementação alimentar de FE; B – mecanismo de competição no interior da micela: o FE possui maior afinidade físico-química pela micela, dificultando a solubilização e incorporação do colesterol em seu interior; C – maior excreção fecal de colesterol.

O colesterol alimentar também é transportado às células da mucosa intestinal por meio de micelas. A maior parte do colesterol alimentar encontra-se na forma livre, sendo esta preferencialmente absorvida em relação ao colesterol éster, em razão de sua melhor solubilidade na micela e especificidade por receptores intestinais (Compassi *et al.*, 1995). Além disso, os ésteres são hidrolisados por esterases intestinais e pancreáticas.

Embora o processo de absorção dos esteróis não esteja ainda completamente elucidado, diversos mecanismos moleculares envolvidos nessa etapa já foram propostos (Patel *et al.*, 2006). A NPC1L1 é a principal proteína na membrana da borda em escova responsável pela captação

desses esteróis (Altmann *et al.*, 2004) (Figura 4). No interior do enterócito, o colesterol é, em sua maior parte, esterificado pela enzima acil-colesterol-acil transferase (ACAT2) e, posteriormente, incorporado aos quilomícrons na membrana basolateral, culminando na secreção dessas partículas para o sistema linfático. Uma pequena quantidade de colesterol não esterificado retorna para a luz intestinal por meio de transportadores específicos, denominados *ATP-binding cassette transporter G5* (ABCG5) e *ATP-binding cassette transporter G8* (ABCG8) (Figura 4) (Yu *et al.*, 2002).

Figura 4– Absorção dos esteróis no enterócito: A – aproximação da micela na borda em escova do enterócito; B – o colesterol e os FE não esterificados, isto é, na forma livre (CL e FL), entram na célula através da proteína transportadora de esteróis NPC1L1 C – o CL é esterificado pela ACAT2 no retículo endoplasmático (RE), assim como uma pequena parte dos FL também pode ser esterificada por meio dessa mesma enzima; D – a maior parte dos FL retorna à luz intestinal através das proteínas transportadoras ABCG5 e ABCG8 – o CE, juntamente com o fitoesterol éster, TG e apoB 48 CG, formam os QM, que são carregados pelo sistema linfático.

Em comparação ao colesterol, a proporção de esterificação dos FE é muito inferior, mas não tão mais baixa que possa explicar sua reduzida absorção (Lin *et al.*, 2010). Além disso, os receptores ABCG5/G8 excretam os esteróis para a luz intestinal (Sanclemente *et al.*, 2009). Por essas razões, na biologia normal, admitimos que o receptor NPC1L1 do enterócito seja muito menos eficiente para absorver FE que o colesterol (Ge *et al.*,

2008). Uma ínfima parte dos FE pode ser esterificada pela ACAT2, transportada, posteriormente, por lipoproteínas e excretada pela bile (von Bergmann *et al.*, 2005) (Figura 4). A excreção biliar é, também, mais eficiente para os FE do que para o colesterol, possivelmente em razão da presença de transportadores ABCG5/G8 no canalículo biliar.

1.1.3 Estímulo da excreção transintestinal de colesterol (TICE)

Outra importante explicação para o efeito hipocolesterolêmico dos FE é o estímulo de excreção de colesterol pela mucosa intestinal, a qual ocorre independentemente da via biliar. Essa via é chamada de TICE ou excreção transintestinal de colesterol (van der Velde *et al.*, 2010). O TICE é um sistema ativo presente na porção proximal do intestino delgado e envolve o transporte de colesterol nas membranas apical e basolateral dos enterócitos de volta para a luz intestinal (Figura 5). Concluiu-se que o heterodímero ABCG5/ABCG8 está envolvido na facilitação desse fluxo de colesterol induzido pelos FE (Brufau *et al.*, 2011).

Figura 5 - Esquema ilustrativo do TICE (excreção transintestinal de colesterol). É um sistema ativo presente na porção proximal do intestino delgado e envolve o transporte de colesterol nas membranas apical e basolateral dos enterócitos de volta para a luz intestinal. Adaptado de Le May *et al.*, 2013.

1.1.4 Formas de consumo dos fitoesteróis

Com relação à forma de administração dos FE, existem algumas controvérsias entre os estudos realizados com humanos. Plat *et al.* demonstraram, em indivíduos normocolesterolêmicos, que os FE poderiam ser consumidos isoladamente, sem a necessidade de associação a um alimento fonte de colesterol (Plat *et al.*, 2000). No entanto, em estudo recente conduzido em hipercolesterolêmicos moderados, verificou-se que a ingestão diária de cápsulas contendo 2g de FE não reduziu significativamente a concentração de colesterol total ou LDL-c. Esse resultado enfatiza a importância do uso de alimentos fontes de gordura enriquecidos com os FE como melhor estratégia para se obter efeito desejável na redução do colesterol (Ottestad *et al.*, 2013). O resultado deste último estudo corrobora estudos anteriores, os quais demonstraram redução do LDL-colesterol por meio da administração de alimentos, como margarinas, suplementados com ésteres de FE (Miettinen *et al.*, 1995; Katan *et al.*, 2003).

Os produtos suplementados com FE e fitoestanois têm se mostrado eficientes não somente no tratamento da hipercolesterolemia familiar, como também no controle do colesterol por causas secundárias em indivíduos diabéticos e portadores de síndrome metabólica (Lee *et al.*, 2003; Sialvera *et al.*, 2012). Estudo realizado em indivíduos portadores de síndrome metabólica demonstrou que o consumo de margarina suplementada com FE reduziu em 42% a concentração de triglicérides e em 16% a de colesterol livre; entretanto, não foram observados efeitos nas concentrações de marcadores inflamatórios e de disfunção endotelial entre os grupos (Gagliardi *et al.*, 2010). Outro estudo recente demonstrou que os FE protegem contra a hipertrigliceridemia induzida pela dieta, provavelmente por meio de mecanismos que envolvem a modulação do metabolismo de ácidos graxos intestinais e redução na lipogênese hepática (Rideout *et al.*, 2014). No entanto, não há consenso na literatura em relação à ação dos FE

sobre a hipertrigliceridemia (Plat *et al.*, Theuwissen *et al.*, 2009; Rideout *et al.*, 2014).

Apesar da sua reconhecida ação sobre a redução da concentração plasmática de colesterol, a eficácia dos FE deve ser testada individualmente, uma vez que se demonstrou grande variabilidade na magnitude da resposta ao tratamento de indivíduos hipercolesterolêmicos (Lottenberg *et al.*, 2003).

Mais recentemente, uma publicação da *European Atherosclerosis Society (EAS Consensus Panel)* mostrou que a recomendação do consumo de FE/estanois para o tratamento da hipercolesterolemia pode ser uma opção, mesmo quando combinada com estatinas. Entretanto, é necessário enfatizar que a inclusão destas substâncias deve estar associada à mudança de hábitos alimentares: preconiza-se o aumento do consumo de frutas, vegetais e grãos, além da adequação do consumo de alimentos ricos em gordura animal (Zampelas, 2014).

1.2 Fitoesteróis e aterosclerose

Embora a recomendação do uso de FE na redução do LDL-c esteja bem estabelecida, estudos com resultados controversos vêm levantando a questão sobre o uso de FE ser realmente seguro (Silbernagel *et al.*, 2013).

1.2.1 Estudos com humanos

Argumento favorável à possível participação dos FE no desenvolvimento da aterosclerose é a sitosterolemia, doença genética rara na qual ocorre acúmulo de FE no plasma em decorrência de alterações nos receptores ABCG5 e ABCG8 (Berge *et al.*, 2000). Nessa doença, os pacientes apresentam aterosclerose prematura, associada à elevada concentração plasmática de FE e concentração plasmática de colesterol normal. Essa elevada concentração de FE é ocasionada pelo aumento da

sua absorção e diminuição da excreção biliar de FE e outros esteróis. Entretanto, o aumento da absorção de FE não afeta a absorção de colesterol nesses pacientes (Salen *et al.*, 2002). Isto provavelmente reflete o fato de os receptores ABCG5 e ABCG8 estarem mais envolvidos na excreção de FE do que de colesterol pela mucosa intestinal.

Sabe-se que a suplementação com FE aumenta sua concentração nas partículas de LDL, as quais os direcionam para depósito nos tecidos, inclusive na artéria (Miettinen; Gylling, 2005). No entanto, não se sabe se o seu acúmulo na camada íntima se relaciona com a formação de placa de ateroma. Uma vez que a sitosterolemia está associada à presença de xantomas e placas de ateroma, e resulta em aterosclerose prematura, diversos estudos foram conduzidos com o objetivo de elucidar a ação dos FE sobre a doença aterosclerótica (Weingärtner *et al.*, 2008).

Dessa forma, a associação entre aumento de concentração plasmática de FE e maior risco cardiovascular vem trazendo preocupação quanto ao uso dessa terapia no tratamento da hipercolesterolemia moderada, conforme discutido em diversas revisões sobre o tema (Glueck *et al.*, 1991; Sudhop *et al.*, 2002; Weingärtner *et al.*, 2008).

Observou-se elevação das concentrações de β -sitosterol e campesterol no plasma e no tecido valvar em portadores de doença cardiovascular (Helske *et al.*, 2008) e em pacientes que sofreram endarterectomia de carótida (Miettinen *et al.*, 2005). Por esse motivo, é possível haver relação entre a concentração de FE e a doença cardiovascular. No entanto, alterações na elasticidade da artéria carótida e na vasodilatação da artéria braquial não foram observadas em 200 indivíduos hipercolesterolêmicos com o consumo de 2 g/dia de estanois (Raitakari *et al.*, 2008). Os FE não alteraram a função endotelial em indivíduos diabéticos tipo 1 (Hallikainen *et al.*, 2008). Em contrapartida, ações desfavoráveis dos FE estão sendo apontadas na função endotelial (Sabeva *et al.*, 2009).

Mudanças no equilíbrio entre absorção e síntese de colesterol e aumento moderado de FE no plasma têm sido sugeridas como aterogênicas (Silbernagel *et al.*, 2009).

Helske *et al.* (2008) demonstraram que os FE se acumulam nas válvulas aórticas, mesmo em indivíduos com concentração normal de FE no plasma, levantando a possibilidade de que os FE representem risco ao desenvolvimento de estenose aórtica. Além disso, aumento dos FE circulantes resultou em sua concentração elevada nas válvulas aórticas, revelando que o mecanismo de deposição de FE nas válvulas aórticas está intimamente relacionado à concentração de FE no sangue (Weingärtner *et al.*, 2008).

Demonstrou-se, também, que os FE provocaram redução do diâmetro da artéria braquial em indivíduos hipercolesterolêmicos, fato não observado com os fitoestanois (Hallikainen *et al.*, 2006). Além disso, pacientes com histórico positivo de doença arterial coronariana familiar apresentaram elevada concentração plasmática de campesterol e sitosterol, apoiando a hipótese de os FE poderem representar um risco adicional para doença arterial coronariana (Sudhop *et al.*, 2002).

1.2.2 Estudos epidemiológicos

Corroborando os resultados de investigações clínicas de intervenção, alguns estudos epidemiológicos associaram a concentração plasmática de FE a eventos cardiovasculares. No entanto, até o momento, os resultados desses estudos também se mostram controversos.

Estudos prospectivos, EPIC-Norfolk e LASA, não demonstraram relação entre a concentração plasmática de FE e a doença cardiovascular em indivíduos saudáveis (Pinedo *et al.*, 2007; Fassbender *et al.*, 2008). Além disso, estudo multicêntrico italiano não demonstrou haver alterações nas concentrações plasmáticas de marcadores de absorção, como campesterol e sitosterol, com o uso de FE (Mannarino *et al.*, 2009).

O estudo *Finnish 4S Investigation*, que avaliou 868 pacientes com doença coronariana, constatou que aqueles em uso de estatina com recorrência de doença cardiovascular apresentavam maior concentração

plasmática de FE (Miettinen *et al.*, 1998). Uma possível explicação seria a diminuição da síntese de colesterol observada com as estatinas, o que facilitaria a absorção de esteróis, tanto colesterol quanto FE, fato que elevaria a concentração plasmática de fitoesteróis (Miettinen; Gylling, 2009).

Existem evidências demonstrando que os FE e fitoestanois são mais eficientes na redução do colesterol plasmático em indivíduos com fenótipo de alta absorção e baixa síntese de colesterol (Plat *et al.*, 2012).

Os resultados do PROCAM (*Prospective Cardiovascular Münster*) mostraram associação positiva entre a concentração plasmática de FE e o risco cardiovascular (Assmann *et al.*, 2006). Recentemente, o estudo LURIC, na Alemanha, indicou que o aumento na absorção de colesterol, caracterizada pelas elevadas concentrações de campesterol, sitosterol e colestanol, junto com baixa taxa de síntese de colesterol, indicada por menor concentração de latosterol no plasma, prediz aumento de mortalidade por doença cardiovascular (Silbernagel *et al.*, 2010). Importante salientar que, nestes estudos, os FE são considerados marcadores de absorção de colesterol. Em outras palavras, maior capacidade absorptiva de esteróis seria prejudicial, do ponto de vista cardiovascular, a despeito do bloqueio proporcional na síntese de colesterol por *feedback*. Chama a atenção que o tercil de valores de maior síntese e, conseqüentemente, de menor absorção, consistiu em casos com menos idade e menor concentração de proteína C reativa (PCR) no plasma – fatores previsíveis para menor grau de aterosclerose – porém, simultaneamente associados ao aumento de índice de massa corpórea (IMC), frequência de diabetes, hipertensão, trigliceridemia e diminuição do HDL-c – fatores que promovem mais aterosclerose. Portanto, fatores de proteção cardiovascular podem coincidir com os de maior risco em um mesmo grupo. Entretanto, interessante ter-se chegado a esse resultado após ajuste dos dados por fatores como idade, sexo, IMC, hipertensão, diabetes tipo 2, tabagismo e PCR, que diferiram entre aqueles no tercil dos que absorveram mais em comparação ao tercil dos que absorveram menos FE.

Em contraposição, simultaneamente, foram publicados novos dados do EPIC realizados na Espanha, mostrando menor risco cardiovascular entre os indivíduos que apresentavam maior concentração plasmática de FE (Escurriol *et al.*, 2010). Isso seria previsível se considerássemos que maior concentração plasmática de FE é consequência do aumento de sua ingestão, o que os autores efetivamente mostram para os casos controles, mas, infelizmente, não para os casos de doença cardiovascular. Na hipótese de haver efeito cardiovascular benéfico, notoriamente refletir-se-ia em bloqueio na absorção de colesterol, com aumento de sua síntese corpórea e redução no LDL-c. Por outro lado, se a concentração de FE no plasma meramente refletir maior capacidade de absorver esteróis de um modo geral, a saber, FE e colesterol, essa última condição seria compatível apenas com pior prognóstico para doença cardiovascular, o que contraria a conclusão dos autores. Importante ressaltar, no entanto, que, nessa última investigação, não houve suplementação de FE na dieta dos casos estudados. Houvesse essa suplementação, os resultados obtidos seriam compatíveis com o fato de o elevado consumo de frutas e hortaliças se relacionar com menor risco cardiovascular (Iqbal *et al.*, 2008) e, coincidentemente, com maior ingestão de FE que, simultaneamente, eleva a concentração destes no plasma, porém benéficamente reduz o LDL-c. A princípio, esse fato impede interpretar o aumento da concentração plasmática de FE como indicativo de maior absorção de esteróis (colesterol e FE), visto que o papel dos FE alimentares é, necessariamente, bloquear a absorção intestinal de colesterol, conforme demonstrado utilizando a técnica de balanço fecal de esteroides (Gylling; Miettinen, 1996). Nessa situação, a consequência obrigatória é maior síntese corpórea de colesterol, o que deveria ser comprovado por aumento de precursores de colesterol no plasma e, eventualmente, queda associada do LDL-c. No entanto, surpreendentemente, o oposto do esperado é descrito nessa investigação, a saber, maior ingestão de FE – que, de fato, elevou a sua concentração no plasma – promoveu, paradoxalmente, diminuição da síntese de colesterol, caracterizada por diminuição da concentração do precursor latosterol no

plasma. Essa diminuição, condizente apenas com a elevação de FE, refletindo, também, maior absorção de colesterol, contraria toda a literatura sobre efeitos farmacológicos dos FE (Escuriol *et al.*, 2010).

Uma das dificuldades de se associar a concentração de FE no plasma com doença vascular coronariana é o fato de que os estudos epidemiológicos foram realizados utilizando-se apenas a medida da concentração plasmática de FE. Infelizmente, não há estudos de suplementação em longo prazo que avaliem os desfechos cardiovasculares. Além disso, deve-se considerar, também, a grande variabilidade da concentração de FE no plasma, decorrente da presença de diferentes polimorfismos genéticos (Berge *et al.*, 2002).

Esses resultados antagônicos obtidos em populações e a dificuldade na interpretação dos dados, notadamente os do EPIC, levam-nos a questionar se, de fato, o emprego dos FE teria utilidade na prevenção da aterosclerose.

1.2.3 Estudos com células

Ação direta dos FE na formação de placa de ateroma é uma possibilidade, assim como a sua atividade biológica intracelular. Nesse sentido, diversos tipos celulares vêm sendo utilizados como modelo para melhor elucidar as ações específicas dos FE. Por exemplo, estudos com células cancerígenas demonstraram que os FE podem tanto reduzir (Driscoll *et al.*, 1996) como bloquear (Ju *et al.*, 2004) a proliferação celular, sendo o seu efeito dependente da dose e do tipo celular. Em razão desses achados, vem sendo também investigada a ação dos FE sobre as células endoteliais e da musculatura lisa. Demonstrou-se *in vitro* que os FE inibem tanto a proliferação de células musculares lisas (CML) como a formação de placa, evidenciando, assim, a sua ação antiproliferativa, mas sem provas da sua citotoxicidade (Atif *et al.*, 2001). Com relação a esse aspecto, estudo mais recente revelou intensa propriedade citotóxica dos FE sobre as células

endoteliais, diminuindo, mesmo em baixas concentrações, a viabilidade de células endoteliais da aorta abdominal (Rubis *et al.*, 2008). Os autores atribuem a essa ação o fato de os FE serem mais oxidados que o colesterol e, possivelmente, deslocarem colesterol da membrana celular, prejudicando a sua integridade.

Outro estudo demonstrou que o β -sitosterol exibiu atividade anti-inflamatória em células endoteliais aórticas humanas (Loizou *et al.*, 2010).

1.2.4 Estudos em animais

Animais com ablação gênica para a apolipoproteína E (ApoE-KO) alimentados com dieta hiperlipídica com a finalidade de induzir aterosclerose foram divididos em dois grupos e receberam, respectivamente, dietas com e sem FE (Moghadasian *et al.*, 1997). Os FE reduziram a colesterolemia e retardaram o desenvolvimento de aterosclerose (Moghadasian *et al.*, 1997). Posteriormente, os mesmos autores utilizaram o mesmo modelo de animais, porém divididos em três grupos, os quais receberam, respectivamente, dieta *chow*, dieta enriquecida com FE e Probucol – uma droga antioxidante e redutora da colesterolemia – e observaram redução da colesterolemia tanto com Probucol quanto com FE. Entretanto, observaram atividade antiaterogênica apenas com os FE, os quais também induziram aumento de HDL, diminuição do fibrinogênio e da atividade da lipase hepática (Moghadasian *et al.*, 1999). É importante ressaltar, no entanto, que, embora o Probucol reduza a colesterolemia, ele, adversamente, reduz também o HDL, eleva o fibrinogênio e, no ser humano, induz alterações eletrocardiográficas. Assim, essas diferenças encontradas nos parâmetros avaliados podem ter decorrido apenas da ação exacerbada do Probucol. No entanto, com a finalidade de avaliar se os FE reduzem a aterogênese induzida pelo Probucol, camundongos ApoE-KO foram submetidos à dieta aterogênica suplementada com FE, a Probucol ou à combinação deles (Moghadasian, 2006). Os autores verificaram que os FE minimizaram a ação

indesejável do Probucol, diminuindo lesões ateroscleróticas, e provocaram elevação do HDL-colesterol.

Dando continuidade a essa linha de investigação, o mesmo grupo de pesquisadores avaliou, também, no mesmo modelo de animais, a ação dos FE tanto sobre o desenvolvimento da placa aterosclerótica como sobre os marcadores inflamatórios (Nashed *et al.*, 2005). Os FE reduziram a interleucina-6 (IL-6) e elevaram a interleucina-10 (IL-10), citocinas, respectivamente, pró e anti-inflamatórias, induzindo, assim, fenótipo menos inflamatório. Essas alterações dos biomarcadores foram acompanhadas de menor lesão aterosclerótica (Nashed *et al.*, 2005). Demonstrou-se, também, que a redução da lesão em camundongos ApoE-KO foi dependente da concentração de FE na dieta, com diferença estatística apenas quando se utilizou a suplementação de 2%, não tendo sido observada alteração com as concentrações de 1% (Calpe-Berdiel *et al.*, 2005).

Apesar de diversas investigações terem mostrado redução de lesões ateroscleróticas com os FE, outros estudos contradizem esses resultados. Animais ApoE-KO, alimentados com dieta hiperlipídica com a finalidade de indução de aterosclerose, e a regressão da lesão aterosclerótica foi conseguida por introdução de dieta normal ou enriquecida com FE (Moghadasian *et al.*, 1999). O período de indução provocou elevação de colesterol, ao passo que, na fase de regressão, houve diminuição do colesterol nos dois grupos em comparação ao período anterior. Os FE, porém, não potencializaram a redução do colesterol com a dieta normolipídica. Com relação à lesão, ambos os grupos continuaram com aumento da placa aterosclerótica, embora os FE tenham induzido menor progressão. Os autores concluem que os FE não foram eficientes na regressão da lesão, provavelmente por não terem induzido diminuição substancial da colesterolemia nesses animais. Mais recentemente, encontrou-se resultado semelhante, mostrando correlação positiva entre a concentração plasmática de FE e lesão aterosclerótica no mesmo modelo de animais (Weingärtner *et al.*, 2008). Ainda nesse estudo, os autores observaram aumento da extensão da lesão cerebral após isquemia em

camundongos *wild-type*. Entretanto, a quantidade de FE utilizada nesse animal experimental foi 100 vezes maior à que costuma ser suplementada em humanos (Weingärtner *et al.*, 2008).

Algumas críticas podem ser feitas em relação ao modelo de camundongos ApoE-KO para estudos de progressão ou regressão da aterosclerose, pelo fato de induzirem hipercolesterolemia muito acentuada menos frequentemente encontrada em seres humanos e, conseqüentemente, produzirem lesões muito graves, dificultando a comparação da ação de diferentes dietas. Alguns autores afirmam que esse não é um modelo ideal para esse tipo de investigação (Moghadasian *et al.*, 1999).

Recente investigação foi conduzida em camundongos com ablação para ABCG5/G8 para se determinar a significância do sistema de excreção de FE do organismo (McDaniel *et al.*, 2013). Os animais alimentados com dieta rica em FE apresentaram morte prematura, acúmulo de FE em diversos tecidos, anormalidades hepáticas e graves lesões cardíacas, indicando um efeito extremamente tóxico dessa dieta. Esses efeitos não foram observados nos animais *wild-type*. Assim, os resultados sustentam a conclusão de que os FE são excretados do organismo por um sistema bastante eficiente, pois, em elevadas concentrações, são tóxicos (McDaniel *et al.*, 2013).

Outras pesquisas relacionando o consumo de FE com lesão aterosclerótica foram conduzidas em camundongos LDLr-KO, com a vantagem de induzir colesterolemia mais próxima da encontrada na população humana. Plat *et al.* (2006) demonstraram que, em camundongos LDLr-KO heterozigotos alimentados com FE, o aumento da concentração de FE no plasma não se relacionou com aterogenicidade e que os FE inibiram ou mesmo induziram a regressão de lesões existentes. Corroborando as ações benéficas dos FE, não se encontrou associação entre aumento de lesão aterosclerótica em camundongos LDLr-KO homozigotos com a concentração plasmática de FE; porém, ao contrário dos demais, nesse estudo, os animais não foram suplementados com FE (Wilund *et al.*, 2004).

O consumo de FE e fitoestanol aumenta a expressão gênica de RNAm para enzima conversora de angiotensina I, óxido nítrico sintase 1 e 3, e cicloxigenase, que estão associados com aumento da pressão diastólica em ratos hipertensivos (Chen *et al.*, 2009). Resultados opostos foram obtidos em estudo com hamsters (Ntanios *et al.*, 2003), nos quais os FE inibiram o desenvolvimento da aterogênese, reduzindo colesterol total e LDL-c, apesar do aumento de FE no plasma, fato que não contribuiu para o desenvolvimento de *foam cells* na artéria. Desta forma, estudos em animais apresentam controvérsias em relação à ação dos FE sobre a aterogênese.

Importante lembrar que as dietas utilizadas na maior parte dos estudos foram suplementadas com colesterol, ou colesterol associado a ácido biliar, tendo como inconveniente o desenvolvimento de lesões hepáticas. Por essa razão, não são modelos fisiológicos de ação da dieta na aterosclerose.

2 JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

Com base nos dados controversos encontrados na literatura, levanta-se a questão se há alguma evidência de que, embora os FE reduzam a colesterolemia, possam contribuir para o desenvolvimento de placas ateroscleróticas. A maior parte dos estudos experimentais com o objetivo de avaliar as possíveis ações aterogênicas dos FE foi conduzida em animais ApoE-KO, os quais desenvolvem grave hipercolesterolemia, a qual não é compatível com os valores de colesterol, mesmo que geneticamente elevados, encontrados em humanos. Além disso, esses animais desenvolvem, em poucas semanas, aterosclerose grave, o que dificulta a comparação da formação de placas entre o controle e o grupo de animais que recebeu fitoesterol. No entanto, modelo animal, utilizando camundongos LDLr-KO, deve ser mais eficiente, pois mimetiza o perfil lipídico e o grau de hipercolesterolemia encontrado no ser humano, desde que não prejudicado por ingestão de colesterol.

Em razão da existência de estudos humanos mostrando associação positiva entre a concentração plasmática de FE com aterogênese, realizados posteriormente à publicação do National Cholesterol Education Program de 2002, torna-se necessária a realização de mais investigações no sentido de elucidar as suas possíveis implicações na gênese da aterosclerose.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVO

O objetivo deste estudo é determinar se a elevação da concentração plasmática de FE em decorrência da sua suplementação na dieta induz o seu depósito na parede da artéria e pode estar envolvido no desenvolvimento da placa aterosclerótica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 20 camundongos (LDLr-KO), machos, em idade de desmame (21 dias), com base genética na linhagem C57BL/6J. As matrizes foram adquiridas do *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, EUA) e a colônia criada no biotério da Reumatologia na Faculdade de Medicina da USP.

Os animais foram mantidos no biotério da Reumatologia na Faculdade de Medicina da USP, com temperatura controlada, ciclo claro/escuro alternado de 12 horas por 16 semanas até o momento do experimento. O consumo de ração e água foi *ad libitum*.

4.2 Protocolo alimentar

Os animais foram divididos em dois grupos de forma aleatória, sendo 10 animais por grupo, os quais receberam, respectivamente, ração hiperlipídica (40% do valor calórico total sob a forma de gordura), suplementada ou não com FE 2%, por um período de 16 semanas. A mistura de FE foi gentilmente fornecida pela empresa *Resitol Indústria Química Ltda, Santa Catarina, Brasil* e era composta por β -sitosterol na maioria. As dietas foram preparadas pela empresa Nutriexperimental (Campinas, SP), seguindo as recomendações do *American Institute of Nutrition* (Reeves *et al.*, 1993), e peletizadas em nosso laboratório (Laboratório de Lípidos, FMUSP). A gordura utilizada no preparo das rações foi fornecida gentilmente pela Unilever (Valinhos, SP). A composição de nutrientes em relação ao valor calórico total (VCT) da dieta foi de 40% de carboidratos, 40% de gorduras e 20% de proteínas.

Tabela 1 – Composição percentual dos ácidos graxos presentes na gordura utilizada no preparo da dieta.

Ácido Graxo	%
Caprílico (8:0)	–
Cáprico (10:0)	–
Láurico (12:0)	0,81 ± 0,00
Mirístico (14:0)	1,07 ± 0,00
Palmítico (16:0)	39,42 ± 0,01
Margárico (17:0)	0,09 ± 0,00
Esteárico (18:0)	4,55 ± 0,01
Oleico (18:1, n-9)	38,96 ± 0,00
Vacênico (18:1, n-7)	0,93 ± 0,02
Linoleico (18:2, n-6)	12,70 ± 0,01
α-Linolênico (18:3, n-3)	0,57 ± 0,00
Eicosanoico (20:0)	0,35 ± 0,00
Eicosenoico (20:1, n-9)	0,13 ± 0,00
Docosanoico (22:0)	0,10 ± 0,00
Tetracosanoico (24:0)	–
Saturados	46,38 ± 0,01
Monoinsaturados	40,27 ± 0,00
Polinsaturados	13,27 ± 0,01

Os animais foram pesados semanalmente e o consumo alimentar foi estimado diariamente pela diferença entre o peso da ração oferecida e a sobra.

Após 16 semanas, os animais foram mantidos em privação alimentar por 12 horas e anestesiados com cetamina (100 mg/kg, *ip*, Ketalar; Parke-Davis, SP) e xilazina (10 mg/kg, *ip*, Rompum; Bayer S.A., SP). Em seguida, os animais foram dessangrados pela veia subclávia e o sangue foi coletado em tubos contendo EDTA 0,1%. Os experimentos com os animais foram conduzidos de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e o protocolo experimental foi aprovado pelo mesmo comitê (CAPPesq 100/11).

Em seguida, o coração ligado à aorta, o fígado e o tecido adiposo periepídimo foram dissecados, pesados e congelados em nitrogênio líquido e, imediatamente, estocados em ultracongelador (-80°C).

4.3 Lípides plasmáticos

O plasma foi obtido por centrifugação e armazenado a -80°C . As determinações da concentração plasmática de CT e TG foram realizadas manualmente com a utilização de *kits* enzimático-colorimétricos (*Roche Diagnostics-Mannheim*, Alemanha) utilizando alíquota de 10 μL de plasma.

4.4 Perfil de lipoproteínas

O perfil de lipoproteínas foi determinado por cromatografia em gel de filtração (FPLC). As frações foram coletadas e agrupadas de acordo com os picos das frações de VLDL, LDL e HDL. Alíquotas de cada fração foram utilizadas para determinação das concentrações de colesterol e triglicérides por *kit* enzimático-colorimétrico (Labtest Diagnóstica, MG).

4.5 Preparo das artérias para análise da área de lesão

Para assegurar a integridade do coração ligado à aorta, foi empregada uma substância criopreservante (*Tissue Tek*, OCT; Sakura) e, em seguida, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido. Foram realizados cortes seriados com espessura de 4 μm , com início na região da raiz aórtica até o início da aorta ascendente (correspondente às áreas C e D; ver Figura 6), com o uso de criostato. A região estudada foi determinada seguindo protocolo de Paigen *et al.* (1987). Os fragmentos foram fixados em lâminas silanizadas e mantidos a -20°C para posterior análise da área de depósito de lípidos e infiltrado de macrófagos na lesão arterial. Foram fixados quatro cortes em cada lâmina, analisados em intervalos de 80 μm , para assegurar uma análise representativa da área estudada.

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

4.6 Análise da área de depósito de lípidos

Os fragmentos foram corados com *Oil Red O* (Sigma-Aldrich, Brasil) e contracorados com hematoxilina de Carazzi. A quantificação do depósito lipídico foi determinada em sistema de imagem digital (Leica Qwin, Leica System) e *software* específico (*Image-Pro Plus-Media Cybernetics*, MD, USA) por um segundo avaliador que desconhecia o protocolo experimental. A média das áreas foi calculada para cada animal e, subsequentemente, para cada grupo.

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

Para se determinar os fatores que contribuem para o avanço da lesão aterosclerótica, foi avaliado o infiltrado de macrófagos que, entre outros eventos, participam do acúmulo de lípidos na parede da artéria. O conteúdo de macrófagos foi determinado por imuno-histoquímica.

Cortes da raiz aórtica foram fixados em acetona (4°C; 10 min.) e lavados em água corrente. Em seguida, foram bloqueados por 30 min. com solução tampão tris – TBS + albumina de soro bovino (BSA, 1%) + Tween 20 (0,05%) + leite desnatado (2%) – por 30 min. As lâminas foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpo primário rat anti mouse CD68 (1:500) (Serotec). Em seguida, as lâminas foram lavadas com TBS + Tween 20 (0,05%), incubadas por 30 min. com H₂O₂ (3%) para bloqueio da peroxidase endógena, novamente lavadas com TBS + Tween 20 (0,05%) e incubadas por 50 min. com anticorpo secundário sheep anti rat IgG conjugado a peroxidase (1:600). Foi aplicado substrato de revelação (DAB *Substrate Kit-Vector*) segundo informações do fabricante. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Carazzi. A área marcada com DAB (marrom), correspondendo ao infiltrado de macrófagos na parede da artéria, foi quantificada utilizando sistema de imagem digital (Leica Qwin, Leica System) e *software* específico (*Image-Pro Plus-Media Cybernetics*, Bethesda, MD, USA). As médias das áreas foram calculadas para cada animal e, subsequentemente, para cada grupo.

4.8 Cromatografia gasosa/espectrometria de massa (CG/MS)

4.8.1 Medida da concentração de fitoesteróis no plasma

As concentrações de FE (campesterol, β -sitosterol, latosterol) no plasma foram medidas por cromatografia gasosa em cromatógrafo a gás (GC) acoplado ao espectrofotômetro de massa (MS) marca Shimadzu GCMS-QP2010 plus (Kioto, Japão) utilizando versão 2.5 do *software* GCMS solution (Miettinen *et al.*, 1965).

Amostras do plasma (200 μ L) foram misturadas com o padrão interno (1 μ g de 5 α -colestane) e saponificadas com 1 mL de KOH diluído em etanol (1 mol/L) a 60°C por 1 hora. Em seguida, a amostra foi misturada com 1 mL de água e extraída por duas vezes com 2 mL de hexana. O extrato de

hexana contendo os esteróis foi seco sob fluxo de nitrogênio e derivatizado com solução silanizante, composta de 100 μ L de piridina e 100 μ L de BSTFA (N, O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida) + 1% TMCS (trimetilclorosilane) (1:1, v/v) (Supelco 33155-U) e incubada por 1 hora a 60°C.

Um microlitro da amostra derivatizada foi injetado no cromatógrafo pelo injetor automático em modo de injeção split com taxa de split 1:3 e a temperatura do injetor foi mantida em 280°C. A separação foi realizada na coluna capilar Restek (100% dimethyl polysiloxane - Rxi13323) 1ms, 30 metros de comprimento, diâmetro interno 0,25 mm, por 30 min., usando hélio como fase móvel com velocidade linear constante de 45,8 cm/s, e a temperatura do forno foi mantida em 280°C. O espectrômetro de massa operou em modo de elétron de impacto a uma voltagem de ionização de 70 eV, com a temperatura da fonte de íons e da interface a 300°C.

O GCMS-QP2010 Plus oferece a possibilidade de adquirir dados no modo Scan (todos os íons dos esteróis foram monitorados) e monitoramento do íon selecionado (SIM – *single ion monitoring*) no mesmo pico. A escolha dos íons monitorados foi obtida analisando os cromatogramas com detecção em modo scan, em comparação com outras referências (Ahmida *et al.*, 2006), o que nos permitiu a escolha do modo SIM.

Os íons selecionados foram: $m/z = 217, 149$ e 109 para 5α -colestane; $m/z = 129, 382$ e 343 para campesterol e $m/z = 129, 357$ e 486 para sitosterol, possibilitando maior sensibilidade na quantificação. A quantificação baseou-se no cromatograma de íons totais (TIC – *total ions chromatogram*), com correção pelo padrão interno 5α -colestane. A identificação baseou-se na comparação com os tempos de retenção e os espectros de massa da curva-padrão, como mostrado abaixo.

Tabela 2 – Comparação com os tempos de retenção e os espectros de massa da curva-padrão

	íon alvo	íon 1	íon2	tempo de retenção (minutos)
5α-COLESTANE	217	149	109	7,343
LATOSTEROL	255	213	458	15,427
CAMPESTEROL	129	382	343	17,197
β-SITOSTEROL	129	486	357	20,820

Foi adicionado ao plasma 5 α -colestane (5 μ g/mL) como padrão interno.

4.8.2 Medida da concentração de esteróis nas artérias, fígado, intestino e baço

As artérias, fígado, intestino e baço foram delipidados em clorofórmio: metanol (2:1) conforme método descrito por Folch *et al.* (1957). O extrato foi dividido em duas alíquotas, uma delas para medir o colesterol livre e a outra alíquota saponificada com 1 mL de hidróxido de potássio (KOH) diluído em etanol (1 mol/L) a 60°C por 1 hora para determinação do CT e FE (campesterol, β -sitosterol e latosterol). Após a saponificação, os esteróis foram extraídos com 2 mL de hexana. Ambos os extratos contendo colesterol livre e total foram submetidos aos mesmos procedimentos de cromatografia para o plasma, diferindo apenas no tempo total da cromatografia (17 min) e pelos íons selecionados, que foram: m/z = 121, 129 e 329. A quantificação baseou-se no cromatograma de íons totais (TIC), com correção pelo padrão interno. A identificação baseou-se na comparação com os tempos de retenção e os espectros de massa da curva-padrão:

	íon-alvo	íon 1	íon2	tempo de retenção (minutos)
COLESTEROL	121	129	329	13,600

A concentração dos esteróis na aorta foi corrigida pela concentração de proteína (Lowry *et al.*, 1951), ao passo que a concentração do fígado, intestino e baço foi corrigida pelo peso dos tecidos correspondentes.

4.9 Análise de expressão de RNA mensageiro por RTq-PCR em tempo real dos macrófagos de peritônio e do fígado de camundongos

4.9.1 Extração do RNA e avaliação da integridade

A extração do RNA foi padronizada por meio do emprego de colunas RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha), que permite extrair moléculas de RNA por meio de sua adesão à membrana de sílica da coluna. A utilização desta coluna dispensa o tratamento com DNase, pois a membrana remove eficientemente a maior parte do DNA contaminante. Para a avaliação da integridade, foi utilizado o kit RNA 6000 Nano (*Agilent Technologies*, Walbronn, Alemanha), que se baseia na separação eletroforética do RNA em microchips e leitura do sinal de fluorescência no aparelho Agilent 2100 Bioanalyzer (*Agilent Technologies*, Walbronn, Alemanha). Neste método, a integridade do RNA é determinada pelo cálculo do RIN (*RNA Integrity Number*). Este sistema visa eliminar a subjetividade no controle de qualidade do RNA e baseia-se em “notas” de 1 a 10 que são dadas às amostras, sendo 1 correspondente ao maior grau de degradação e 10 ao maior grau de preservação do RNA. Todas as amostras obtidas apresentaram RIN maior que 7,0, que assegura amostras de ótima qualidade. Para extração do RNA do fígado, aproximadamente, 35 mg do tecido hepático de cada animal foram macerados com 600 µL de tampão de lise (RLT) da Quiagen em aparelho Precellys (5500 rpm/5 min/4°C). Neste aparelho, são colocados tubos contendo microesferas que permitem a lise celular e homogeneização das amostras. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 13.000 rpm por 3 min a 4°C e o sobrenadante foi coletado para continuidade da extração nas colunas RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha).

4.9.2 RTq-PCR em tempo real

A primeira etapa consiste na transcrição reversa, ou seja, síntese de cDNA a partir do RNA extraído, utilizado o kit *High Capacity RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems, Foster City, EUA). A reação é realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Waltham, EUA), de acordo com o protocolo do produto, partindo-se de uma concentração inicial de 1.000 ng de RNA/μL.

A segunda etapa consiste na análise de expressão gênica por amplificação do cDNA em tempo real. Foram utilizadas sondas marcadas com FAM adquiridas no formato *TaqMan Gene Expression Assays* (Applied Biosystems, Foster City, EUA) identificadas pelos códigos abaixo:

Gene estudado macrófago	Código
ABCA1	Mm00442646_m1
ABCG1	Mm00437390_m1
LOX-1	Mm00454586_m1
CD-36	Mm01135198_m1
Gene estudado fígado	Código
SREBP1c	Mm00550338_m1
SREBP2	Mm01306292_m1
MTP	Mm00435015_m1
CPT	Mm00487191_g1
LXR	Mm00437265_g1
PPA α	Mm00440939_m1
PPAr gama	Mm01184322_m1

Na seleção das sondas, tomou-se o cuidado de escolher aquelas que amplificam junções exônicas, mais uma vez, a fim de reduzir o impacto de contaminação por DNA. Os demais reagentes para a reação de PCR foram adquiridos em solução denominada *Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, EUA). O protocolo de amplificação do sistema TaqMan recomendado pelo fabricante foi:

- 1) um ciclo de 2 min a 50°C;
- 2) um ciclo de 10 min a 95°C; e
- 3) 40 ciclos intercalando 15 s a 95°C e 1 min a 60°C.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em três réplicas no aparelho *StepOnePlus Real Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e os resultados analisados pelo *software* StepOne versão 2.1 (*Applied Biosystems*, Foster City, EUA).

Para a padronização dos controles endógenos, foram escolhidos 6 genes constitutivos (β -actina, PGK1, GAPDH, HPRT1 e 18S) a partir de levantamento da literatura (Lossos *et al.*, 2003; Arazi *et al.*, 2008), os quais foram testados em 8 amostras (4 do grupo-controle e 4 do grupo FE). Os resultados de expressão gênica dessas amostras foram submetidos à análise no programa DataAssist versão 2.0 (*Applied Biosystems*, Foster City, EUA), que se fundamenta nos princípios estabelecidos por Vandesompele *et al.* (2002) para escolha do controle endógeno. Os dois genes que apresentaram menor variação de expressão entre as amostras foram β -actina e GAPDH (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), sendo eleitos os controles endógenos do estudo.

O método escolhido para o cálculo da quantificação relativa foi o Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$) (Livak; Schmitgen, 2001), em virtude do grande número de amostras e genes-alvo a serem analisados. Neste método, não há necessidade de utilizar curva-padrão em todas as placas, o que reduz o consumo de tempo e de reagentes. No entanto, para que esse método possa ser utilizado, é necessária validação das eficiências dos ensaios dos genes-alvo e dos controles endógenos, que devem ser semelhantes.

Em função do grande número de amostras e genes analisados, não foi possível realizar todas as reações de PCR ao mesmo tempo. Para minimizar a variação interensaio, cada placa de reação continha sempre o mesmo número de amostras dos grupos-controle e FE. Cada reação de PCR dos genes-alvo sempre foi acompanhada, na mesma placa, dos dois controles endógenos, prática ideal recomendada na metodologia de PCR em tempo real (Bustin *et al.*, 2009).

Os valores de Ct (*cycle threshold*) obtidos nas curvas de amplificação de cada gene foram configurados, na padronização inicial, para se situarem, aproximadamente, no ponto médio da fase exponencial, de acordo com as

recomendações da metodologia. Para cada gene, foi utilizado sempre o mesmo Ct em todas as reações. Os valores da linha de base utilizados foram os estabelecidos pelo próprio *software* de análise (StepOne Plus versão 2.1), uma vez que se encontravam dentro dos parâmetros recomendados.

O cálculo da quantificação relativa (RQ) é realizado pelo *software* e, resumidamente, baseia-se nas seguintes fórmulas:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gene-alvo}} - Ct_{\text{controle endógeno}}$$

$Ct_{\text{gene-alvo}}$ e $Ct_{\text{controle endógeno}}$ correspondem à média dos valores de Ct das triplicatas. No caso de dois controles endógenos, como utilizado em nosso estudo, o *software* foi programado para levar em consideração o valor de ambos no cálculo.

4.10 Análise estatística

Utilizou-se teste *t* de Student para a comparação dos grupos. Considerou-se o nível de significância de 5% para todas as análises ($P < 0,05$). Tabelas e figuras apresentam dados como média $\pm$ DP. A avaliação dos dados foi feita com o uso do programa *GraphPad Prism* (GraphPad Software Inc., EUA).

A normalidade dos valores obtidos nos ensaios de PCR em tempo real foi verificada com teste de Shapiro-Wilk e pela inspeção visual de gráficos Q-Q (Q-Q plot). Utilizou-se teste *t* de Student para analisar a expressão daqueles genes cujos valores de $\Delta\Delta Ct$ obedeceram à distribuição normal. A expressão dos genes cujos $\Delta\Delta Ct$ s não seguiram a distribuição normal foi avaliada por teste de *Wiconxon-Mann-Whitney*.

Para comparação da expressão dos genes CPT, LXR, MTP, PPAR- α , PPAR- γ , SREBP1C e SREBP2, utilizou-se teste t de Student não pareado com a suposição de que as variâncias das expressões gênicas nos grupos-controle e FE não são idênticas (procedimento de Welch).

Em adição ao teste estatístico formal, optamos complementar a comparação da expressão destes genes por meio de estimação das médias de Ct e de respectivos intervalos de confiança. Além de permitir a comparação da expressão gênica entre os grupos, a análise por estimação fornece uma ideia da grandeza do acúmulo do transcrito nos grupos e da diferença desse acúmulo (Altman 1997). A estimação da média (e intervalo de confiança) dos Cts dos genes em cada grupo foi feita pelo método de *bootstrapping*. Ele foi escolhido por sua capacidade de fornecer um resultado mais robusto e por não requerer que sejam feitas suposições quanto à distribuição da população (Calmettes *et al.*, 2012). Esta técnica consiste em retirar, com reposição, subgrupos aleatórios do conjunto original de dados. A cada reamostragem, é calculado o parâmetro de interesse (média dos Cts de cada gene, no caso do presente trabalho). Após o número previsto de reamostragens, os valores das médias obtidas de cada subgrupo de dados é utilizado para computar a média empírica, os parâmetros de dispersão e o intervalo de confiança.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando a linguagem estatística R (versão 2.13.0). Foram utilizados, além da linguagem R, o pacote “boot” para esta mesma linguagem nas estimações por *bootstrapping*. Os valores de Ct para cada gene e grupo foram obtidos após 1.000 reamostragens. Os intervalos de confiança empíricos foram determinados a partir dos valores que correspondem, respectivamente, percentil 2,5 e 97,5 dos valores das medidas das reamostragens (Calmettes *et al.*, 2012).

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Todos os animais do estudo consumiram a mesma quantidade de dieta, a qual foi oferecida *ad libitum*. No entanto, observou-se maior ganho de peso no grupo FE. Apesar disso, não houve diferença entre o peso do fígado e do tecido adiposo epididimal entre os diferentes grupos (Tabela 3).

Tabela 3 – Consumo alimentar, ganho de peso, peso do fígado, tecido adiposo epididimal, dos animais LDLR-KO alimentados com dietas-controle e FE por 16 semanas.

	CONTROLE n=10	FE n=10
Consumo (g/dia)	2,74 ± 0,22	3,13 ± 0,32
Ganho de peso (g)	15,25 ± 2,36	20,98 ± 3,86 ^a
Peso do fígado (g/100 g)	3,91 ± 0,34	3,84 ± 0,42
Tecido adiposo epididimal (g/100 g)	2,84 ± 0,82	3,14 ± 0,89

Resultados expressos em média ± DP.

a: FITO x Controle (p<0,05).

Teste *t* de Student.

A análise do perfil de lipoproteínas do plasma (Figura 7) indicou que a suplementação com FE reduziu a concentração de colesterol nas partículas de VLDL e LDL, porém, não provocou alterações nas concentrações de colesterol e triglicérides nas demais partículas.

Figura 7 – Perfil lipídico das lipoproteínas dos animais LDLr-KO alimentados com dietas-controle e FE por 16 semanas.

A Tabela 4 mostra que a concentração plasmática de colesterol dos animais suplementados com FE foi menor em comparação ao grupo-controle. Já a concentração plasmática de triglicérides não diferiu entre os grupos. As concentrações de colesterol nas frações de VLDL e LDL foram significativamente menores no grupo FE. Não houve diferença entre os grupos nas concentrações de triglicérides nas partículas.

Tabela 4 – Concentrações plasmáticas de lípides (triglicérides e colesterol) e lipoproteínas dos animais LDLR-KO alimentados com dietas-controle e FE por 16 semanas.

mg/dL	CONTROLE n=10	FE n=10
Colesterol	623 ± 187	451 ± 115 ^a
Triglicérides	189 ± 85	184 ± 64
VLDL-colesterol	419,8 ± 22,7	278,4 ± 20,4 ^a
LDL-colesterol	173,5 ± 11,2	82,4 ± 11,5 ^a
HDL-colesterol	42,6 ± 3,4	27,8 ± 5,1
VLDL-TG	111,5 ± 13,5	113,2 ± 25,9
LDL-TG	21,1 ± 3,9	31,5 ± 12,7
HDL-TG	19,3 ± 5,6	27,6 ± 7,7

Resultados expressos em média ± DP.

a: FITO x Controle, $p < 0,05$

Teste *t* de Student

As concentrações plasmáticas de campesterol e β -sitosterol foram, consideravelmente, maiores nos animais suplementados com FE, ao passo que a concentração plasmática de latosterol não diferiu entre os grupos (Tabela 5).

Tabela 5 – Análise de esteróis no plasma

($\mu\text{g/mL}$)	CONTROLE n=10	FE n=10
Campesterol	2,96 ± 1,391	8,13 ± 2,114 ^a
β-sitosterol	0,91 ± 0,369	7,52 ± 2,318 ^a
Latosterol	0,45 ± 0,201	0,47 ± 0,120
Colesterol	623 ± 187	451 ± 115 ^a

Resultados expressos em médias ± DP.

a: FE x Controle, $p < 0,05$.

Teste *t* de Student.

A análise de esteróis na artéria mostra que a concentração de colesterol total foi bem menor no grupo com FE; entretanto, não foram observadas diferenças nas concentrações de colesterol éster e colesterol livre entre os dois grupos. Além disso, a suplementação com FE não induziu acúmulo de β -sitosterol e campesterol nas artérias totais dos animais (Tabela 6).

Tabela 6 – Análise de esteróis na artéria

($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína)	CONTROLE n=10	FE n=10
Colesterol total	18,83 $\pm$ 8,50	10,36 $\pm$ 3,27 ^a
Colesterol éster	14,75 $\pm$ 10,45	9,02 $\pm$ 1,67
Colesterol livre	4,08 $\pm$ 4,74	1,35 $\pm$ 3,06
Campesterol	0,037 $\pm$ 0,054	0,048 $\pm$ 0,013
β-sitosterol	0,124 $\pm$ 0,108	0,136 $\pm$ 0,074

Resultados expressos em média $\pm$ DP.

a: FE x Controle, $p < 0,05$

Teste *t* de Student

Com relação à avaliação de parâmetros relacionados à placa aterosclerótica (Figura 8), verificou-se que os animais FE apresentaram menor conteúdo lipídico e infiltrado de macrófagos, indicando prevenção do desenvolvimento de lesão aterosclerótica.

Figura 8 – Desenvolvimento de aterosclerose. A área de lesão foi determinada na raiz aórtica dos animais LDLr-KO alimentados por 16 semanas com as dietas-controle e FE. Cortes consecutivos foram analisados para (A) infiltrado lipídico, marcados por Oil Red-O; (B) infiltrado de macrófagos (anti-CD68). Os seguintes parâmetros foram quantificados: (C) área de lesão aterosclerótica (n=10); (D) área de macrófagos (n=9).

Resultados expressos em média $\pm$ DP.

a: FE x Controle, $p < 0,05$; Teste *t* de Student.

O efeito dos FE no balanço de colesterol de macrófagos foi avaliado por sua ação sobre genes envolvidos tanto na sua captação como no efluxo de colesterol (Tabela 7). Observou-se apenas redução da expressão do mRNA do ABCG1 no grupo FE, não havendo diferença na expressão dos mRNA de ABCA1, LOX-1 e CD-36.

Tabela 7 – Expressão de RNA mensageiro dos genes envolvidos no efluxo/influxo de colesterol em macrófagos

	CONTROLE n=10	FE n=10
ABCA 1	1,04 ± 0,74	2,50 ± 3,58
*ABCG 1	1,12 ± 0,51	0,51 ± 0,33 ^a
LOX 1	2,31 ± 2,16	1,02 ± 0,52
CD 36	1,27 ± 0,98	1,02 ± 0,43

Resultados expressos em média ± DP.

a: FE x Controle, $p < 0,05$

*O teste de Wilcoxon para dois grupos (também conhecido como teste de Mann-Whitney) foi utilizado para avaliar a expressão de ABCG1, já que os DDCT desse gene não seguem distribuição normal, mesmo após transformação logarítmica. Já para os demais genes, foi utilizado teste *t* de Student.

Não foi encontrada correlação entre depósito de FE na artéria e lesão aterosclerótica, conforme apresentado nos gráficos abaixo.

Figura 9 - Correlação entre concentração de campesterol e β-sitosterol na artéria e lesão aterosclerótica. Correlação de Spearman.

Foram encontradas correlações negativas entre concentração plasmática de β -sitosterol, e área de lesão e área de macrófagos.

Figura 10 - Correlações entre concentração de plasmática β -sitosterol e área de macrófago (A) e área de lesão (B). Correlação de Spearman.

Os animais que receberam dieta suplementada com FE apresentaram maior concentração de triglicérides no fígado; entretanto, não houve diferença em relação à concentração hepática de colesterol (**Tabela 8**).

Tabela 8 – Concentração de triglicérides e colesterol no fígado

$\mu\text{g}/100\text{mg}$ fígado	CONTROLE n=10	FE n=10
Colesterol	252,5 $\pm$ 44,7	219,7 $\pm$ 68,6
Triglicérides	745 $\pm$ 135,5	1013 $\pm$ 295,3 ^a

Resultados expressos em média $\pm$ DP.

a: FITO x Controle, $p < 0,05$

Teste *t* de Student.

Uma vez que a dieta suplementada com FE induziu aumento de triglicérides no fígado, analisou-se a expressão de genes lipogênicos (SREBP1c, PPAR gama, LXR) e lipolíticos (MTP, CPT, PPAR alfa). Foi analisada, também, a expressão de SREBP2, gene envolvido na síntese de colesterol.

Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa na expressão dos RNA mensageiros entre os grupos (Tabela 9).

Tabela 9 – Expressão de RNA mensageiro dos genes no fígado

	CONTROLE n=7	FE n=8	p
SREBP1c	-1,20 [-1,71;-0,81]	-0,72 [-0,99;-0,41]	0,12
SREBP2	0,85 [0,23;1,40]	0,51 [0,27;0,77]	0,36
MTP	0,43 [0,00;0,80]	0,14 [-0,25;0,56]	0,34
CPT	-1,34 [-1,68;-1,01]	-1,21 [-1,85;-0,47]	0,78
LXR	-0,08 [-1,09;0,86]	-1,53 [-2,91;-0,22]	0,14
PPARα	-0,30 [-1,31;0,77]	-0,89 [-2,54;0,58]	0,54
PPAR gamma	0,92 [0,28;1,47]	0,83 [0,52;1,22]	0,81

Resultados expressos em média e intervalo de confiança calculados pelo método de *Bootstrap*.

Os animais do grupo FE apresentaram maiores concentrações de β -sitosterol e latosterol no fígado em relação ao grupo-controle, conforme demonstrado na Tabela 10.

Tabela 10 – Concentrações de esteróis no fígado ($\mu\text{g}/100\text{ mg}$ fígado) de camundongos LDLr-KO alimentados com dietas-controle e FE por 16 semanas.

($\mu\text{g}/100\text{mg}$ fígado)	CONTROLE n=10	FE n=10
Desmosterol	0,57 $\pm$ 0,01	0,76 $\pm$ 0,04
Latosterol	0,17 $\pm$ 0,05	0,49 $\pm$ 0,00 ^a
Campesterol	1,35 $\pm$ 0,27	1,35 $\pm$ 0,16
β-sitosterol	0,23 $\pm$ 0,05	0,97 $\pm$ 0,11 ^a

Resultados expressos em média $\pm$ DP.

a: FE x Controle, $p < 0,05$

Teste *t* de Student.

A análise de FE no baço e intestino demonstrou que os animais que receberam a dieta FE apresentaram maiores concentrações de campesterol e β -sitosterol em ambos os órgãos, não diferindo, entretanto, as concentrações de latosterol e desmosterol (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11 – Concentrações de esteróis no baço ($\mu\text{g/g}$ baço) de camundongos LDLr-KO alimentados com dietas-controle e FE por 16 semanas.

$\mu\text{g/g}$ de baço	CONTROLE n=9	FE n=7
Desmosterol	21,33 $\pm$ 4,64	22,67 $\pm$ 5,82
Latosterol	0,91 $\pm$ 0,27	0,90 $\pm$ 0,24
Campesterol	25,67 $\pm$ 4,95	50,33 $\pm$ 15,00 ^a
β-sitosterol	15,44 $\pm$ 7,04	58,83 $\pm$ 18,30 ^a

Resultados expressos em média $\pm$ DP.

a: FE x Controle, $p < 0,05$

Teste *t* de Student.

Tabela 12 – Análise de esteróis no intestino ($\mu\text{g/g}$ intestino) de camundongos LDLr-KO alimentados com dietas-controle e FE por 16 semanas.

$\mu\text{g/g}$ de intestino	CONTROLE n=9	FE n=7
Desmosterol	5,56 $\pm$ 6,85	8,71 $\pm$ 2,36
Latosterol	0,61 $\pm$ 0,69	1,14 $\pm$ 1,34
Campesterol	3,3 $\pm$ 11,55	28,86 $\pm$ 7,45 ^a
β-sitosterol	11,5 $\pm$ 9,51	63,71 $\pm$ 37,43 ^a

Resultados expressos em média $\pm$ DP.

a: FE x Controle, $p < 0,05$

Teste *t* de Student.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O resultado mais relevante deste trabalho foi a demonstração de que, apesar de a suplementação com FE ter induzido o seu aumento no plasma, não provocou o seu acúmulo na parede da artéria e, além disso, preveniu o desenvolvimento de lesão aterosclerótica em camundongos LDLr-KO, certamente em razão da efetiva redução da colesterolemia.

O modelo experimental deste estudo, conduzido em camundongos LDLr-KO, foi escolhido em virtude de esses animais desenvolverem hipercolesterolemia moderada, espelhando a hipercolesterolemia heterozigota em humanos, e, quando alimentados com dieta rica em gordura (Hartvigsen *et al.*, 2007), acelerarem o desenvolvimento da aterosclerose. Além disso, são um excelente modelo para estudar esteatose hepática, por terem como *background* os camundongos da linhagem C57BL/6J (Jackson Laboratory, Bar Harbor, EUA), os quais desenvolvem síndrome metabólica quando submetidos a uma dieta hiperlipídica (Bieggs *et al.*, 2012).

Os animais que receberam a suplementação com FE ganharam significativamente mais peso em relação ao grupo-controle, apesar de o consumo não ter sido diferente entre os grupos. Moghadasian (1997) também reportou aumento do peso de camundongos ApoE-KO suplementados com FE. Já em outra investigação, a dieta enriquecida com FE não alterou o peso dos animais, embora tenha induzido maior consumo (Brufau *et al.*, 2011). Embora inesperado, testes estatísticos demonstraram que o aumento de peso não influenciou nos resultados (dados não demonstrados).

O aumento de peso observado nos animais suplementados não deve ser explicado pelo tecido adiposo em geral se admitirmos que este seja representado pelo adiposo epididimal, o qual foi similar ao grupo-controle. Não temos qualquer explicação fisiológica para este achado pelo fato da massa muscular, a de água ou funções hormonais dos animais não terem sido avaliadas.

A dieta enriquecida com FE induziu maior concentração plasmática de β -sitosterol e campesterol, mas não de latosterol, o qual é precursor da síntese de colesterol. No entanto, o aumento do latosterol ocorreu no fígado, o que era esperado pelo fato de os FE bloquearem a absorção intestinal de colesterol e, com isso, induzirem redução da colesterolemia e aumento da síntese corpórea de colesterol, como demonstrado em seres humanos (Grundy *et al.*, 1969). Consequentemente, a concentração deste precursor no plasma pode não retratar a grande variação da síntese detectada no fígado.

Corroborando a literatura (Moghadasian *et al.*, 1997; Moghadasian *et al.*, 1999), a suplementação com FE reduziu a concentração plasmática de colesterol e de LDL-colesterol. Com relação à composição das lipoproteínas analisadas por FPLC, os animais que receberam a suplementação apresentaram menor concentração plasmática de colesterol nas frações de VLDL e LDL, que traduzem maior captação dessas lipoproteínas devido ao maior número de receptores hepáticos.

Em razão da redução da colesterolemia, esperava-se realmente menor desenvolvimento da placa aterosclerótica, conforme observado nos animais submetidos a uma dieta enriquecida com FE. No entanto, foi muito interessante o fato de os animais terem desenvolvido menor lesão aterosclerótica, mesmo tendo sido submetidos a uma dieta rica em ácido palmítico, reconhecido como um dos ácidos graxos com grande impacto sobre o desenvolvimento tanto da aterosclerose humana (Sanadgol *et al.*, 2012) como em animais LDLr-KO (Machado *et al.*, 2010; Rudel *et al.*, 1998). Apesar de ambos os grupos experimentais terem recebido dieta rica em gordura (40% do valor calórico total), suplementados com FE desenvolveram lesão aterosclerótica significativamente menor que os controles, como demonstrado pelo menor teor lipídico e infiltrado de macrófagos na parede da artéria.

Embora a suplementação com FE tenha reduzido a concentração plasmática de colesterol (28%), o colesterol plasmático dos animais permaneceu elevado (451 mg/dL). Sabe-se que esse grau de

hipercolesterolemia se relaciona com aterosclerose prematura (Getz, Reardon, 2006; Machado *et al.*, 2012), conforme demonstrado em estudos conduzidos com o mesmo modelo animal.

Dessa forma, esperava-se que as duas situações desta investigação, a saber, dieta rica em gordura saturada associada a elevada concentração plasmática de colesterol, ambas envolvidas no desenvolvimento de aterosclerose, induzisse maior desenvolvimento de lesão aterosclerótica no grupo FE. No entanto, apesar destas situações sabidamente aterogênicas, encontrou-se menor área de lesão.

Embora tenha havido aumento da concentração plasmática de β -sitosterol, esse incremento não se correlacionou com o desenvolvimento de aterosclerose. Na verdade, ao contrário, foi encontrada correlação negativa entre a concentração plasmática de β -sitosterol e a área de lesão ($r=-0,76$, $p<0,05$), e infiltrado de macrófagos ($r=-0,76$, $p<0,05$). Em concordância com os resultados obtidos no presente estudo, Wilund *et al.* (2004) mostraram que o aumento da concentração plasmática de FE não induziu aterosclerose em animais com ablação gênica para os transportadores ABCG5/G8 (envolvidos na saída de colesterol e de FE das células) alimentados com dieta *chow* ou ocidental sem suplementação com FE. Os autores também demonstraram que, nos animais ABCG5/G8-KO e LDLr-KO, o aumento da concentração plasmática de FE não se associou com maior lesão aórtica quando comparado aos animais LDLr-KO. Em outra investigação realizada com animais ApoE-KO (Weingärtner *et al.*, 2008), modelo experimental que desenvolve intensa hipercolesterolemia quando submetido a uma dieta rica em gordura, a suplementação com FE induziu seu aumento no plasma e a redução na concentração plasmática de colesterol também foi associada à redução de área de lesão.

Assim, nesta investigação, demonstrou-se, pela primeira vez, que a suplementação de FE na dieta promove, simultaneamente, menor concentração de colesterol total no plasma e nas artérias dos animais. Entretanto, não se encontrou diferença significativa entre os grupos nas concentrações das frações colesterol éster e colesterol livre na artéria.

Para melhor compreender o efeito da suplementação com FE no desenvolvimento da área de lesão aterosclerótica, foram investigados alguns genes envolvidos na homeostase de colesterol nos macrófagos do peritônio dos animais estudados. Esse modelo está validado na literatura, uma vez que essas células espelham o comportamento de macrófagos da parede da artéria (Castilho *et al.*, 2012).

A suplementação com FE não alterou a expressão de LOX-1 e CD36, ambos envolvidos na captação de colesterol.

Para se tentar entender o efeito dos FE na expressão dos transportadores ABC, Sabeva *et al.* (2011) demonstraram que macrófagos enriquecidos com colesterol *in vitro*, na presença de estigmasterol, aumentaram a expressão de ABCA1 e ABCG1, da mesma forma que elevaram o efluxo de colesterol para HDL e apoA1, apresentando efeitos benéficos (Sabeva *et al.*, 2011). Em relação aos genes envolvidos no efluxo de colesterol, o presente trabalho mostrou resultados opostos, uma vez que FE não alteraram a expressão de ABCA1 e, ainda, diminuíram a expressão de ABCG1. A princípio, o aumento desse transportador poderia sugerir a presença de maior área de lesão nesses animais, uma vez que o ABCG1 é um facilitador da saída de colesterol do macrófago. Embora este resultado pareça contraditório, evidências demonstram que o ABCG1 pode também desempenhar papel deletério no desenvolvimento da aterosclerose. Recentemente, demonstrou-se que o ABCG1 ativa a lipoproteína lipase e promove acúmulo de lípidos em macrófagos humanos, contribuindo para a formação de *foam cells* (Olivier *et al.*, 2012).

Xu *et al.* reportaram que indivíduos portadores de um defeito genético que ocasiona menor expressão de ABCG1 no macrófago apresentam menor risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular (Xu *et al.*, 2011). Embora esse resultado pareça intrigante a princípio, esse estudo ressalta que o papel biológico do ABCG1 no progresso da aterosclerose é muito complexo (Le Goff; Dallinga, 2011). Dados recentes mostraram, ainda, que o ABCG1 também se relaciona com a proliferação de linfócitos na parede da artéria (Cheng *et al.*, 2014).

Esses achados oferecem uma explicação adicional para o efeito antiaterogênico promovido pela suplementação com FE via ABCG1.

Além da suposição de que os FE poderiam induzir aterosclerose (Lottenberg *et al.*, 2012), outra importante preocupação recorrente na literatura refere-se ao fato de que os FE poderiam se acumular na parede da artéria e contribuir com o desenvolvimento da lesão aterosclerótica. Alguns estudos conduzidos em humanos correlacionaram o aumento da concentração plasmática de FE com a maior concentração de FE em valvas cardíacas (Weingärtner *et al.*, 2008). Os participantes desse estudo reportaram o consumo de margarina suplementada com FE por dois anos; concluiu-se que o aumento da concentração de FE nas valvas dos pacientes se correlacionou positivamente com risco de desenvolvimento de doença cardiovascular. Entretanto, os próprios autores indicaram que uma das limitações do estudo foi a falta de controle sobre o hábito alimentar dos indivíduos.

Outra investigação também demonstrou que, em pacientes submetidos à cirurgia de endarterectomia de carótida, a concentração plasmática de FE foi positivamente correlacionada com a concentração de FE no tecido arterial (Miettinen *et al.*, 2005). Entretanto, esses pacientes não receberam suplementação com FE (Miettinen *et al.*, 2005). Pode-se inferir, dessa forma, que o conteúdo plasmático de FE tenha sido apenas marcador de maior absorção de colesterol. A presença de FE em artérias humanas normais e também em tecidos ateromatosos se dá por meio de seu transporte pelas partículas de LDL, que carregam também a maioria do colesterol plasmático (Miettinen; Gylling, 2005).

Nosso trabalho experimental também contrasta com o estudo populacional prospectivo PROCAM, desenvolvido na Alemanha (Assmann *et al.*, 2006), o qual deduziu que o aumento da concentração plasmática de sitosterol se relacionava com risco de desenvolvimento de doença coronariana. No entanto, é importante ressaltar que a elevação da sitolterolemia coincidiu com a da colesterolemia e com a do LDL-colesterol. Estes resultados podem simplesmente indicar risco cardiovascular ligado a

aumento na absorção intestinal de colesterol, sendo também os FE neste caso, considerados marcadores de maior absorção de colesterol. Em contraposição, na Finlândia, outro estudo prospectivo concluiu que a elevação dos FE no plasma (Gylling *et al.*, 2010) se relaciona com diminuição da síntese de colesterol e menor risco de mortalidade.

Apesar da conclusão dos autores, é importante ressaltar que o efeito dos FE sobre a mortalidade cardiovascular nunca foi testada em estudos epidemiológicos (Ortega *et al.*, 2013).

Os resultados do nosso trabalho demonstraram, pela primeira vez, que, apesar do aumento da concentração plasmática de FE, a sua suplementação não induziu o seu acúmulo na parede da artéria e, além disso, preveniu o desenvolvimento de lesão aterosclerótica em camundongos LDLr-KO.

Neste estudo, os FE se depositaram igualmente nas artérias de ambos os grupos. Dessa forma, a principal constatação deste estudo foi a de que a suplementação com FE não está associada ao acúmulo de FE na parede da artéria e não induz desenvolvimento de lesão aterosclerótica. É importante ressaltar que foi utilizada a artéria total para a medida de FE, assumindo que estes não se acumulam em qualquer compartimento específico da artéria.

Não foi encontrada correlação entre depósito de FE na artéria e lesão aterosclerótica.

Neste estudo, observou-se que a suplementação com FE induziu aumento na concentração hepática de β -sitosterol, corroborando dados de estudo anterior (Rideout, 2010), mostrando o seu aumento no fígado e também em demais tecidos (Plat *et al.*, 2008). Apesar de ter induzido o aumento de β -sitosterol, não foi encontrada alteração do conteúdo hepático de colesterol no presente estudo.

Rideout, 2010, também não encontrou aumento de colesterol livre no fígado com os FE. No entanto, observou-se aumento do SREBP2 na forma citosólica (não processada) e diminuição do SREBP na forma nuclear (ativa). Os autores justificaram que, em razão de os FE apresentarem similaridade com o colesterol, se ligariam ao domínio SCAP, resultando em

um complexo SCAP-SREBP estável, o qual não migraria para o núcleo da célula, ou seja, não se transformaria na sua forma ativa, diminuindo, assim, a síntese de colesterol. Os autores mostram, ainda, aumento do ABCG5, fato que aumentaria a excreção de colesterol na bile.

Portanto, baseando-se neste último, pode-se inferir que o aumento de FE no fígado, obtido em nosso trabalho, possa também justificar parcialmente a redução da colesterolemia, uma vez que este acúmulo induz maior excreção hepática de colesterol. No presente estudo, não foi observada alteração no SREBP2, no entanto, não foram avaliadas as formas citosólicas e ativas.

Outro achado inusitado, nesta investigação, foi o aumento de triglicérides no fígado dos animais FE. A literatura mostra resultados conflitantes quanto ao efeito dos FE sobre o conteúdo hepático de triglicérides. Estudo recente em ratos demonstrou que o consumo de óleo de canola fortificado com polifenóis, tocoferóis e FE contribuiu para a prevenção de NASH (esteato-hepatite não alcoólica), diminuindo o acúmulo hepático de lípidos e o estresse oxidativo (Xu *et al.*, 2013). Alguns estudos demonstraram também que, além do efeito redutor da colesterolemia, os FE podem reduzir as concentrações plasmáticas e hepáticas de triglicérides em camundongos C57BL/6J (Rideout *et al.*, 2010) e proteger contra a hipertrigliceridemia induzida pela dieta (Rideout *et al.*, 2014). Entretanto, tal redução não é acompanhada por mudança da expressão de genes lipogênicos e lipogênese *de novo* (Rideout *et al.*, 2010).

Com a finalidade de tentar elucidar o efeito dos FE sobre o aumento de triglicérides encontrado neste estudo no fígado, avaliou-se a expressão dos RNA-mensageiros dos genes lipolíticos (CPT, e PPAR alfa), e lipogênicos (SREBP1c, MTP, LXR, e PPAR gama), porém não foram observadas diferenças significativas entre as expressões gênicas nos dois grupos. Desta forma, não se conseguiu explicar a razão deste aumento da concentração hepática de triglicérides por estas vias. Não obstante, podemos conjecturar que a entrada elevada de FE no hepatócito possa ter promovido acúmulo no citosol de lipoproteínas enriquecidas com triglicérides

que atuam como “solubilizadores” de excesso de FE; caso estes se acumulassem de forma isolada, promoveriam lesão nas membranas celulares. A origem desses triglicérides pode não ter sido a síntese hepática – que não se mostrou alterada –, mas ter decorrido de captação de lipoproteínas ricas em triglicérides do plasma. Esta possibilidade pode ser analisada em estudo de cinética de quilomícrons e de VLDL em animais tratados com FE.

A concentração de FE no intestino dos animais que receberam a suplementação foi maior que a do grupo-controle. Esse achado está em concordância com resultado recente da literatura que indicou um aumento da concentração de FE da mucosa intestinal de camundongos alimentados com FE (Martinen *et al.*, 2014). Este aumento intestinal de FE também poderia ter promovido maior exportação de triglicérides via quilomícrons que seriam, então, captados aceleradamente pelo fígado de forma a impedir o aumento da concentração de triglicérides no plasma. Esta possibilidade pode ser explorada pela medida de enzimas intestinais reguladoras da produção de lípidos, tal como realizamos no fígado.

Foi realizado na cidade de Maastrich, Holanda, um importante encontro de acadêmicos e pesquisadores da indústria com a finalidade de discutir assuntos relacionados aos efeitos dos FE e fitoestanois, incluindo eficiência, heterogeneidade na resposta e outros possíveis efeitos, além da redução do LDL-colesterol (Plat *et al.*, 2012). Além disso, foram discutidos aspectos relacionados ao potencial papel aterogênico atribuído ao aumento da concentração plasmática de FE. Concluiu-se que, com base nas evidências científicas, os FE podem ser recomendados como alternativa dietética na redução do colesterol plasmático (Plat *et al.*, 2012).

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Os achados deste estudo demonstram que a suplementação com FE causou elevação de sua concentração no plasma, não induziu o seu acúmulo na parede da artéria e preveniu o desenvolvimento da aterosclerose.

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

Adorni MP, Zimetti F, Billheimer JT, Wang N, Rader DJ, Phillips MC, Rothblat GH. The roles of different pathways in the release of cholesterol from macrophages. *J Lipid Res.* 2007;48(11):2453-62.

Ahmida HS, Bertucci P, Franzò L, Massoud R, Cortese C, Lala A, Federici G. Simultaneous determination of plasmatic phytosterols and cholesterol precursors using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) with selective ion monitoring (SIM). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2006;842(1):43-7.

Aiello RJ, Brees D, Bourassa PA, Royer L, Lindsey S, Coskran T, Haghpassand M, Francone OL. Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(4):630-7.

Altman DG. Principles of statistical analysis. In: Altman DG. *Practical statistics for medical research*. 1st Edition. Chapman & Hall/CRC. 1997; 152-77.

Altman SW, Davis HR Jr, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano MP. Niemann-pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science.* 2004;20;303(5661):1201-4.

Arazi SS, Genvigir FD, Willrich MA, Hirata MH, Dorea EL, Bernik M, Hirata RD. Atorvastatin effects on SREBF1a and SCAP gene expression in mononuclear cells and its relation with lowering-lipids response. *Clin Chim Acta.* 2008;393(2):119-24.

Assmann G, Cullen P, Erbey J, Ramey DR, Kannenberg F, Schulte H. Plasma sitosterol elevations are associated with an increased incidence of coronary events in men: results of a nested case-control analysis of the Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2006;16(1):13-21.

Atif BA, Heinric W, Carol SF. Phytosterols reduce in vitro metastatic ability of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Nutr Cancer*. 2001;40(2):157-64.

Bang CN, Greve AM, Boman K, Egstrup K, Gohlke-baerwolf C, Köber L, Nienaber CA, Ray S, Rossebö AB, Wachtell K. Effect of lipid lowering on new-onset atrial fibrillation in patients with asymptomatic aortic stenosis: the Simvastatin and Ezetimibe in Aortic Stenosis (SEAS) study. *Am Heart J*. 2012;163(4):690-6

Basso F, Amar MJ, Wagner EM, Vaisman B, Paigen B, Santamarina-fojo S, Remaley AT. Enhanced ABCG1 expression increases atherosclerosis in LDLr-KO mice on a western diet. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;351(2):398-404.

Bays HE, Neff D, Tomassini JE, Tershakovec AM. Ezetimibe: cholesterol lowering and beyond. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2008;6(4):447-70.

Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich PS, Barnes R, Hobbs HH. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science*. 2000;290(5497):1771-5.

Berge KE, Von Bergmann K, Lutjohann D, Guerra R, Grundy SM, Hobbs HH, Cohen JC. Heritability of plasma noncholesterol sterols and relationship to DNA sequence polymorphism in ABCG5 and ABCG8. *J Lipid Res*. 2002;43(3):486-94.

Bieghs V, Van Gorp PJ, Wouters K, Hendrikx T, Gijbels MJ, Van Bilsen M, Bakker J, Binder CJ, Lütjohann D, Staels B, Hofker MH, Shiri-sverdlov R. 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.

Billett MA, Bruce JS, White DA, Bennett AJ, Salter AM. Interactive effects of dietary cholesterol and different saturated fatty acids on lipoprotein metabolism in the hamster. *Br J Nutr*. 2000;84(4):439-47.

Brown L, Rosner B, Willett WW, Sacks FM. Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr*. 1999;69(1):30-42.

Brufau G, Kuipers F, Lin Y, Trautwein EA, Groen AK. A reappraisal of the mechanism by which plant sterols promote neutral sterol loss in mice. *PLoS One*. 2011;6(6):e21576.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611-22.

Calmettes G, Drummond GB, Vowler SL. Making do with what we have: use your bootstraps. *Adv Physiol Educ*. 2012;36:177-80.

Calpe-berdiel L, Eescolà-gil JC, Blanco-vaca F. New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism. *Atherosclerosis*. 2009;203(1):18-31.

Castilho G, Okuda LS, Pinto RS, Iborra RT, Nakandakare ER, Santos CX, Laurindo FR, Passarelli M. ER stress is associated with reduced ABCA-1 protein levels in macrophages treated with advanced glycated albumin - reversal by a chemical chaperone. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(7):1078-86.

Chen Q, Gruber H, Swist E, Pakenham C, Ratnayake WM, Scoggan KA. Influence of dietary phytosterols and phytostanols on diastolic blood pressure and the expression of blood pressure regulatory genes in SHRSP and WKY inbred rats. *Br J Nutr*. 2009;102(1):93-101.

Cheng HY, Wu R, Nowyhed H, Hedrick CC, La Jolla Inst for Allergy and Immunology, La Jolla, Ca. *T cell-specific deficiency of ABCG1 protects against atherosclerosis*. In: Abstracts of the ATVB 2014 – Artherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, Toronto – Ontario, 2014.

Compassi S, Werder M, Boffelli D, Weber FE, Hauser H, Schulthess G. Cholesteryl ester absorption by small intestinal brush border membrane is protein-mediated. *Biochemistry*. 1995;19;34(50):16473-82.

Cui R, Iso H, Toyoshima H, Date C, Yamamoto A, Kikuchi S, Kondo T, Watanabe Y, Koizumi A, Inaba Y, Tamakoshi A. Serum cholesterol levels and risk of mortality from stroke and coronary heart disease in Japanese: The JACC study. *Atherosclerosis*. 2007;194:415-20.

De Jong A, Plat J, Mensink RP. Metabolic effects of plant sterols and stanols (Review). *J Nutr Biochem*. 2003;14:362-9.

Driscoll KE, Carter JM, Howard BW, Hassenbein DG, Pepelko W, Baggs RB, Oberdorster G. Pulmonary inflammatory, chemokine, and mutagenic responses in rats after subchronic inhalation of carbon black. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1996;136:372-80.

Escurriol V, Cofán M, Moreno-iribas C, Larrañaga N, Martínez C, Navarro C, Rodríguez L, González CA, Corella D, Ros E. Phytosterol plasma concentrations and coronary heart disease in the prospective Spanish EPIC cohort. *J Lipid Res*. 2010;51(3):618-24.

Fassbender K, Lütjohann D, Dik MG, Bremmer M, König J, Walter S, Liu Y, Letièmbre M, Von Bergmann K, Jonker C. Moderately elevated plant sterol levels are associated with reduced cardiovascular risk – the LASA study. *Atherosclerosis*. 2008;196(1):283-8.

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.

Gagliardi AC, Maranhão RC, de Sousa HP, Schaefer EJ, Santos RD. Effects of margarines and butter consumption on lipid profiles, inflammation markers and lipid transfer to HDL particles in free-living subjects with the metabolic syndrome. *Eur J Clin Nutr*. 2010 Oct;64(10):1141-9.

Garcia-calvo M, Lisnock J, Bull HG, Hawes BE, Burnett DA, Braun MP, Crona JH, Davis HR Jr, Dean DC, Detmers PA, Graziano MP, Hughes M, Macintyre DE, Ogawa A, O'Neill KA, Iyer SP, Shevell DE, Smith MM, Tang YS, Makarewicz AM, Ujjainwalla F, Altmann SW, Chapman KT, Thornberry NA. The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(23):8132-7.

Ge L, Wang J, Qi W, Miao HH, Cao J, Qu YX, Li BL, Song BL. The cholesterol absorption inhibitor ezetimibe acts by blocking the sterol-induced internalization of NPC1L1. *Cell Metab*. 2008;7(6):508-19.

Getz GS, Reardon CA. Diet and murine atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(2):242-24928.

Glueck CJ, Speirs J, Tracy T, Streicher P, Illig E, Vandegrift J. Relationships of serum plant sterols (phytosterols) and cholesterol in 595 hypercholesterolemic subjects, and familial aggregation of phytosterols, cholesterol, and premature coronary heart disease in hyperphytosterolemic probands and their first-degree relatives. *Metabolism*. 1991;40(8):842-8.

Grundy SM, Ahrens EH Jr, Davignon J. The interaction of cholesterol absorption and cholesterol synthesis in man. *J Lipid Res*. 1969;10(3):304-15.

Guilbert JJ. The search for HR continues: WHO's General Programme of Work 2002-2005 and the World Health Report 2001 on mental health. *Educ Health* (Abingdon). 2001;14(3):452-3.

Gylling H, Miettinen TA. Effects of inhibiting cholesterol absorption and synthesis on cholesterol and lipoprotein metabolism in hypercholesterolemic non-insulin-dependent diabetic men. *J Lipid Res*. 1996;37(8):1776-85,

Gylling H, Tilvis RS, Miettinen TA. Serum plant and other noncholesterol sterols, cholesterol metabolism and 22-year mortality among middle-aged men. *Atherosclerosis*. 2010;210(1):282-7.

Gylling H, Tuominen JA, Koivisto VA, Miettinen TA. Cholesterol metabolism in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2004;53(9):2217-22.

Hallikainen M, Lyyra-laitinen T, Laitinen T, Agren JJ, Pihlajamäki J, Rauramaa R, Miettinen TA, Gylling H. Endothelial function in hypercholesterolemic subjects: Effects of plant stanol and sterol esters. *Atherosclerosis*. 2006;188(2):425-32.

Hallikainen M, Lyyra-laitinen T, Laitinen T, Moilanen L, Miettinen TA, Gylling H. Effects of plant stanol esters on serum cholesterol concentrations, relative markers of cholesterol metabolism and endothelial function in type 1 diabetes. *Atherosclerosis*. 2008;199(2):432-9.

Harland JI. Food combinations for cholesterol lowering. *Nutr Res Rev*. 2012;25(2):249-66.

Hartvigsen K, Binder CJ, Hansen LF, Rafia A, Juliano J, Hörkkö S, Steinberg D, Palinski W, Witztum JL, Li AC. A diet-induced hypercholesterolemic murine model to study atherogenesis without obesity and metabolic syndrome. *ArteriosclerThromb Vasc Biol*. 2007;27(4):878-85,

Helske S, Miettinen T, Gylling H, Mäyränpää M, Lommi J, Turto H, Werkkala K, Kupari M, Kovanen PT. Accumulation of cholesterol precursors and plant sterols in human stenotic aortic valves. *J Lipid Res.* 2008;49(7):1511-8.

Ikeda I, Tanaka K, Sugano M, Vahouny GV, Gallo LL. Inhibition of cholesterol absorption in rats by plant sterols. *J Lipid Res.* 1988;29(12):1573-82.

Iqbal R, Anand S, Ounpuu S, Shofiquil I, Zhang X, Rangarajan S, Chifamba J, Al-hinai A, Keltai M, Yusuf S. Dietary Patterns and the Risk of Acute Myocardial infarction in 52 countries results of the INTERHEART Study; on behalf of the INTERHEART Study Investigators. *Circulation.* 2008;118:1929-37.

Jacobson TA. The safety of aggressive statin therapy: how much can low-density lipoprotein cholesterol be lowered? *Mayo Clin Proc.* 2006;81(9):1225-31.

Ju YH, Clausen LM, Allred KF, Almada AL, Helferich WG. β -Sitosterol, β -sitosterol glucoside, and a mixture of β -sitosterol and β -sitosterol glucoside modulate the growth of estrogen-responsive breast cancer cells in vitro and in ovariectomized athymic mice. *J Nutr.* 2004;134:1145-51

Kassis AN, Vanstone CA, Abumweis SS, Jones PJ. Efficacy of plant sterols is not influenced by dietary cholesterol intake in hypercholesterolemic individuals. *Metabolism.* 2008;57(3):339-46.

Katan MB, Grundy SM, Jones P, Law M, Miettinen T, Paoletti R. Efficacy and safety of plant stanols and sterol in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clin Proc.* 2003;78(8):965-78.

Kawashiri MA, Nohara A, Noguchi T, Tada H, Nakanishi C, Mori M, Konno T, Hayashi K, Fujino N, Inazu A, Kobayashi J, Mabuchi H, Yamagishi M. Efficacy and safety of coadministration of rosuvastatin, ezetimibe, and colestimide in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol.* 2012;109(3):364-9.

Kuller LH. Hyperlipidaemia and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol.* 2000;11:661-5.

Law M. Plant sterol and stanol margarines and health. *BMJ.* 2000;320(7238):861-4.

Le Goff W, Dallongue GM. ABCG1: not as good as expected? *Atherosclerosis*. 2011;219(2):393-4.

Le May C, Berger JM, Lespine A, Pillot B, Prieur X, Letessier E, Hussain MM, Collet X, Cariou B, Costet P. Transintestinal cholesterol excretion is an active metabolic process modulated by PCSK9 and statin involving ABCB1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(7):1484-93.

Lee YM, Haastert B, Scherbaum W, Hauner H. A phytosterol-enriched spread improves the lipid profile of subjects with type 2 diabetes mellitus - a randomized controlled trial under free-living conditions. *Eur J Nutr*. 2003;42(2):111-7.

Li G, Gu HM, Zhang DW. ATP-binding cassette transporters and cholesterol translocation. *IUBMB Life*. 2013 Apr 27. doi: 10.1002/iub.01165.

Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420(6917):868-74

Lin DS, Steiner RD, Merkens LS, Pappu AS, Connor WE. The effects of sterol structure upon sterol esterification. *Atherosclerosis*. 2010;208(1):155-60.

Livak KJ, Schmitgen 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.

Loizou S, Lekakis I, Chrousos GP, Moutsatsou P. Beta-sitosterol exhibits anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. *Mol Nutr Food Res*. 2010;54(4):551-8.

Lossos IS, Czerwinski DK, Wechsler MA, Levy R. Optimization of quantitative realtime RT-PCR parameters for the study of lymphoid malignancies. *Leukemia*. 2003;17:789-95.

Lottenberg AM, Nunes VS, Nakandakare ER, Neves M, Bernik M, Lagrost L, Dos Santos JE, Quintão E. The human cholesteryl ester transfer protein I405V polymorphism is associated with plasma cholesterol concentration and its reduction by dietary phytosterol esters. *J Nutr*. 2003;133(6):1800-5.

Lottenberg AM, Bombo RP, Ilha A, Nunes VS, Nakandakare ER, Quintão EC. Do clinical and experimental investigations support an antiatherogenic role for dietary phytosterols/stanols? *IUBMB Life*. 2012;64(4):296-306.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-75.

Lutsey PL, Steffen LM, Stevens J. Dietary intake and the development of the metabolic syndrome: the atherosclerosis risk in communities study. *Circulation*. 2008;117(6):754-61.

Machado RM, Nakandakare ER, Quintao EC, Cazita PM, Koike MK, Nunes VS, Ferreira FD, Afonso MS, Bombo RP, Machado-lima A, Soriano FG, Catanozi S, Lottenberg AM. Omega-6 polyunsaturated fatty acids prevent atherosclerosis development in LDLr-KO mice, in spite of displaying a pro-inflammatory profile similar to trans fatty acids. *Atherosclerosis*. 2012;224(1):66-74.

Mannarino E, Pirro M, Cortese C, Lupattelli G, Siepi D, Mezzetti A, Bertolini S, Parillo M, Fellin R, Pujia A, Averna M, Nicolle C, Notarbartolo A. Effects of a phytosterol-enriched dairy product on lipids, sterols and 8-isoprostane in hypercholesterolemic patients: A multicenter Italian study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2009;19(2):84-90.

Marttinen M, Pajari AM, Päivärinta E, Storvik M, Marttinen P, Nurmi T, Niku M, Piironen V, Mutanen M. Plant sterol feeding induces tumor formation and alters sterol metabolism in the intestine of apc (min)mice. *Nutr Cancer*. 2014;66(2):259-69.

Matthan NR, Pencina M, Larocque JM, Jacques PF, D'Agostino RB, Schaefer EJ, Lichtenstein AH. Alterations in cholesterol absorption/synthesis markers characterize Framingham offspring study participants with CHD. *J Lipid Res*. 2009;50(9):1927-35.

Mcdaniel AL, Alger HM, Sawyer JK, Kelley KL, Kock ND, Brown JM, Temel RE, Rudel LL. Phytosterol feeding causes toxicity in ABCG5/G8 knockout mice. *Am J Pathol*. 2013;182(4):1131-8.

Mehta JL, Chen J, Hermonat PL, Romeo F, Novelli G. Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders. *Cardiovasc Res*. 2006;69(1):36-45.

Menotti A, Lanti M, Kromhout D, Blackburn H, Nissinen A, Dontas A, Kafatos A, Nedeljkovic S, Adachi H. Forty-year coronary mortality trends and changes in major risk factor in the first 10 years of follow-up in the seven countries study. *Eur J Epidemiol*. 2007;22(11):747-54.

Meurs I, Lammers B, Zhao Y, Out R, Hildebrand RB, Hoekstra M, Van Berkel TJ, Van Eck M. The effect of ABCG1 deficiency on atherosclerotic lesion development in LDL receptor knockout mice depends on the stage of atherogenesis. *Atherosclerosis*. 2012;221(1):41-7.

Miettinen TA, Ahrens EH Jr, Grundy SM. Quantitative isolation and gas-liquid chromatographic analysis of total dietary and fecal neutral steroids. *J Lipid Res*. 1965;(6):411-24.

Miettinen TA, Gylling H, Strandberg T, Sarna S. Baseline serum cholestanol as predictor of recurrent coronary events in subgroup of Scandinavian simvastatin survival study. Finnish 4S Investigators. *BMJ*. 1998;316(7138):1127-30.

Miettinen TA, Gylling H. Cholesterol synthesis and absorption in coronary patients with lipid triad and isolated high LDL cholesterol in a 4S subgroup. *Atherosclerosis*. 2003;168(2):343-9.

Miettinen TA, Gylling H. Effect of statins on noncholesterol sterol levels: implications for use of plant stanols and sterols. *Am J Cardiol*. 2005;96(1A):40D-6D.

Miettinen TA, Gylling H. The effects of statins and sitosterols: benefit or not? *Curr Atheroscler Rep*. 2009;11(1):23-7.

Miettinen TA, Puska P, Gylling H, Vanhanen H, Vartiainen E. Reduction of serum cholesterol with sitostanol-ester margarine in a mildly hypercholesterolemic population. *N Engl J Med*. 1995;333(20):1308-12.

Miettinen TA, Railo M, Lepäntalo M, Gylling H. Plant sterols in serum and in atherosclerotic plaques of patients undergoing carotid endarterectomy. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(11):1794-801.

Miettinen TA, Tilvis RS, Kesäniemi YA. Serum cholestanol and plant sterol levels in relation to cholesterol metabolism in middle-aged men. *Metabolism*. 1989;38(2):136-40.

Miettinen TA, Tilvis RS, Kesäniemi YA. Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population. *Am J Epidemiol.* 1990;131(1):20-31.

Moghadasian MH, Godin DV, Mcmanus BM, Frohlich JJ. Lack of regression of atherosclerotic lesions in phytosterol-treated apo E-deficient mice. *Life Sci.* 1999;64(12):1029-36.

Moghadasian MH, Mcmanus BM, Godin DV, Rodrigues B, Frohlich JJ. Proatherogenic and antiatherogenic effects of probucol and phytosterols in apolipoprotein E-deficient mice: possible mechanisms of action. *Circulation.* 1999;99(13):1733-9.

Moghadasian MH, Mcmanus BM, Pritchard PH, Frohlich JJ. "Tall oil" - derived phytosterols reduce atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(1):119-26.

Moghadasian MH. Dietary phytosterols reduce cyclosporine-induced hypercholesterolemia in apolipoprotein E-knockout mice. *Transplantation.* 2006;81(2):207-13.

Mok HY, Von Bergmann K, Grundy SM. Effects of continuous and intermittent feeding on biliary lipid outputs in man: application for measurements of intestinal absorption of cholesterol and bile acids. *J Lipid Res.* 1979;20(3):389-98.

Moore KJ, Freeman MW. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(8):1702-11.

Morrone D, Weintraub WS, Toth PP, Hanson ME, Lowe RS, Lin J, Shah AK, Tershakovec AM. Lipid-altering efficacy of ezetimibe plus statin and statin monotherapy and identification of factors associated with treatment response: a pooled analysis of over 21,000 subjects from 27 clinical trials. *Atherosclerosis.* 2012;223(2):251-61.

Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet.* 1997;349(9063):1436-42.

Nashed B, Yeganeh B, Hayglass KT, Moghadasian MH. Antiatherogenic effects of dietary plant sterols are associated with inhibition of proinflammatory cytokine production in Apo E-KO mice. *J Nutr.* 2005;135(10):2438-44.

NCEP: National Cholesterol Education Program Expert Panel. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002;106(25):3143-421.

Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Crowe T, Sasiela WJ, Tsai J, Orazem J, Magorien RD, O'shaughnessy C, Ganz P. Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352(1):29-38.

Nissinen M, Gylling H, Vuoristo M, Miettinen TA. Micellar distribution of cholesterol and phytosterols after duodenal plant stanol ester infusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002;282(6):G1009-15.

Ntanios FY, Van de Kooij AJ, De Deckere EA, Duchateau GS, Trautwein EA. Effects of various amounts of dietary plant sterol esters on plasma and hepatic sterol concentration and aortic foam cell formation of cholesterol-fed hamsters. *Atherosclerosis*. 2003;169(1):41-50.

Olivier M, Tanck MW, Out R, Villard EF, Lammers B, Bouchareychas L, Frisdal E, Superville A, Van Berkel T, Kastelein JJ, Eck MV, Jukema JW, Chapman MJ, Dallinga-thie GM, Guerin M, Le Goff W. Human ATP-binding cassette G1 controls macrophage lipoprotein lipase bioavailability and promotes foam cell formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(9):2223-31.

Ostlund RE Jr. Phytosterols in human nutrition. *Annu Rev Nutr*. 2002;22:533-49.

Ottestad I, Ose L, Wennersberg MH, Granlund L, Kirkhus B, Retterstøl K. Phytosterol capsules and serum cholesterol in hypercholesterolemia: A randomized controlled trial. *Atherosclerosis*. 2013;228(2):421-5.

Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis*. 1987;68(3):231-40.

Passarelli M, Catanozi S, Nakandakare ER, Rocha JC, Morton RE, Shimabukuro AF, Quintão EC. Plasma lipoproteins from patients with poorly controlled diabetes mellitus and "in vitro" glycation of lipoproteins enhance the transfer rate of cholesteryl ester from HDL to apo-B-containing lipoproteins. *Diabetologia*. 1997;40(9):1085-93.

Patel MD, Thompson PD. Phytosterols and vascular disease. *Atherosclerosis*. 2006;186(1):12-9.

Pennings M, Meurs I, Ye D, Out R, Hoekstra M, Van Berkel TJ, Van Eck M. Regulation of cholesterol homeostasis in macrophages and consequences for atherosclerotic lesion development. *FEBS Lett*. 2006;580(23):5588-96.

Pinedo S, Vissers MN, Von Bergmann K, Elharchaoui K, Lütjohann D, Luben R, Wareham NJ, Kastelein JJ, Khaw KT, Boekholdt SM. Plasma levels of plant sterol and the risk of coronary artery disease: the prospective EPIC-Norfolk Population Study. *J Lipid Res*. 2007;48(1):139-44.

Plat J, Beugels I, Gijbels MJ, De Winther MP, Mensink RP. Plant sterol or stanol esters retard lesion formation in LDL receptor-deficient mice independent of changes in serum plant sterols. *J Lipid Res*. 2006;47(12):2762-71.

Plat J, Brufau G, Dallinga-Thie GM, Dasselaar M, Mensink RP. A plant stanol yogurt drink alone or combined with a low-dose statin lowers serum triacylglycerol and non-HDL cholesterol in metabolic syndrome patients. *J Nutr*. 2009 Jun;139(6):1143-9.

Plat J, De Jong A, Volger OL, Princen HM, Mensink RP. Preferential campesterol incorporation into various tissues in apolipoprotein E*3-Leiden mice consuming plant sterols or stanols. *Metabolism*. 2008;57(9):1241-7.

Plat J, Mackay D, Baumgartner S, Clifton PM, Gylling H, Jones PJ. Progress and prospective of plant sterol and plant stanol research: report of the Maastricht meeting. *Atherosclerosis*. 2012;225(2):521-33.

Plat J, Van Onselen EN, Van Heugten MM, Mensink RP. Effects on serum lipids, lipoproteins and fat soluble antioxidant concentrations of consumption frequency of margarines and shortenings enriched with plant stanol esters. *Eur J Clin Nutr*. 2000;54(9):671-7.

Rader DJ. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *J Clin Invest*. 2006;116(12):3090-100.

Raitakari OT, Salo P, Gylling H, Miettinen TA. Plant stanol ester consumption and arterial elasticity and endothelial function. *Br J Nutr*. 2008;100(3):603-8.

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;123:1939-51.

Rideout TC, Harding SV, Jones PJ. Consumption of plant sterols reduces plasma and hepatic triglycerides and modulates the expression of lipid regulatory genes and de novo lipogenesis in C57BL/6J mice. *Mol Nutr Food Res*. 2010;54(Suppl1):S7-13.

Rideout TC, Ramprasath V, Griffin JD, Browne RW, Harding SV, Jones PJ. Phytosterols protect against diet-induced hypertriglyceridemia in Syrian golden hamsters. *Lipids Health Dis*. 2014;13:5.

Rosenson RS, Brewer Jr HB, Davidson WS, Fayad ZA, Fuster V, Goldstein J, Hellerstein M, Jiang XC, Phillips MC, Rader DJ, Remaley AT, Rothblat GH, Tall AR, Yvan-Charvet L. Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation*. 2012;125(15):1905-19.

Rosenthal RL. Effectiveness of altering serum cholesterol levels without drugs. *Proc Bayl Univ Med Cent*. 2000;13(4):351-5.

Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-26.

Rothblat GH, Phillips MC. High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol*. 2010;21(3):229-38.

Rubis B, Paszel A, Kaczmarek M. Beneficial or harmful influence of phytosterols on human cells? *Br J Nutr*. 2008;100(6):1183-91.

Rudel LL, Kelley K, Sawyer JK, Shah R, Wilson MD. Dietary monounsaturated fatty acids promote aortic atherosclerosis in LDL receptor-null, human ApoB100-overexpressing transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18(11):1818-2721.

Sabeva NS, Liu J, Graf GA. The ABCG5 ABCG8 sterol transporter and phytosterols: implications for cardiometabolic disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2009;16(2):172-7.

Sabeva NS, Mcphaul CM, Li X, Cory TJ, Feola DJ, Graf GA. Phytosterols differentially influence ABC transporter expression, cholesterol efflux and inflammatory cytokine secretion in macrophage foam cells. *J Nutr Biochem.* 2011;22(8):777-83.

Salen G, Patel S, Batta AK. Sitosterolemia. *Cardiovasc Drug Rev.* 2002;20(4):255-70.

Sanadgol N, Mostafaie A, Mansouri K, Bahrami G. Effect of palmitic acid and linoleic acid on expression of ICAM-1 and VCAM-1 in human bone marrow endothelial cells (HBMECs). *Arch Med Sci.* 2012 9;8(2):192-8.

Sanclemente T, Marques-Lopes I, Fajó-Pascual M, Cofán M, Jarauta E, Puzo J, García-Otín AL. A moderate intake of phytosterols from habitual diet affects cholesterol metabolism. *J Physiol Biochem.* 2009;65(4):397-404.

Sialvera TE, Pounis GD, Koutelidakis AE, Richter DJ, Yfanti G, Kapsokefalou M, Goumas G, Chiotinis N, Diamantopoulos E, Zameplas A. Phytosterols supplementation decreases plasma small and dense LDL levels in metabolic syndrome patients on a westernized type diet. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2012;22(10):843-8.

Silbernagel G, Chapman MJ, Genser B, Kleber ME, Fauler G, Scharnagl H, Grammer TB, Boehm BO, Mäkelä KM, Kähönen M, Carmena R, Rietzschel ER, Bruckert E, Deanfield JE, Miettinen TA, Raitakari OT, Lehtimäki T, März W. High intestinal cholesterol absorption is associated with cardiovascular disease and risk alleles in ABCG8 and ABO: evidence from the LURIC and YFS cohorts and from a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(4):291-9.

Silbernagel G, Fauler G, Hoffmann MM, Lütjohann D, Winkelmann BR, Boehm BO, März W. The associations of cholesterol metabolism and plasma plant sterols with all-cause and cardiovascular mortality. *J Lipid Res.* 2010;51(8):2384-93.

Silbernagel G, Fauler G, Renner W, Landl EM, Hoffmann MM, Winkelmann BR, Boehm BO, März W. The relationships of cholesterol metabolism and plasma plant sterols with the severity of coronary artery disease. *J Lipid Res.* 2009;50(2):334-41.

Skalén K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hultén LM, Wiklund O, Innerarity TL, Borén J. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature.* 2002;417(6890):750-4.

Soran H, Durrington PN. Susceptibility of LDL and its subfractions to glycation. *Curr Opin Lipidol.* 2011;22(4):254-61

Stamler J, Shekelle R. Dietary cholesterol and human coronary heart disease: the epidemiologic evidence. *Arch Pathol Lab Med.* 1988;112:1032-40.

Sudhop T, Gottwald BM, Von Bergmann K. Serum plant sterols as a potential risk factor for coronary heart disease. *Metabolism.* 2002;51(12):1519-21.

The Scandinavian Simvastatin Survival Study. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease. *Lancet.* 1994;344(8934):1383-9.

Theuwissen E, Plat J, van der Kallen CJ, van Greevenbroek MM, Mensink RP. Plant stanol supplementation decreases serum triacylglycerols in subjects with overt hypertriglyceridemia. *Lipids.* 2009 Dec;44(12):1131-40.

Toth PP, Ballantyne CM, Davidson MH, Tomassini JE, Ramey DR, Neff D, Tershakovec AM, Hu XH, Tunceli K. Changes in prescription patterns before and after reporting of the Ezetimibe and Simvastatin in Hypercholesterolemia Enhances Atherosclerosis Regression trial (ENHANCE) results and expected effects on low-density lipoprotein-cholesterol reduction. *J Clin Lipidol.* 2012;6(2):180-9.

Van Der Velde AE, Brufau G, Groen AK. Transintestinal cholesterol efflux. *Curr Opin Lipidol.* 2010;21,167-71.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology.* 2002;3(7):0034.1-11.

Von Bergmann K, Sudhop T, Lütjohann D. Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights. *Am J Cardiol*. 2005 4;96(1A):10D-4D.

Von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(1):13-27.

Zampelas A. From the Maastricht meeting to the European Atherosclerosis Society Consensus on phytosterols/phytosteranols: what is new of an old story? *Atherosclerosis*. 2014 Apr;233(2):357-8.

Wang X, Collins HL, Ranalletta M, Fuki IV, Billheimer JT, Rothblat GH, Tall AR, Rader DJ. Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest*. 2007;117(8):2216-24.

Weihrauch JL, Gardner JM. Sterol content of foods of plant origin. *J Am Diet Assoc*. 1978;73(1):39-47.

Weingartner O, Böhm M, Laufs U. Controversial role of plant sterol esters in the management of hypercholesterolaemia. *Eur Heart J*. 2009;30:404-9.

Weingärtner O, Lütjohann D, Ji S, Weisshoff N, List F, Sudhop T, Von Bergmann K, Gertz K, König J, Schäfers HJ, Endres M, Böhm M, Laufs U. Vascular effects of diet supplementation with plant sterols. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(16):1553-61.

Wester I. Cholesterol-lowering effect of plant sterols. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2000;102(1):37-44.

Wierzbicki AS, Viljoen A, Hardman TC, Mikhailidis DP. New therapies to reduce low-density lipoprotein cholesterol. *Curr Opin Cardiol*. 2013;28(4):452-7.

Wilson PWF, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Ibershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*. 1998;97:1837-47.

Wilund KR, Yu L, Xu F, Vega GL, Grundy SM, Cohen JC, Hobbs HH. No association between plasma levels of plant sterols and atherosclerosis in mice and men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(12):2326-32.

Xu Y, Wang W, Zhang L, Qi LP, Li LY, Chen LF, Fang Q, Dang AM, Yan XW. A polymorphism in the ABCG1 promoter is functionally associated with coronary artery disease in a Chinese Han population. *Atherosclerosis*. 2011;219(2):648-54.

Xu J, Zhou X, Gao H, Chen C, Deng Q, Huang Q, Ma J, Wan Z, Yang JE, Huang F. Micronutrients-fortified rapeseed oil improves hepatic lipid accumulation and oxidative stress in rats fed a high-fat diet. *Lipids Health Dis*. 2013; 6;12(1):28.6;12(1):28.

Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, Von Brgmann K, Lutjohann D, Cohen JC, Hobbs HH. Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002 10;99(25):16237-42.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Atherosclerosis 231 (2013) 442–447

Contents lists available at ScienceDirect

Atherosclerosis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/atherosclerosis

Dietary phytosterol does not accumulate in the arterial wall and prevents atherosclerosis of LDLr-KO mice

Renata P.A. Bombo^a, Milessa S. Afonso^a, Roberta M. Machado^a,
 Maria Silvia Ferrari Lavrador^a, Valéria S. Nunes^a, Eder R. Quintão^a, Marcia Koike^b,
 Sergio Catanozi^a, Chin Jia Lin^c, Edna R. Nakandakare^a, Ana Maria Lottenberg^{a,*}

^a Endocrinology and Metabolism Division, Faculty of Medical Sciences of the University of São Paulo, Lipids Laboratory, LIM10, São Paulo, SP, Brazil

^b Department of Medicine, Division of Emergency Medicine, Faculty of Medical Sciences of the University of São Paulo, LIM 51, SP, Brazil

^c Laboratory of Molecular Pathology, Department of Pathology, Faculty of Medical Sciences of the University of São Paulo, LIM 22, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 May 2013

Received in revised form

3 October 2013

Accepted 16 October 2013

Available online 25 October 2013

Keywords:

Phytosterol

Cholesterol absorption

LDLr-KO mice

Atherosclerosis

Diet

ABSTRACT

Scope: There have been conflicting reports on the usefulness of phytosterols (PS) in preventing atherosclerosis. We evaluated the effects of dietary PS supplementation in LDLr-KO male mice on the plasma and aorta sterol concentrations and on atherosclerotic lesion development.

Methods and results: Mice were fed a high fat diet (40% of energy) supplemented with or without PS (2% w/w, $n = 10$). Plasma and arterial wall cholesterol and PS concentrations, lesion area, macrophage infiltration, and mRNA expression from LOX-1, CD36, ABCA1 and ABCG1 in peritoneal macrophages were measured. After 16 weeks, the plasma cholesterol concentration in PS mice was lower than that in the controls ($p = 0.02$) and in the arterial wall ($p = 0.03$). Plasma PS concentrations were higher in PS-fed animals than in controls ($p < 0.0001$); however, the arterial wall PS concentration did not differ between groups. The atherosclerotic lesion area in the PS group ($n = 5$) was smaller than that in controls ($p = 0.0062$) and the macrophage area ($p = 0.0007$). PS correlates negatively with arterial lipid content and macrophage ($r = -0.76$; $p < 0.05$). PS supplementation induced lower ABCG1 mRNA expression ($p < 0.05$).

Conclusions: Despite inducing an increase in PS plasma concentration, PS supplementation is not associated with its accumulation in the arterial wall and prevents atherosclerotic lesion development.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Since the publication of the National Cholesterol Education Program (NCEP-ATPIII) [2] that recommended a daily intake of 2–3 g of phytosterols (PS), there have been conflicting reports on the usefulness of PS in preventing coronary heart disease. These reports are summarized in recent reviews that evaluated investigations conducted in humans (clinical and epidemiological) and in animals [3,4].

In observational and interventional epidemiological studies with no PS supplementation, the plasma concentrations of campesterol, β -sitosterol and cholesterol reflect cholesterol absorption, whereas lathosterol concentrations are correlated with cholesterol synthesis. The relationship between the plasma concentrations of

these markers and cardiovascular disease was not shown in the epidemiological studies conducted in healthy individuals, such as European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Norfolk) [5] and Longitudinal Aging Study Amsterdam (LASA) [6]. However, the results from the Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) study showed a positive association between the plasma PS concentration and cardiovascular risk [7]. The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study indicated that a higher concentration of cholesterol absorption markers associated with a lower concentration of lathosterol predicted an increase in cardiovascular disease mortality [8]. In contrast, new data from the EPIC study (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) from Spain showed a lower cardiovascular risk associated with a higher PS plasma concentration [9]. Other investigations were undertaken to clarify the effect of the PS supplementation, specifically on the development of atherosclerosis. One important study, conducted by Weingartner et al. (2008) [10], showed that an increase of plant sterol concentrations in plasma and in aortic valve cusps was correlated with a positive history of

* Corresponding author. Faculty of Medical Sciences of the University of São Paulo, Lipids Laboratory, LIM 10, Av Dr Arnaldo, 455, 3rd Floor, Room 3305, 01246-000 São Paulo, SP, Brazil. Tel./fax: +55 11 30617263.

E-mail address: amlottenberg@uol.com.br (A.M. Lottenberg).

cardiovascular events in patients without PS supplementation either with or without statin treatment.

Because of the controversial results from epidemiological and interventional clinical studies, other investigators resorted to studying the effect of PS supplementation on the development of atherosclerosis in experimental animals. One study found that homozygous ABCG5/G8-KO mice without PS supplementation had higher plasma PS concentrations; this increase was not related to the development of atherosclerotic lesion areas [11]. Other studies conducted with apoE-KO mice fed a PS-enriched diet showed that PS plasma concentrations are positively or negatively [12,13] related to the development of atherosclerosis and may inhibit the regression of existing lesions [14]. In agreement with the results of the latter study, an investigation conducted in heterozygous LDLr-KO mice fed PS with or without atorvastatin failed to show an atherogenic effect [15]. However, the authors of this study did not exclude the possibility that the increased serum plant sterols could be a marker for cardiovascular disease (CVD) risk in free-living humans.

The results of that investigation led us to question whether the increase in plant sterol plasma concentration induced by PS consumption could cause its accumulation in the arterial wall, triggering deleterious effects on the genesis of cardiovascular disease. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of dietary PS supplementation on arterial cholesterol and PS content as well as its correlation with the development of atherosclerosis in LDLr-KO mice.

2. Methods

An expanded methods section is provided in the [Supplementary Data](#).

2.1. Animals and diet

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for animal experimentation of the Faculty of Medical Sciences of the University of São Paulo (Local Ethics Committee—CAPPesq no.100/11). The investigation conforms to the 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals' published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). This study was performed in LDLr-KO weaned male mice, in a background on C57BL/6 (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA). The animals ($n = 10$) were fed a high-fat diet (40% of energy), as a control or supplemented with 2% PS (mostly β -sitosterol). The nutritional composition of the diet was 40% carbohydrate, 40% fat and 20% protein. Both diets were formulated without the addition of cholesterol. The diets were prepared by Nutriexperimental (Campinas, SP, Brazil), following the AIN/93 requirements [16]. The composition of the fat utilized in the diet was previously determined ([Table in Supplementary Data](#)) and was generously provided specifically by Unilever (Valinhos, SP, Brazil).

After weaning, the animals were housed (12-h light/dark cycle) in a temperature-controlled environment and were allowed *ad libitum* access to food and water. The mice were weighed weekly, and their daily food intake was estimated as the difference between the food offered and the residual food in the cage. After a 16-wk period, the mice were fasted for 12 h and anesthetized using ketamine (100 mg/kg, intraperitoneal, Ketalar; Parke-Davis) and xylazine (10 mg/kg, intraperitoneal, Rompum; Bayer). Blood was drawn from the subclavian vein over 0.1% EDTA.

The hearts with attached aortas were excised and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C , after perfusion with phosphate-buffered saline (PBS).

2.2. Blood lipids

Plasma cholesterol and triglyceride concentrations were measured with enzymatic kits (Roche Diagnostics, IN, USA) according to the manufacturer's instructions.

2.3. Arterial cholesterol and phytosterol content

The entire aorta was delipidated, and the total cholesterol (TC) and free cholesterol (FC) were determined as previously described [17]. Cholesteryl ester (CE) was calculated as the difference between the two measurements. Total protein of the residual delipidated aortic tissue was determined using a BCA kit (Pierce Ins., Rockford, IL). Analyses of TC, FC, CE, lathosterol, β -sitosterol and campesterol were executed by gas chromatography/mass spectrometry using a Shimadzu GCMS-QP2010 running version 2.5 of the GCMS software [18].

2.4. Atherosclerotic lesions analysis

From each animal, five to six 4 μm -sections, 80 μm apart, were stained using Oil Red-O (ORO; Sigma–Aldrich) as previously described [19]. Atherosclerotic lesion areas were measured blindly using Qwin image analysis software (Leica Imaging Systems, UK). The lesion area was expressed as the mean of the areas from analyzed sections. More details are available in the [Supplementary Data](#).

2.5. Immunohistochemistry on atherosclerotic lesions

The macrophage contents were determined by immunohistochemistry (IHC) analysis; the detailed method is described in the [Supplementary Data](#).

2.6. Peritoneal macrophages RNA analysis

Macrophages were harvested from peritoneal cavity, using sterile PBS without EDTA at pH 7.4. The liquid was centrifuged (1500 rpm, 4°C , 2 min), and the cell pellet was diluted in 1 mL of Trizol. Total mRNA from ABCA1, ABCG1, LOX1 and CD36 was determined from peritoneal macrophages by RT-PCR. mRNA expression was normalized to mice fed a diet with 7% energy from fat. The detailed method is described in the [Supplementary Data](#) [20].

2.7. Statistical analysis

The results are expressed as the means $\pm$ SD. The statistical analysis for the data that passed the normality test was performed using one-way ANOVA followed by the post hoc Newman–Keuls multiple comparison test for pair-wise comparisons. A value of $p < 0.05$ was considered to be significant. The data were analyzed with GraphPad Prism 4 software (GraphPad Software).

3. Results

3.1. Food consumption and body weight

The animals remained visibly healthy throughout the duration of the study. Food intake did not differ between the PS-supplemented group and the control group (3.1 ± 0.3 vs. 2.7 ± 0.2 g/day, respectively, $p = \text{NS}$). The body weight differed, with the PS-fed mice gaining more weight than the control mice after the 16-week feeding period (21 ± 3.9 vs. 15.3 ± 2.4 g/day, $p = 0.02$).

3.2. Biochemical analysis

Consumption of PS did not alter the plasma TG concentration in comparison with the control group as shown in Table 1. The average plasma cholesterol concentration in the PS-supplemented group was 28% lower than that in the control group. Dietary PS supplementation increased the plasma PS concentration compared with the control group.

3.3. Arterial sterols

The total cholesterol concentration ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) in the arterial wall was lower in the PS-supplemented group than in the control group (10.4 ± 3.3 vs. 18.9 ± 8.50 $p < 0.05$). No differences were observed between the CE (9.0 ± 1.8 vs. 14.9 ± 10.5 ; ns) and FC (1.4 ± 3.1 vs. 4.1 ± 4.7 ; ns) concentrations in the arterial wall (Fig. 1). PS supplementation did not raise the β -sitosterol (0.1 ± 0.1 vs. 0.1 ± 0.1 ; ns) and campesterol (0.05 ± 0.013 vs. 0.04 ± 0.1 ; ns) concentrations in the total aorta (Fig. 1).

3.4. Atherosclerosis development

The lipid content and the macrophage infiltration in the arterial wall are shown in Fig. 2. Compared to the controls, treatment with PS was associated with lower lesion area (oil red O staining, 5.4 ± 2.1 vs. 39.5 ± 9.0 μm^2 , $p = 0.006$, $n = 5$) and macrophage infiltration (7.7 ± 8.6 vs. 37.151 ± 9.065 μm^2 , $p = 0.0007$, $n = 5$).

3.5. Correlation between PS plasma concentration and atherosclerosis

Fig. 3 shows the correlations between the PS plasma concentration and atherosclerosis. Plasma β -sitosterol correlated negatively with arterial lipid and macrophages content ($r = -0.76$; $p < 0.05$).

3.6. Peritoneal macrophage mRNA analysis

The macrophage mRNA analysis showed that PS did not interfere in the expression of the genes involved in macrophage cholesterol uptake such as LOX-1 and CD-36. With regard to the genes related to macrophage cholesterol efflux, we found no differences in ABCA1 expression; however, ABCG1 was lower in animals on the PS diet compared with the animals on the control diet (Table 2).

4. Discussion

This investigation showed for the first time that despite an increase in plasma PS concentration, plant sterol supplementation did not cause accumulation of PS in the arterial wall and prevented the development of atherosclerotic lesions in a male LDLr-KO mice.

Table 1
Plasma cholesterol, TG and sterols concentrations in LDLr-KO mice fed control and PS diets for 16 wk.^a

	Control (n = 10)	PS (n = 10)
Campesterol ($\mu\text{g}/\text{mg}$ cholesterol)	2.96 ± 1.4	$8.13 \pm 2.11^*$
β -Sitosterol ($\mu\text{g}/\text{mg}$ cholesterol)	0.91 ± 0.4	$7.52 \pm 2.32^*$
Lathosterol ($\mu\text{g}/\text{mg}$ cholesterol)	0.45 ± 0.2	0.47 ± 0.12
Cholesterol (mmol/L)	16.14 ± 4.8	$11.68 \pm 2.99^*$
Triglycerides (mmol/L)	2.13 ± 0.96	2.08 ± 0.72

* $p < 0.05$.

^a Data are presented as the means $\pm$ SD. Control vs. PS.

Animals supplemented with PS gained more weight than controls, but their food consumption was the same. In another investigation, PS feeding did not modify the body weight, although food intake was higher in the PS-fed animals compared with the controls [21]. Moghadasian et al. (1997) [12] reported an increase in body weight in apoE-KO mice fed a PS diet. However, in that study, the food consumption of the animals was also higher. Although unexpected, this result did not affect the conclusions of the investigation.

PS-supplemented animals developed a significantly lower plasma cholesterol concentration and smaller lesion area compared with controls, as demonstrated by the lower lipid content and macrophage infiltration in the arterial wall. This observation was also reported by Weingärtner et al. (2011) [10] and Moghadasian et al. (1997) [12].

The majority of investigations have demonstrated that a high fat diet is associated with intense atherosclerosis in LDLr-KO mice [22], an effect accentuated by the saturated fat diet [23]. All the animals were submitted to a high fat diet (40% of calories as energy). The main source of dietary saturated fatty acids in our investigation was palmitic acid, which is one of the fatty acids related to atherosclerotic plaque development in humans [24] and in this animal model [17]. LDLr-KO mice were chosen for this investigation because they develop moderately increased plasma cholesterol when submitted to a high fat diet [25], thus mirroring the cholesterol concentration observed in humans with heterozygous hypercholesterolemia. Furthermore, this animal model could help to elucidate the effect of sterols in vascular cells [10].

Although PS efficiently reduced the plasma cholesterol in animals that received the supplement (28% lower compared with controls), as was exhaustively demonstrated in other studies [26,27], the plasma cholesterol concentration of these animals remained elevated (11.68 mmol/L). It is known that this degree of hypercholesterolemia is related to premature atherosclerosis, as was shown in several studies [22,28] that were also conducted in LDLr-KO mice. Therefore, the two situations found in our study, namely, a high fat and high saturated diet together with a high plasma cholesterol concentration, which are both involved in the development of atherosclerosis, suggest that PS could have others effects than reducing plasma cholesterol. However, we did not test this hypothesis in the present investigation.

No other study has evaluated the implications of PS feeding on the cholesterol content of arterial plaques. In this study, we found a lower arterial total cholesterol concentration in the group supplemented with PS compared with the control. No significant differences were observed between the two groups for the CE and FC concentrations.

To better understand the effect of PS on the development of lesion areas, we investigated some of the genes involved in the cholesterol homeostasis in the peritoneal macrophage that mirror arterial cells. Our study showed that PS did not influence the mRNA of oxLDL receptor-1 (LOX-1) and CD-36, which are both involved in the oxLDL binding, internalization and degradation [29–32]. Regarding genes involved in the cholesterol efflux, we also found no difference in the expression of the ATP-binding cassette transport (ABCA1) between the two groups. Nevertheless, PS reduced the expression of ABCG1 mRNA, which suggests that the lesion area would be greater in these animals. Although this result seems contradictory, there is now a growing body of evidence to support a potential deleterious role of ABCG1 in atherosclerosis development [33–38]. The effect of ABCG1 deficiency on lesion development in LDLr-KO mice depends on the stage of atherogenesis [36]. These results offer an explanation for an additional possible protective effect of PS that was found in our study that is beyond its cholesterol lowering effect; this observed effect could be related to the

Fig. 1. Sterols in total aorta of animals from Control and PS supplemented groups. (A) Total cholesterol (TC); (B) Cholesterol ester (CE); (C) Free cholesterol (FC); (D) β -Sitosterol; (E) Campesterol. Data are presented as mean $\pm$ SD; $n = 10$.

Fig. 2. PS supplementation and development of atherosclerosis. The atherosclerotic lesion area was determined in the aortas isolated from LDL-KO mice fed control and PS supplemented diets for 16 weeks. Serial sections were analyzed for: (A) lipid content using Oil Red-O stain; (B) macrophage infiltrate (anti-CD68). The following parameters were quantified: (C) the atherosclerotic lesion area; (D) macrophage infiltrate area. Data are presented as mean $\pm$ SD; $n = 5$.

Fig. 3. Correlations between (A) plasma β -sitosterol with macrophage area and (B) lesion area: β -sitosterol was negatively correlated with both macrophage and lesion areas.

Table 2
Peritoneal macrophage mRNA content of LDLr-KO mice fed control and PS diets for 16 wk.^{a,b}

	Control (n = 10)	PS (n = 10)
ABCA1	1.04 ± 0.74	2.5 ± 3.58
ABCG1	1.12 ± 0.51	0.51 ± 0.33*
LOX1	2.31 ± 2.16	1.02 ± 0.52
CD36	1.27 ± 0.98	0.88 ± 0.43

* $p < 0.05$.

^a Data are presented as the means ± SD, $n = 10$. Control vs. PS.

^b Results were standardized to β -actin mRNA and normalized to the mean of peritoneal macrophages from mice fed a diet containing 7% of energy as fat.

transcriptional downregulation of ABCG1 in PS-fed animals, although the mechanism of ABCG1 silencing remains elusive.

The results of our study showed that in LDLr-KO mice, PS supplementation lowered plasma VLDL and LDL cholesterol concentrations (data shown in [Supplementary Data](#)) and increased β -sitosterol and campesterol, but it did not modify the lathosterol plasma concentration. It is important to emphasize that the observed increase in plasma PS was not related to the development of atherosclerosis. Indeed, we observed a negative relationship between the plasma β -sitosterol concentration and the lesion area ($r = -0.76$, $p < 0.05$) as well as macrophage infiltration ($r = -0.76$, $p < 0.05$). Wilund et al. (2004) [11] showed that an increase in plasma plant sterol concentration did not induce atherosclerosis in animals lacking ABCG5/G8 that were fed chow or a Western diet not supplemented with PS. These authors also showed that in ABCG5/G8-KO/LDLr-KO mice, the increase in plasma plant sterol concentration was not associated with a greater aortic lesion area compared with the LDLr-KO mice. Both groups of animals developed hypercholesterolemia. Another important study was performed in apoE-KO mice: an animal model that develops intense hypercholesterolemia and atherosclerosis. In this investigation, PS intake induced an increase in PS and a decrease in cholesterol plasma concentration, together with a reduction in atherosclerotic lesions [10]. In the latter study, the animals presented a reduction in plasma cholesterol concentration, which was similar to the results in our investigation; however, the atherosclerotic lesion reduction associated with PS feeding was much less significant compared with our report, most likely because apoE-KO mice develop severe hypercholesterolemia. Another study that was also conducted in apoE-KO mice found that PS intake led to smaller atherosclerotic lesions compared with the control group; however, the PS plasma concentration was not evaluated [12].

Another concern in the literature is that PS stored in the arterial wall could increase atherosclerosis risk. A study conducted in humans correlated an increase of plasma PS with an increase in valve sterol concentration [10]. The participants in that investigation reported that they consumed PS-supplemented margarine for a period of two years; however, the authors indicated that a limitation of the study was the lack of control over the dietary habits. In their study, the PS increase in the valve cusps of the patients was positively related to the familial risk of cardiovascular disease. In agreement, the plasma plant sterol concentration was positively related to its concentration in arterial human tissue obtained from carotid endarterectomy patients but not supplemented with PS; therefore, the plasma PS content merely represented cholesterol absorption markers [39]. PS found in human tissues, including the normal aortic wall and atheromatous tissue, may be explained by the fact that it is transported in LDL particles, which carry most of the plasma cholesterol [39]. As expected, we found PS in the arteries of the two groups of animals because it is transported in LDL particles. However, we did not find any difference in β -sitosterol and campesterol concentrations in the aorta of either group (PS and

controls). Consequently, the important new observation of this study was that PS supplementation is not associated with an accumulation of PS in the arterial wall. Additionally, PS supplementation does not induce atherosclerotic lesion development. It is worth noticing that we utilized the whole artery for this measurement, assuming that the PS failed to accumulate in any individual compartment of the artery. Regarding the impact of the PS deposit on the corresponding atherosclerotic lesions, we found no correlation between these two parameters (data not shown).

5. Conclusions

Despite inducing an increase in PS plasma concentration, PS supplementation is not associated with its accumulation in the arterial wall, and it prevents atherosclerotic lesion development.

Funding

This study was supported by the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP #11/50239-4) and the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq # 142044/2011-3).

Conflict of interest

None of the authors had a financial or personal conflict of interest.

Acknowledgments

The authors' responsibilities were as follows: RPAB and AML contributed to the study concept and design, conducted the experiments, performed data analysis, interpreted the results and wrote of the manuscript; VSN, ERN and ECRQ: designed the study, interpreted the results and wrote the manuscript; VSN, RMM, MSFL and MSA: conducted experiments and data analysis; MK and CJL: conducted data analysis; SC: provided animals. All authors reviewed the final manuscript.

We would like to thank UNILEVER (SP, Brazil) for the development of the fat used for the preparation of the diet and RESITOL IND QUÍMICA LTDA (SC, Brazil) for providing the PS used in the mice diet.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.10.015>.

References

- [2] NCEP: National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002;106(25):3143–421.
- [3] Lottenberg AM, Bombo RP, Ilha A, Nunes VS, Nakandakere ER, Quintão EC. Do clinical and experimental investigations support an antiatherogenic role for dietary phytosterols/stanols? *IUBMB Life* 2012;64(4):296–306.
- [4] Calpe-Berdiel L, Méndez-González J, Blanco-Vaca F, Carles Escolà-Gil J. Increased plasma levels of plant sterols and atherosclerosis: a controversial issue. *Curr Atheroscler Rep* 2009;11(5):391–8.
- [5] Pinedo S, Vissers MN, von Bergmann K, et al. Plasma levels of plant sterol and the risk of coronary artery disease: the prospective EPIC-Norfolk Population Study. *J Lipid Res* 2007;48:139–44.
- [6] Fassbender K, Lütjohann D, Dik MG, et al. Moderately elevated plant sterol levels are associated with reduced cardiovascular risk – the LASA study. *Atherosclerosis* 2008;196(1):283–8.
- [7] Assmann G, Cullen P, Erbey J, Ramey DR, Kannenberg F, Schulte H. Plasma sitosterol elevations are associated with an increased incidence of coronary events in men: results of a nested case-control analysis of the Prospective

- Cardiovascular Münster (PROCAM) study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006;16(1):13–21.
- [8] Silbernagel G, Fauler G, Hoffmann MM, et al. The associations of cholesterol metabolism and plasma plant sterols with all-cause and cardiovascular mortality. *J Lipid Res* 2010;51(8):2384–93.
 - [9] Escurriol V, Cofán M, Moreno-Iribas C, et al. Phytosterol plasma concentrations and coronary heart disease in the prospective Spanish EPIC cohort. *J Lipid Res* 2010;51(3):618–24.
 - [10] Weingartner O, Lütjohann D, Ji S, et al. Vascular effects of diet supplementation with plant sterols. *J Am Coll Cardiol* 2008;51(16):1553–61.
 - [11] Wilund KR, Yu L, Xu F, et al. No association between plasma levels of plant sterols and atherosclerosis in mice and men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(12):2326–32.
 - [12] Moghadasian MH, McManus BM, Pritchard PH, Frohlich JJ. "Tall oil"-derived phytosterols reduce atherosclerosis in ApoE deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:119–26.
 - [13] Moghadasian MH, McManus BM, Godin DV, Rodrigues B, Frohlich JJ. Proatherogenic and antiatherogenic effects of probucol and phytosterols in apolipoprotein E-deficient mice: possible mechanisms of action. *Circulation* 1999;99:1733–9.
 - [14] Moghadasian MH, Godin DV, McManus BM, Frohlich JJ. Lack of regression of atherosclerotic lesions in phytosterol-treated apoE-deficient mice. *Life Sci* 1999;64(12):1029–36.
 - [15] Plat J, Beugels I, Gijbels MJ, de Winther MP, Mensink RP. Plant sterol or stanol esters retard lesion formation in LDL receptor-deficient mice independent of changes in serum plant sterols. *J Lipid Res* 2006;47(12):2762–71.
 - [16] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr GC. 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;123:1939–51.
 - [17] Rudel LL, Kelley K, Sawyer JK, Shah R, Wilson MD. Dietary monounsaturated fatty acids promote aortic atherosclerosis in LDL receptor-null, human ApoB100-overexpressing transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18(11):1818–2721.
 - [18] Phillips KM, Ruggio DM, Bailey JA. Precise quantitative determination of phytosterols, stanols, and cholesterol metabolites in human serum by capillary gas-liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999;732(1):17–29.
 - [19] Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 1987;68(3):231–40.
 - [20] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods* 2001;25:402–8.
 - [21] Brufau G, Kuipers F, Lin Y, Trautwein EA, Groen AK. A reappraisal of the mechanism by which plant sterols promote neutral sterol loss in mice. *PLoS One* 2011;6(6):e21576. Epub.
 - [22] Machado RM, Nakandakare ER, Quintao EC, et al. Omega-6 polyunsaturated fatty acids prevent atherosclerosis development in LDLr-KO mice, in spite of displaying a pro-inflammatory profile similar to trans fatty acids. *Atherosclerosis* 2012;224(1):66–74.
 - [23] Seo T, Qi K, Chang C, et al. Saturated fat-rich diet enhances selective uptake of LDL cholesteryl esters in the arterial wall. *J Clin Invest* 2005;115(8):2214–22.
 - [24] Sanadgol N, Mostafaei A, Mansouri K, Bahrami G. Effect of palmitic acid and linoleic acid on expression of ICAM-1 and VCAM-1 in human bone marrow endothelial cells (HBMECs). *Arch Med Sci* 2012; 9(8(2)):192–8.
 - [25] Hartvigsen K, Binder CJ, Hansen LF, et al. A diet-induced hypercholesterolemic murine model to study atherogenesis without obesity and metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(4):878–85.
 - [26] Lottenberg AM, Nunes VS, Nakandakare ER, et al. The human cholesteryl ester transfer protein I405V polymorphism is associated with plasma cholesterol concentration and its reduction by dietary phytosterol esters. *J Nutr* 2003;133(6):1800–5.
 - [27] Amiot MJ, Knol D, Cardinault N, et al. Comparable reduction in cholesterol absorption after two different ways of phytosterol administration in humans. *Eur J Nutr* 2013;52(3):1215–22.
 - [28] Getz GS, Reardon CA. Diet and murine atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(2):242–9.
 - [29] Mehta JL, Chen J, Hermonat PL, Romeo F, Novelli G. Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders. *Cardiovasc Res* 2006;69(1):36–45.
 - [30] Kataoka H, Kume N, Miyamoto S, et al. Expression of lectin like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions. *Circulation* 1999;99(24):3110–7.
 - [31] Moore KJ, Freeman MW. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(8):1702–11.
 - [32] Wang X, Collins HL, Ranalletta M, et al. Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-B1, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest* 2007;117(8):2216–24.
 - [33] Le Goff W, Dallong-Thie GM. ABCG1: not as good as expected? *Atherosclerosis* 2011;219(2):393–4.
 - [34] Ranalletta M, Wang N, Han S, Yvan-Charvet I, Welch C, Tall AR. Decreased atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice transplanted with Abcg1^{-/-} bone marrow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(10):2308–15.
 - [35] Baldán A, Pei L, Lee R, et al. Impaired development of atherosclerosis in hyperlipidemic Ldlr^{-/-} and ApoE^{-/-} mice transplanted with Abcg1^{-/-} bone marrow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(10):2301–7.
 - [36] Meurs I, Lammers B, Zhao Y, et al. The effect of ABCG1 deficiency on atherosclerotic lesion development in LDL receptor knockout mice depends on the stage of atherogenesis. *Atherosclerosis* 2012;221(1):41–7.
 - [37] Basso F, Amar MJ, Wagner EM, et al. Enhanced ABCG1 expression increases atherosclerosis in LDLr-KO mice on a western diet. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;351(2):398–404.
 - [38] Olivier M, Tanck MW, Out R, et al. Human ATP-binding cassette G1 controls macrophage lipoprotein lipase bioavailability and promotes foam cell formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32(9):2223–31.
 - [39] Miettinen TA, Cylling H. Effect of statins on noncholesterol sterol levels: implications for use of plant stanols and sterols. *Am J Cardiol* 2005;96(1A):40D–6D.

APÊNDICE B

Atherosclerosis 233 (2014) 460

ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Atherosclerosis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/atherosclerosis

Invited commentary

After all plant sterol feeding protects against atherosclerosis

A.M. Lottenberg*, R.P. Bombo, E. Nakandakare, E.R. Quintão

Endocrinology and Metabolism Division, Faculty of Medical Sciences of the University of São Paulo, Lipids Laboratory, LIM10, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 January 2014

Accepted 2 January 2014

Available online 21 January 2014

Keywords:

Cholesterol

Plant sterol

Atherosclerosis development

As authors of the report [1] discussed by D. Lütjohann et al. [2], we are grateful to their favorable and encouraging remarks on our publication and wish to add a reply to it. Regarding the comments that the presence of plant sterol in the arterial wall has already been studied, we would like to clarify that these previous published data underlie how much our investigation was needed. The study conducted by Helske et al. [3], did show accumulation of cholesterol precursors and plant sterols in human stenotic aortic valves, however, not all patients studied by them were supplemented with plant sterols (PS). Furthermore, serum concentrations of cholesterol and noncholesterol sterols did not differ significantly between patients with and without consumption of margarine or yogurt supplemented with plant stanol [3]. Another study cited by D. Lütjohann et al., conducted in patients submitted to carotid endarterectomy fed plant stanol or sterol, showed that sitostanol is not taken up into the arterial wall in contrast to sitosterol that was slightly increased. All the patients studied in this investigation were under statin treatment and a control group was missing [4]. Therefore, the results of these studies, together with the data from other investigations discussed in a recent review published by our group [5], showed the controversial aspects regarding serum PS increase and its accumulation in the arterial wall.

We fully agree with D. Lütjohann [2] that it is rather puzzling the fact that Campesterol prevails in plasma in our work [1] as well as

in the work of others [6,7], whereas the mass of Sitosterol prevails over Campesterol in the aortic wall (Table 1, Ref. [2]). Interestingly, the aortic ratio Campesterol/Sitosterol is not substantially different in all investigations mentioned by D. Lütjohann et al. [2] (Table 1). A likely possibility for the latter is aortic macrophages having a more efficient process for exporting Campesterol than Sitosterol which bears no relationship whatsoever with D. Lütjohann et al. [2] questioning the validity of the murine models as stated on their last paragraph. In vitro cell models should be useful to elucidate the reason for these findings.

In our work we made it clear that PS feeding reduces plasma cholesterol therefore protecting against atherosclerosis. In this regard, contrarily to D. Lütjohann et al. interpretation of our work (Fig 3b, Ref. [2]) the absolute amount of cholesterol expressed as $\mu\text{g}/\text{mg}$ of aortic tissue was half as much on PS than on control feeding, whereas the aortic mass of Campesterol and of Sitosterol was precisely the same on both experimental groups. In other words, PS failed to accumulate in the arterial wall in spite of markedly increasing in plasma on PS feeding (Table 1, Ref. [1]). Thus, expressing arterial wall PS data as percent of aortic total sterols is irrelevant and distracts the reader from the essence of our conclusion that after all plant sterol feeding protects against atherosclerosis as clearly shown in our animal model [1].

References

- [1] Bombo RP, Afonso MS, Machado RM, et al. Dietary phytosterol does not accumulate in the arterial wall and prevents atherosclerosis of LDLr-KO mice. *Atherosclerosis* 2013 Dec;231(2):442–7.
- [2] Lütjohann D, Schött HF, Plat J. Invited commentary on the paper published by Bombo et al.: dietary phytosterol does not accumulate in the arterial wall and prevents atherosclerosis of LDLr-KO mice. *Atherosclerosis* 2014;233(1):157–9.
- [3] Helske S, Miettinen T, Gylling H, et al. Accumulation of cholesterol precursors and plant sterols in human stenotic aortic valves. *J Lipid Res* 2008;49:1511–8.
- [4] Miettinen TA, Nissinen M, Lepantalo M, et al. Non-cholesterol sterols in serum and endarterectomized carotid arteries after a short-term plant stanol and sterol ester challenge. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011;21:182–8.
- [5] Lottenberg AM, Bombo RP, Ilha A, Nunes VS, Nakandakare ER, Quintão EC. Do clinical and experimental investigations support an antiatherogenic role for dietary phytosterols/stanols? *IUBMB Life* 2012 Apr;64(4):296–306.
- [6] Ostlund Jr RE, McGill JB, Zeng CM, et al. Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy Delta(5)-phytosterols and phytostanols in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282:E911–6.
- [7] Gylling H, Plat J, Turley S, et al. Plant sterols and plant stanols in the management of dyslipidaemia and prevention of cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.11.043>.

DOI of original articles: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.12.031>, <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.10.015>.

* Corresponding author. Faculty of Medical Sciences of the University of São Paulo, Endocrinology and Metabolism Division, Lipids Lab, Av Dr Arnaldo, 455, 3rd Floor, 01246-903 São Paulo, Brazil. Tel.: +55 11 30617263.

E-mail address: amlottenberg@uol.com.br (A.M. Lottenberg).

0021-9150/\$ – see front matter © 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.01.006>

APÊNDICE C

IUBMB *Life*, 00(00): 000–000, Month 2012

Critical Review

Do Clinical and Experimental Investigations Support an Antiatherogenic Role for Dietary Phytosterols/Stanol?

Ana Maria Lottenberg, Renata P.A. Bombo, Angela Ilha, Valeria Sutti Nunes, Edna R. Nakandakare and Eder C.R. Quintão

Endocrinology and Metabolism Division, Lipids Lab (LIM-10), Faculty of Medical Sciences of the University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil

Summary

The plasma cholesterol-reducing effect of phytosterols (PS) has been recognized in several studies, but the usefulness of PS in preventing coronary heart disease remains controversial, as some investigations claim that the high PS concentrations found in plasma and specific tissues are related to an increased risk of cardiovascular events. It has also been demonstrated that PS may induce inflammation and reduce cholesterol efflux from macrophages, conditions that are directly implicated in the development of atherosclerosis. As to arterial dysfunction and atherosclerosis, some studies have concluded that plasma PS concentrations are unrelated or only weakly related or that PS intake or plasma PS concentrations are harmful. Thus, in light of the National Cholesterol Education Program-ATPIII report, it is necessary to evaluate the relevance of their findings. To this end, we have evaluated the studies conducted on cells, animal models, and humans regarding the influence of PS on the development of atherosclerosis.

© 2012 IUBMB
IUBMB *Life*, 00: 000–000, 2012

Keywords phytosterol; clinical and experimental investigations; evidence based medicine; systematic review; nutrition; phytostanol; atherosclerosis; cholesterol absorption.

Abbreviations CHD, coronary heart disease; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; PS, phytosterol; TC: total cholesterol.

INTRODUCTION

The importance of elevated plasma cholesterol is well established in the literature revealing its correlation with cardiovascular events (1). While the plasma cholesterol level is strongly

influenced by genetic factors, dietary habits, and drug administration diet makes a weaker contribution to the size of the intestinal lumen cholesterol pool compared to endogenous sources (300 mg/day vs. 800–1,000 mg/day, respectively) (2). In several countries, therapeutic interventions that included various absorbable drugs with the purpose of reducing and of treating risk factors, particularly hypercholesterolemia, significantly lowered mortality due to cardiovascular disease (CVD) (3). More recently, inhibitors of the intestinal absorption of cholesterol such as ezetimibe have been used (4). Despite these therapeutic advances, ezetimibe has not been shown to be effective in human atherosclerosis (5). Nonabsorbable drugs, such as bile acid-chelating resins, despite their low tolerability, and natural substances, such as fibers, mucilage, phytosterols (PS), and phytostanols (in free form or as esters) have also been used (6), but fiber and mucilage are not very effective and must be ingested in large amounts. After many years of experimental and clinical work involving natural and chemically modified PS (such as double bond reduction and esterification), PS are in widespread clinical use (6). Over 40 PS have been identified, but β -sitosterol, campesterol, and stigmasterol are the most abundant, the three being structurally similar to cholesterol because they are 4-desmethyl sterols (containing no methyl groups at carbon atom 4). Stanols are saturated sterols (no double bonds in the sterol ring) and are less abundant in nature than sterols. Phytostanols are produced by hydrogenating sterols (6).

In Western diets, the intake of PS provided by vegetables, varies between 160 and 400 mg/day and can reach 700 mg/day in strict vegetarian diets (7). Although only some 50% of dietary cholesterol is absorbed, PS is poorly absorbed. This explains its lower plasma concentration (1 mg/dL) compared to that of plasma cholesterol (8). PS lowers plasma cholesterol by 10–15% when the PS intake is 0.8–4.0 g/day (9). Several trials have shown that 2 g/day of phytostanols can lower plasma low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol (LDL-C) from 9 to 14% (6). A review assessing 41 trials reported that 2 g/day of PS can

Received 26 October 2011; accepted 31 December 2011

Address correspondence to: Ana Maria P. Lottenberg, Faculty of Medical Sciences of the University of Sao Paulo, Lipids Laboratory (LIM-10), Av Dr Arnaldo, 455, 3rd floor, room 3305; São Paulo, SP 01246-903, Brazil. Tel: +55-11-30617263. Fax: +55-11-30617263. E-mail: amlottenberg@uol.com.br

ISSN 1521-6543 print/ISSN 1521-6551 online
DOI: 10.1002/iub.1006

lower LDL-C by 10% and that greater amounts lead to few additional effects (7). The National Cholesterol Education Program-ATPIII (10) has recommended, the intake of 2–3 g/day of PS, a reduction in dietary saturated fat and a severe restriction of trans-fatty acids for the treatment of moderate hypercholesterolemia. However, several studies showing deleterious effects of PS have been published since that recommendation was made, and there is no agreement on the predictive amount of plasma PS concentration influence on cardiovascular risk (11). To clarify these issues, this review will examine the relevant aspects of animal and human studies that are related to the influence of PS in atherosclerosis.

ABSORPTION OF CHOLESTEROL AND PHYTOSTEROLS

Recommendations on PS intake in humans demand a critical analysis of the benefits and potential risks caused by the rise in plasma PS, as summarized in Table 1.

Both dietary cholesterol and PS are transported to the cells of the intestinal mucosa by micelles composed of bile acids, fatty acids, diglycerides, monoglycerides, phospholipids, lysophospholipids, cholesterol, PS, and liposoluble vitamins (6) (Fig. 1). Foods from animal sources are rich in free cholesterol, which is preferentially absorbed over cholesteryl ester because of its higher solubility in micelles and its specificity for intestinal receptors (12). The high physicochemical affinity of PS for micelles induces competition with dietary cholesterol, which results in the absorption of less cholesterol.

Although the intestinal absorption process of sterols in general has not been completely elucidated, several molecular mechanisms have been proposed (14). Niemann-Pick-C1-like-1 protein (NPC1L1) is the primary protein in the brush border membrane that is responsible for uptake of these sterols (15). Within the enterocyte, most of the cholesterol is esterified by acyl-cholesterol acyl transferase (ACAT2) and then incorporated into chylomicrons in the basolateral membrane. These particles are then secreted into the lymphatic system. Some of the unesterified cholesterol returns to the intestinal lumen by specific transporters, that is, the ATP-binding cassette transporter G5 (ABCG5) and the ATP-binding cassette transporter G8 (ABCG8) (16). The steps that are involved in cholesterol and PS absorption are summarized in Figure 2.

Most of the cholesterol in the intestinal mucosa occurs in esterified form. Although a smaller amount of PS is esterified by ACAT2 (17), this process alone does not explain the reduced absorption rate (18). However, the ABCG5/G8 transporters excrete all of the available sterols back into the intestinal lumen (19). For these reasons, physiologically, the NPC1L1 present in enterocytes is likely to be much less effective in modulating the absorption of PS than of cholesterol. An insignificant fraction of PS may be esterified by ACAT2 and later transported by chylomicrons, ultimately reaching the liver for bile excretion (17). Bile excretion is more effective for PS than for cholesterol, pos-

sibly due to the presence of the transporters ABCG5/G8 in the bile canaliculi (17).

Another important path for the plasma cholesterol-reducing activity of PS has been suggested to be the stimulation of cholesterol excretion via the nonbiliary route. This route may involve stimulation of intestinal, nonbile-derived cholesterol excretion, and is called trans-intestinal cholesterol excretion (TICE) (20). TICE likely occurs via an active system present in the proximal part of the small intestine and involves transport of the cholesterol present in the basolateral and apical sides of the enterocytes back into the intestinal lumen (20). It has been concluded that ABCG5/ABCG8 heterodimer is involved in facilitating this PS-induced flow of cholesterol (21).

STUDIES ON CELLS

The action of PS on formation of atheroma plaque is not well established, but their intracellular biological activity has been the subject of investigation. Several cell types have been used to better elucidate the specific actions of PS. Studies with cancer cells have demonstrated that PS may reduce (22) or inhibit (23) cell proliferation, its effect being dependent on dose and cell type. *In vitro* PS inhibits the proliferation of smooth muscle cells and the formation of arterial plaque, thus highlighting their antiproliferative action, with no evidence of cytotoxicity (24). Also, an intense cytotoxic property of PS on endothelial cells has been reported, the viability of endothelial cells of the abdominal aorta, being reduced even at low concentrations (25). This result was attributed to PS being more oxidized than cholesterol thus possibly displacing cholesterol from the cell membrane, and damaging its integrity.

The effect of PS on inflammation is controversial, probably because of differences in the amounts of PS used in the studies. Human aortic endothelial cells enriched with low quantities of PS decreased VCAM-1 expression and attenuated the phosphorylation of nuclear-factor- κ B (26). However, in a study utilizing aortic rings, endothelial-dependent relaxation was impaired in those from mice fed plant sterols or plant stanol esters (27). Circulating blood monocytes demonstrate an increase in a subset of inflammatory monocytes when mice were fed on PS this diet (28). A recent investigation on macrophages has added to the evidence that PS may unfavorably influence progression of CVD (29). In this study, the authors demonstrated the proinflammatory effects of β -sitosterol. In addition, they showed reduced macrophage cholesterol efflux with campesterol using higher amounts of PS.

STUDIES ON ANIMALS

Table 2 summarizes the studies performed in animals. In most, the effect of PS on atherosclerotic lesions was evaluated (27,30–33). In some, a reduction in atherosclerotic lesions was observed (30–32) probably because of the cholesterol-lowering efficiency of PS. In Apo E-KO mice fed a fat-rich diet to

Table 1
Summary of studies on the effects of plant sterols/stanols in human atherosclerotic lesions and arterial function

Reference number and authors	Groups investigated	Results	Authors' conclusions
Helsinki et al., 2008 (45)	Studies claiming unfavorable PS actions on arterial function or atherosclerosis Patients (82) with severe aortic stenosis were evaluated, 13 of whom had regularly consumed margarine or yogurt supplemented with PS. A subgroup of 21 patients was submitted for valve surgery.	Greater ratios of cholesterol levels to levels of cholesterol precursors and absorption markers in the serum were associated with similarly high ratios in the stenotic aortic valves.	Local accumulation of PS and cholesterol precursors may participate in the pathobiology of aortic valve disease.
Hallikainen et al., 2006 (50)	Hypercholesterolemic individuals (48 men and 32 women) were evaluated, and the intervention group was given supplementation with sterols and stanols for 10 weeks.	Levels of LDL cholesterol were reduced with stanol and sterol administration, but flow-mediated dilatation was not affected. Brachial artery diameter was reduced only with sterol treatment.	Sterol treatment reduced the brachial artery diameter.
Rajaratnam et al., 2000 (49)	CAD women (48) and controls (61) with similar BMIs were studied.		
Glueck et al., 1991 (63)	Hypercholesterolemic individuals (1,986 women and 1,486 men) were evaluated in a cohort study.	There was a correlation between the blood levels of campesterol and stigmastanol and the personal or familial history of CHD. Additionally, campesterol and sitosterol levels correlated significantly with HDL-C and Apo A1 levels.	High concentrations of PS in the blood correlate with premature cardiovascular disease.
Miettinen et al., 1998 (61)	Male and female individuals with CHD (868) were recruited from the Finnish 4S investigation.	The ratio of the cholesterol level to the cholesterol level was negatively associated with the level of cholesterol precursors and strongly, positively related to the level of PS.	Individuals receiving statins and those who exhibited recurrences of coronary events showed greater plasma PS concentrations.
Silbermangel et al., 2009 (47)	The LURIC study (2,440 participants) evaluated the severity of coronary artery disease according to the Friesinger Score (FS) in males and females. Statins were used at a high frequency.	A positive association between the cholesterol and cholesterol levels (but not between those of sitosterol and cholesterol) was observed regarding the FS value.	There is a modest association between high cholesterol absorption and low cholesterol synthesis that is related to the increased severity of CAD. An atherogenic role of plasma PS seems unlikely in subjects without sitosterolemia.
Silbermangel et al., 2010 (64)	A cohort of individuals from the LURIC study (1,257) who were not taking statins were followed for up to 7.32 years to assess the cause of mortality, including cardiovascular causes.	There was reduced mortality in the tertile with the highest ratio of lathosterol to cholesterol but increased mortality in the tertile with the highest ratio of cholesterol to cholesterol. The sitosterol-to-cholesterol ratios were not associated with mortality.	High absorption and low synthesis of cholesterol can predict an increase in all causes of mortality as well as CV mortality.

Table 1
(Continued)

Reference number and authors	Groups investigated	Results	Authors' conclusions
Hallikainen et al., 2008 (52)	Studies claiming favorable or inconclusive PS actions on arterial function or atherosclerosis A randomized, double-blind study was performed in subjects with type 1 diabetes and included a control group ($n = 8$) and an intervention group ($n = 11$) that consumed 2 g/day of stanols.	Stanol intake elicited a reduction in serum campesterol and sitosterol levels, although the relative levels of serum synthesis markers were unaffected. No changes were found in either group regarding the brachial artery diameter. There was a significant dose-response correlation between stanol ester treatment and carotid compliance (as measured by ultrasound).	Stanol consumption does not impair endothelial function.
Raitakari et al., 2008 (51)	This case-control study was performed with healthy subjects (50 cases and 50 controls), and the recruited cases had been taking stanol esters for at least 2 years.	No significant differences in levels of absorption markers were observed between normal and hypercholesterolemic subjects. Plasma TC concentration, but not PS concentration, was related to increased coronary calcium deposits.	Stanol ester intake may be associated with beneficial changes in arterial compliance.
Wilund et al., 2004 (39)	This study investigated participants from the Dallas Heart Study, with and without a family history of CHD (men: 413 and 807, respectively, and women: 619 and 985, respectively).	Sitosterol and campesterol concentrations did not differ between cases and controls.	This result does not support an association between elevated plasma PS levels and atherosclerosis.
Pinedo et al., 2007 (54)	Prospective EPIC-Norfolk Population Study that included 758 controls and 373 individuals for whom fatal or nonfatal CAD developed during follow-up.	There were inverse associations between markers of cholesterol synthesis and absorption. Only sitosterol (either the absolute level or the ratio) was significantly increased in survivors compared with non-survivors.	This study failed to demonstrate a correlation between the plasma PS level and the presence of cardiovascular disease in healthy individuals.
Strandberg et al., 2010 (67)	This prospective study followed 232 middle-aged men in Finland with a high risk of CVD over a period of 22 years.		Higher serum PS levels predicted a lower mortality risk, reflecting an association between higher cholesterol synthesis/lower cholesterol absorption and mortality.

Table 1
(Continued)

Reference number and authors	Groups investigated	Results	Authors' conclusions
Miettinen et al., 2010 (69)	The cardiovascular risk in Young Finns study followed men ($n = 468$) for 21 years (initial ages 12–18 years) who consumed self-selected diets. Food consumption was assessed using 48-h dietary recalls.	Serum cholesterol levels were correlated with absorption but not with the synthesis of cholesterol or with cholesterol quaternities. Markers of synthesis/absorption decreased linearly with increasing cholesterol quaternities. Intima-media thickness differed among age groups but not among cholesterol quaternities. In contrast, plant sterols, as markers of cholesterol absorption, showed a weak, negative correlation with cIMT measurements and the campesterol-to-cholesterol ratio. cIMT correlated positively with serum cholesterol levels and the lathosterol-to-cholesterol ratio.	PS levels were associated with classical cardiovascular risk factors but were not related to serum cholesterol levels or vascular structure.
Weingartner et al., 2010 (65)	This prospective study assessed primary prevention according to measurements of carotid intimal thickness (cIMT) from 583 healthy individuals.		The markers of cholesterol absorption demonstrated a weak, negative correlation with cIMT.
Escurriol et al., 2010 (56)	This Spanish EPIC cohort study compared individuals of both genders who developed coronary heart disease ($n = 299$) to matched controls ($n = 584$). Information regarding typical previous food intake was collected using a computerized diet history questionnaire.	For the controls, the plasma β -sitosterol-to-cholesterol ratio increased according to increasing tertiles of PS intake. As the plasma β -sitosterol-to-cholesterol tertile increased, decreases in BMI, fasting glucose level, and TG level were observed. However, HDL-C levels and the campesterol-to-cholesterol ratio increased, and the ratio of plasma lathosterol to cholesterol decreased.	These data suggest that plasma sitosterol levels are associated with a lower CHD risk and serve as markers of a lower cardiometabolic risk.

M, male; F, female; PS, phytosterols; PSE, phytosterol esters; CHD, coronary heart disease; CAD, coronary artery disease; CVD, cardiovascular disease; DM2, diabetes mellitus type 2; TC, total cholesterol; LDL-C, LDL cholesterol; TG, triglycerides.

Figure 1. Cartoon of a micelle and the mechanism of competition between cholesterol and PS: (A) Greater ingestion of PS. (B) Mechanism of competition within the micelle; PS have a greater physical-chemical affinity, which makes it difficult for the cholesterol to be incorporated within the micelle. (C) Consequently, more cholesterol is available for fecal excretion (13).

induce atherosclerosis PS reduced the blood cholesterol concentration and delayed the progression of atherosclerosis (30). The authors then used the same type of mice fed a chow diet, a diet enriched with PS, or a diet enriched with probucol (an antioxidant and hypocholesterolemic drug). A reduction in cholesterol concentration was observed in the PS and probucol groups while antiatherogenic activity was observed only with PS, which would induce an increase in HDL and decrease in fibrinogen and in hepatic lipase activity (31). Nevertheless, it is important to note that although probucol lowers cholesterol level, it also reduces HDL, elevates fibrinogen, and decrease LPL activity (31). Therefore, the differences found may have been due to side effects of probucol. To evaluate whether PS reduces atherogenesis induced by probucol, apo E-KO mice were fed an atherogenic diet supplemented with PS, probucol, or a combination of both (34). The authors concluded that by reducing atherosclerotic lesions, PS minimized the undesirable action of probucol and caused elevation of HDL cholesterol. The same authors fed apo E-KO mice a cholesterol-supplemented diet with or without 2% dietary PS for 14 weeks and then immunized the animals with ovalbumin. The PS-enriched diet reduced plasma cholesterol concentration, raised the anti-inflammatory IL-10 and lowered proinflammatory IL-6, and induced a decreased inflammatory phenotype. These alterations were accompanied by minor atherosclerotic lesions (35). Reduction

Figure 2. Cartoon of absorption of sterols by the enterocyte: (A) Micelle at the brush border of the enterocyte. (B) Unesterified PS and free cholesterol (FC) enter the T-cell via transport by NPC1L1. (C) FC, and a significantly smaller amount of PS, is esterified by ACAT2 in the endoplasmic reticulum (ER). (D) Most of the cellular PS and some of FC return to the intestinal lumen via ABCG5/G8 transporters. (E) Cholesteryl ester (CE), phytosterol ester (PE), triglycerides (TG), and apolipoprotein B-48 (apoB 48), are further processed in the Golgi complex (GC) to form chylomicrons (QM), which are then transferred to the lymphatic system.

in arterial lesions in apo E-KO mice was dependent on the amount of PS in the diet, because a significant difference was observed when 2% supplementation was used but not with 1% supplementation (36).

While several investigations (30–32) have shown a reduction in atherosclerotic lesions with PS administration, other studies have obtained contradictory results (27, 33). Apo E-KO animals fed a fat-rich diet to induce atherosclerosis showed a regression of atherosclerotic lesions following introduction of a normal-fat diet or a diet enriched with PS (32). The induction of atherosclerosis period raised the cholesterol level, while in the regression phase, there was decrease in plasma cholesterol in the groups studied. However, reduction in cholesterol produced by the normal-fat diet was not enhanced by PS. Both groups displayed similar increases in atherosclerotic plaques, even though PS induced a slower rate of progression. The authors concluded that PS is not efficient in causing lesion regression, likely because PS do not lower the plasma cholesterol concentration in these animals. A positive correlation between the plasma concentration of PS and atherosclerotic lesions has been reported for the same animal model (27). Supplementation with phytosterol ester impaired endothelium-dependent vasorelaxation and increased the cerebral lesion size after middle cerebral artery occlusion in “wild-type” mice. However, the PS used in this study was ~100 times higher than the normal supplementation level for humans (27).

Table 2
Summary of animal studies on the effects of plant sterols/stanols in experimental atherosclerosis

Reference number and authors	Groups investigated	Dietary supplements with phytosterol/phytostanol	Conclusions
Wilund et al., 2004 (39)	10 Female LDLR KO/G5G8 KO mice	Standard diet containing 0.02% or 0.2% cholesterol and 4% or 21% total fat for 28 weeks	Arterial lesions are unrelated to plasma PS concentrations.
Weingartner et al., 2008 (35)	10 Apo E KO mice	Western-type chow diet with 2% phytosterol or ezetimibe and 0.15% cholesterol for 24 weeks	PS diet increased the cerebral lesion size following middle cerebral artery occlusion but was less efficient than ezetimibe in reducing the plaque size.
Moghadasian et al., 1997 (29)	19 Apo E KO mice	9% dietary fat with 2% phytosterol and 0.15% cholesterol for 13 weeks.	Reduced atherosclerosis is attributed to the PS-mediated reduction of plasma cholesterol levels.
Moghadasian et al., 1999 (30)	7 Apo E KO mice	4.5% of dietary fat with 2% phytosterol and 0.15% cholesterol for 25 weeks.	PS feeding led to smaller atherosclerotic lesions despite very high plasma cholesterol concentrations.
Moghadasian et al., 1999 (34)	8 Apo E KO mice	9% of dietary fat with 1% probucol $\times$ 2% phytosterol $\times$ controls and 0.15% cholesterol for 20 weeks.	Probucol increased and PS decreased the atherosclerotic lesional area.

Because of the severe hypercholesterolemia and advanced arterial lesions, which are rare in humans, some investigators may have criticized use of the apo E-KO mouse model in studies on progression or regression of atherosclerosis. Although this model may not be ideal for investigating atherosclerosis (32), the recent demonstration that esters of PS or phytostanols protect apo E-KO mice against atherosclerosis is a major advance in this field (28).

Investigations on LDL receptor-deficient mice have the advantage of a milder degree of hypercholesterolemia, and thus resemble the human plasma lipoprotein profile in such mice, increased cholesterol-standardized serum PS concentrations were not atherogenic, and adding plant sterols/stanols to atorvastatin treatment further inhibited lesion formation. Furthermore, PS and phytostanols alone inhibited the progression or induced regression of existing lesions (37). In addition, Syrian golden hamsters subjected to a phytosterol ester-enriched diet showed reduced atherosclerotic development. In the latter model, LDL-C was lowered, and plasma plant sterol concentrations were increased. Remarkably, despite this increase aortic foam cell formation was inhibited, which confirms that phytosterol ester, via their cholesterol-lowering action, prevent atherogenesis in these animals (38). When male New Zealand White rabbits were given semipurified diets for 10 weeks containing graded amounts of dietary sitostanol [0.01, 0.2, and 0.8% (w/w)], those fed 0.8% sitostanol showed lower total plasma cholesterol levels and depressed plaque accretion in coronary arteries and ascending aorta compared to the controls (39). However, wild-type and hypercholesterolemic female mice with greater than 20-fold

plasma levels of plant sterols [consequent on inactivation of the ATP-binding cassette transporters G5 and G8 (G5G8^{-/-} mice)] were fed chow or Western diets for 7 months, but no significant differences in the aortic lesion areas were found when the sitosterolemic mice were compared to their littermate controls (33).

Female Apo E*3-Leiden mice fed diets containing plant stanol esters for 38 weeks had decreased plasma cholesterol levels and dramatically reduced atherosclerotic lesion areas (40).

Despite these antiatherogenic actions, PS/plant stanols raised the blood pressure of rats simultaneously (41). Consequently, the animal studies presented several controversies regarding the action of PS on atherogenesis. Besides, all diets used in these studies were supplemented with cholesterol or bile acid, leading to the development of hepatic lesions as a negative side effect.

STUDIES ON HUMANS

Clinical Studies

Concerns about the usefulness of dietary PS have been raised because of the controversial studies conducted in animals mentioned above in addition to the strong association between human sitosterolemia and atherosclerosis. Sitosterolemia is a rare genetic disorder in which accumulation of plasma PS occurs because of defects in the ABCG5 and ABCG8 (42). It is characterized by tendon and tuberous xanthomata and accelerated atherosclerosis (43) from increased intestinal absorption and decreased biliary excretion of PS and other sterols. In a cohort study, individuals with familial hypercholesterolemia

who carry polymorphisms for both ABCG8 D19H and ABCG8 T400K have an increased risk of CVD and coronary heart disease (CHD). In conclusion, these genetic variations in the ABCG8 gene may explain the premature atherosclerosis that is observed in affected patients (44).

Increases in concentration of β -sitosterol and OF campesterol in the plasma and aortic valve tissue were observed in CVD patients (45) and in patients who have undergone carotid endarterectomy. Although the relevance of this finding is not fully understood (46), it supports a relationship between the plasma concentrations of PS and CVD.

Change in the balance between absorption and synthesis of cholesterol combined with a mild increase in plasma PS have been suggested to be atherogenic (47). Because PS accumulate in aortic valves even in individuals with a normal PS plasma concentration, PS may be a risk factor in development of aortic stenosis. However, deposition of PS in aortic valves occurs when plasma concentration of PS is elevated (27). In this regard, patients with positive history of familial coronary artery disease (CAD) present elevated plasma campesterol and β -sitosterol concentrations, thus supporting the hypothesis that PS may represent an additional risk factor for CAD (48, 49). Also, PS, but not phytosterols, cause reduction in diameter of the brachial artery in hypercholesterolemic individuals (50). However, consumption of 2 g/day of plant stanol ester for 3 months had no significant effect on arterial elasticity and endothelial function in 200 hypercholesterolemic individuals (51). The latter result agrees with the finding that plant stanol ester supplementation fails to improve the brachial artery diameter and flow-mediated dilatation in subjects with type 1 diabetes mellitus (52). Nonetheless, there was no significant difference in plasma absorption markers of dietary cholesterol, namely PS, between normal and hypercholesterolemic subjects (33). This investigation also demonstrated that elevated plasma PS does not confer a risk of CHD (33). Furthermore, favorable effects on arterial compliance have been observed when phytosterol esters were administered to normal volunteers (51). For instance, an Italian multicenter study on use of PS showed no alterations of markers of cholesterol absorption (campesterol and β -sitosterol), but found plasma isoprostane levels to be reduced in hypercholesterolemic patients treated with PS-enriched dairy products that elicit an antioxidative effect (53).

Epidemiological Studies

Corroborating the results of clinical interventions, some epidemiological studies have associated the plasma concentration of PS with cardiovascular events. However, the results of these studies are controversial, as discussed below.

The EPIC-Norfolk study failed to show a correlation between plasma PS and CVD in healthy individuals (54), and the LASA study (55) showed that PS could have neutral or protective effects on development of CHD. New data from EPIC study conducted in Spain, demonstrated a lower cardiovascular

risk among people who had a higher plasma concentration of PS (56). In this and in a previous study (57), a higher PS plasma concentration reflected consumption of healthy foods and nutrients, including fruits and seeds, vegetable protein, fiber, and polyunsaturated fatty acids. This dietary pattern is strongly associated with a lower risk of acute myocardial infarction, as demonstrated in the INTERHEART Study conducted in 52 countries (58).

In contrast, the results from Prospective Cardiovascular Münster (59) and Framingham offspring study (60) showed a positive association between the plasma concentration of PS and cardiovascular risk. Moreover, the Finnish 4S Investigation evaluated 868 CAD patients and concluded that those who were treated with statins and had a greater plasma concentration of PS experienced recurrence of CAD (61). One possible explanation is that a decrease in synthesis of cholesterol after statin administration, facilitates absorption of sterols (cholesterol and PS) that leads to elevation of plasma concentration of PS (62). A cohort study also demonstrated that a high PS plasma concentration may be associated with increased premature CHD, but did not provide PS corrections for the plasma total cholesterol concentration (63). In the LURIC trial performed in Germany, a low index of cholesterol synthesis (indicated by a lower concentration of lathosterol in plasma) that indirectly indicates high absorption of cholesterol correlated with an increase in mortality due to CVD (64). In other words, from a cardiovascular point of view, a greater capacity to absorb sterols would be harmful even though the cholesterol synthesis is impaired by a feedback mechanism. Nonetheless, limitations of this study were mainly caused by the cohort consisting of patients with indications for coronary angiography. The authors affirmed that the findings may not be generalized to subjects who are at low cardiovascular risk (64). Weingärtner et al. (65) reported no association between serum plant sterol concentrations and carotid intima-media thickness in a middle-aged population who did not have prevalent coronary vascular disease or take lipid-modified medication. However, the authors emphasized that their data could not be extrapolated to a population at high cardiovascular risk. We interpret their conclusion because elevated plasma PS levels not only reflect increased cholesterol absorption but also a higher amount of plant-based foods in the diet (64); future clinical trials should carefully consider this issue. It should be emphasized that the role of PS supplementation is to impair the intestinal absorption of cholesterol, as demonstrated in a study based on the technique of steroid fecal balance (66). In this situation, the consequence should be a higher cholesterol synthesis rate, which should be confirmed by increase in plasma cholesterol precursors and decrease in LDL-C concentration. However, in PS supplementation, the level of campesterol and of β -sitosterol in plasma may only be understood as an indication of a healthy diet which is associated with a reduced risk for CHD (56). Although consumption of PS from vegetable sources alone is not sufficient to impair cholesterol absorption, a decrease in cholesterol synthesis was observed by

these authors because of a low plasma concentration of lathosterol, a cholesterol synthesis precursor. This made the authors conclude that it is not yet possible to conclude whether PS is neutral, antiatherogenic or proatherogenic, and suggested the need for further investigation. A difficulty in associating the PS plasma concentration with CAD is that several epidemiological studies (39, 47, 48, 54, 56, 61, 63–65, 67) did not evaluate PS consumption but only assessed plasma PS measurements. Unfortunately, there are no studies on the effect of long-term supplementation on cardiovascular outcomes. The broad variability in the plasma concentrations of PS, which stem from the presence of different ABCG5/8 genetic polymorphisms, must also be taken into account (68).

CONCLUSIONS

We have presented the controversial results from studies of isolated cells, on animals and on humans and epidemiological evidence related to the use of alimentary PS/plant stanols in human atherosclerosis. We have emphasized the confounding nutritional aspects involved in the analysis of these epidemiological studies because the PS plasma concentration may represent a healthy dietary intake. Thus some studies indicate no harmful effects while others indicate a higher cardiovascular risk related to the plasma PS concentration. Long-term, placebo-controlled investigations on the effect of PS supplementation on the incidence of CVD are essential because of animal studies that show deposition of PS in some tissues. The undesirable stimulation of proinflammatory cytokine secretion by β -sitosterol and the reduction in cholesterol efflux by campesterol must be considered. The possible existence of side effects of long-term PS use beyond plasma cholesterol reduction should be investigated. Furthermore, the evidence from human epidemiological investigations does not favor use of PS to reduce clinical cardiovascular endpoints and atherosclerosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank AMPL, ECRQ, and RPAB for the research design (project conception, development of the overall research plan, and study oversight) and for writing the manuscript. AI, VSN and ERN conducted the research (hands-on data collection). All authors had primary responsibility for the final study content.

REFERENCES

- Cui, R., Iso, H., Toyoshima, H., Date, C., Yamamoto, A., et al. (2007) Serum cholesterol levels and risk of mortality from stroke and coronary heart disease in Japanese: the JACC study. *Atherosclerosis* **194**, 415–420
- Mok, H. Y., von Bergmann, K., and Grundy, S. M. (1979) Effects of continuous and intermittent feeding on biliary lipid outputs in man: application for measurements of intestinal absorption of cholesterol and bile acids. *J. Lipid Res.* **20**, 389–398
- Menotti, A., Lanti, M., Kromhout, D., Blackburn, H., et al. (2007) Forty-year coronary mortality trends and changes in major risk factor in the first 10 years of follow-up in the seven countries study. *Eur. J. Epidemiol.* **22**, 747–754
- Bays, H. E., Neff, D., Tomassini, J. E., and Tershakovec, A. M. (2008) Ezetimibe: cholesterol lowering and beyond. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* **6**, 447–470
- Kastelein, J. J. P., Akdim, F., Stroes, S. G., Zwinderman, A. H., Bots, M. L., et al. (2008) Simvastatin with or without Ezetimibe in familial hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1431–1443
- Law, M. (2000) Plant sterol and stanol margarines and health. *BMJ* **320**, 861–864
- Katan, M. B., Grundy, S. M., Jones, P., Law, M., et al. (2003) Efficacy and safety of plant stanols and sterol in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clin. Proc.* **78**, 965–978
- Calpe-Berdiel, L., Escolà-Gil, J. C., and Blanco-Vaca, F. (2009) New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism. *Atherosclerosis* **203**, 18–31
- Patel, S. B. (2008) Plant sterols and stanols: their role in health and disease. *J. Clin. Lipidol.* **2**, S11–S19.
- NCEP: National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). (2002) Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* **106**, 3143–3421
- Sabeva, N. S., Liu, J., and Graf, G. A. (2009) The ABCG5 ABCG8 sterol transporter and phytosterols: implications for cardiometabolic disease. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes. Obes.* **16**, 172–177
- Compassi, S., Werder, M., Boffelli, D., Weber, F. E., et al. (1995) Cholesteryl ester absorption by small intestinal brush border membrane is protein-mediated. *Biochemistry* **34**, 16473–16482
- Jones, P. J. and AbuMweis, S. S. (2009) Phytosterols as functional food ingredients: linkages to cardiovascular disease and cancer. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **12**, 147–151
- Patel, S. B., Manoj, D., and Thompson Paul, D. (2006) Phytosterols and vascular disease. *Atherosclerosis* **186**, 12–19
- Altmann, S. W., Davis, H. R. Jr., Zhu, L. J., Yao, X., et al. (2004) Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* **303**, 1201–1204
- Yu, L., Hammer, R. E., Li-Hawkins, J., Von Bergmann, K., et al. (2002) Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 16237–16242
- von Bergmann, K., Sudhop, T., and Lütjohann, D. (2005) Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights. *Am. J. Cardiol.* **96**, 10D–14D.
- Lin, D. S., Steiner, R. D., Merkens, L. S., Pappu, A. S., and Connor, W. E. (2010) The effects of sterol structure upon sterol esterification. *Atherosclerosis* **208**, 155–160
- Sanclemente, T., Marques-Lopes, L., Fajó-Pascual, M., Cofán, M., et al. (2009) A moderate intake of phytosterols from habitual diet affects cholesterol metabolism. *J. Physiol. Biochem.* **65**, 397–404
- van der Velde, A. E., Brufau, G., and Groen, A. K. (2010) Transintestinal cholesterol efflux. *Curr. Opin. Lipidol.* **21**, 167–171
- Brufau, G., Kuipers, F., Lin, Y., Trautwein, E. A., and Groen, A. K. (2011) A reappraisal of the mechanism by which plant sterols promote neutral sterol loss in mice. *PLoS One* **6**, e21576.
- Driscoll, K. E., Carter, J. M., Howard, B. W., Hassenbein, D. G., et al. (1996) Pulmonary inflammatory, chemokine, and mutagenic responses in rats after subchronic inhalation of carbon black. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **136**, 372–380
- Ju, Y. H., Clausen, L. M., Allred, K. F., Almada, A. L., and Helferich, W. G. (2004) β -Sitosterol, β -sitosterol glucoside, and a mixture of β -sitosterol and β -sitosterol glucoside modulate the growth of estrogen-responsive breast cancer cells in vitro and in ovariectomized athymic mice. *J. Nutr.* **134**, 1145–1151

24. Awad, A. B., Williams, H., and Fink, C. S. (2001) Phytosterols reduce in vitro metastatic ability of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Nutr. Cancer* **40**, 157–164.
25. Rubis, B., Paszel, A., Kaczmarek, M., Rudzinska, M., et al. (2008) Beneficial or harmful influence of phytosterols on human cells? *Br. J. Nutr.* **100**, 1183–1191.
26. Loizou, S., Lekakis, I., Chrousos, G. P., and Moutsatsou, P. (2010) Beta-sitosterol exhibits anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **54**, 551–558.
27. Weingärtner, O., Ulrich, C., Lütjohann, D., Ismail, K., Schirmer, S. H., et al. (2011) Differential effects on inhibition of cholesterol absorption by plant stanol and plant sterol esters in apoE^{-/-} mice. *Cardiovasc. Res.* **90**, 484–492.
28. Sabeva, N. S., McPhaul, C. M., Li, X., Cory, T. J., et al. (2011) Phytosterols differentially influence ABC transporter expression, cholesterol efflux and inflammatory cytokine secretion in macrophage foam cells. *J. Nutr. Biochem.* **22**, 777–783.
29. Moghadasian, M. H., McManus, B. M., Pritchard, P. H., Frohlich, J. J. (1997) "Tall oil"-derived phytosterols reduce atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 119–126.
30. Moghadasian, M. H., McManus, B. M., Godin, D. V., Rodrigues, B., Frohlich, J. J. (1999) Proatherogenic and antiatherogenic effects of probucol and phytosterols in apolipoprotein E-deficient mice: possible mechanisms of action. *Circulation* **99**, 1733–1739.
31. Moghadasian, M. H. (2006) Dietary phytosterols reduce probucol-induced atherogenesis in apo E-KO mice. *Atherosclerosis* **188**, 28–34.
32. Nashed, B., Yeganeh, B., HayGlass, K. T., and Moghadasian, M. H. (2005) Antiatherogenic effects of dietary plant sterols are associated with inhibition of proinflammatory cytokine production in Apo E-KO mice. *J. Nutr.* **135**, 2438–2444.
33. Calpe-Berdiel, L., Escolà-Gil, J. C., Ribas, V., and Navarro-Sastre, A. (2005) Changes in intestinal and liver global gene expression in response to a phytosterol-enriched diet. *Atherosclerosis* **181**, 75–85.
34. Moghadasian, M. H., Godin, D. V., McManus, B. M., and Frohlich, J. J. (1999) Lack of regression of atherosclerotic lesions in phytosterol-treated apo E-deficient mice. *Life Sci.* **64**, 1029–1036.
35. Weingärtner, O., Lütjohann, D., Ji, S., Weisshoff, N., et al. (2008) Vascular effects of diet supplementation with plant sterols. *J. Am. Coll. Cardiol.* **51**, 1553–1561.
36. Plat, J., Beugels, L., Gijbels, M. J., de Winther, M. P., and Mensink, R. P. (2006) Plant sterol or stanol esters retard lesion formation in LDL receptor-deficient mice independent of changes in serum plant sterols. *J. Lipid Res.* **47**, 2762–2771.
37. Ntanos, F. Y., van de Kooij, A. J., de Deckere, E. A., Duchateau, G. S., and Trautwein, E. A. (2003) Effects of various amounts of dietary plant sterol esters on plasma and hepatic sterol concentration and aortic foam cell formation of cholesterol-fed hamsters. *Atherosclerosis* **169**, 41–50.
38. Ntanos, F. Y., Jones, P. J., and Frohlich, J. J. (1998) Dietary sitosterol reduces plaque formation but not lecithin cholesterol acyl transferase activity in rabbits. *Atherosclerosis* **138**, 101–110.
39. Wilund, K. R., Yu, L., Xu, F., Vega, G. L., et al. (2004) No association between plasma levels of plant sterols and atherosclerosis in mice and men. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 2326–2332.
40. Volger, O. L., Mensink, R. P., Plat, J., Hornstra, G., et al. (2001) Dietary vegetable oil and wood derived plant stanol esters reduce atherosclerotic lesion size and severity in apoE³-Leiden transgenic mice. *Atherosclerosis* **157**, 375–381.
41. Chen, Q., Gruber, H., Swist, E., Coville, K., et al. (2010) Dietary phytosterols and phytosterols decrease cholesterol levels but increase blood pressure in WKY inbred rats in the absence of salt-loading. *Nutr. Metab. (London)* **7**, 11.
42. Berge, K. E., Tian, H., Graf, G. A., Yu, L., et al. (2000) Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* **290**, 1771–1775.
43. Salen, G., Patel, S., and Batta, A. K. (2002) Sitosterolemia. *Cardiovasc. Drug Rev.* **20**, 255–270.
44. Koeijvoets, K. C., van der Net, J. B., Dallinga-Thie, G. M., Steyerberg, E. W., et al. (2009) ABCG8 gene polymorphisms, plasma cholesterol concentrations, and risk of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* **204**, 453–458.
45. Helske, S., Miettinen, T., Gylling, H., Mäyränpää, M., et al. (2008) Accumulation of cholesterol precursors and plant sterols in human stenotic aortic valves. *J. Lipid Res.* **49**, 1511–1518.
46. Miettinen, T. A., Railo, M., Lepäntalo, M., and Gylling, H. (2005) Plant sterols in serum and in atherosclerotic plaques of patients undergoing carotid endarterectomy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **45**, 1794–801.
47. Silbernagel, G., Fauler, G., Renner, W., Landl, E. M., et al. (2009) The relationships of cholesterol metabolism and plasma plant sterols with the severity of coronary artery disease. *J. Lipid Res.* **50**, 334–341.
48. Sudhop, T., Gottwald, B. M., and von Bergmann, K. (2002) Serum plant sterols as a potential risk factor for coronary heart disease. *Metabolism* **51**, 1519–1521.
49. Rajaratnam, R. A., Gylling, H., and Miettinen, T. A. (2000) Independent association of serum squalene and noncholesterol sterols with coronary artery disease in postmenopausal women. *J. Am. Coll. Cardiol.* **35**, 1185–1191.
50. Hallikainen, M. A., Lyyra-Laitinen, T., Laitinen, T., Agren, J. J., et al. (2006) Endothelial function in hypercholesterolemic subjects: effects of plant stanol and sterol esters. *Atherosclerosis* **188**, 425–432.
51. Raitakari, O. T., Salo, P., Gylling, H., and Miettinen, T. A. (2008) Plant stanol ester consumption and arterial elasticity and endothelial function. *Br. J. Nutr.* **100**, 603–608.
52. Hallikainen, M., Lyyra-Laitinen, T., Laitinen, T., Moilanen, L., et al. (2008) Effects of plant stanol esters on serum cholesterol concentrations, relative markers of cholesterol metabolism and endothelial function in type 1 diabetes. *Atherosclerosis* **199**, 432–439.
53. Mannarino, E., Pirro, M., Cortese, C., Lupattelli, G., et al. (2009) Effects of a phytosterol-enriched dairy product on lipids, sterols and 8-isoprostane in hypercholesterolemic patients: a multicenter Italian study. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **19**, 84–90.
54. Pinedo, S., Vissers, M. N., von Bergmann, K., Elharchaoui, K., et al. (2007) Plasma levels of plant sterol and the risk of coronary artery disease: the prospective EPIC-Norfolk Population Study. *J. Lipid Res.* **48**, 139–144.
55. Fassbender, K., Lütjohann, D., Dik, M. G., Bremmer, M., et al. (2008) Moderately elevated plant sterol levels are associated with reduced cardiovascular risk—the LASA study. *Atherosclerosis* **196**, 283–288.
56. Escurriol, V., Cofán, M., Moreno-Iribas, C., Larrañaga, N., et al. (2010) Phytosterol plasma concentrations and coronary heart disease in the prospective Spanish EPIC cohort. *J. Lipid Res.* **51**, 618–624.
57. Andersson, S. W., Skinner, J., Ellegard, L., Welch, A. A., et al. (2004) Intake of dietary plant sterols is inversely related to serum cholesterol concentration in men and women in the EPIC Norfolk population: a cross-sectional study. *Eur. J. Clin. Nutr.* **58**, 1378–1385.
58. Iqbal, R., Anand, S., Ounpuu, S., Islam, S., et al. (2008) Dietary patterns and the risk of acute myocardial infarction in 52 countries: results of the INTERHEART study; on behalf of the INTERHEART study investigators. *Circulation* **118**, 1929–1937.
59. Assmann, G., Cullen, P., Erbey, J., Ramey, D. R., et al. (2006) Plasma sitosterol elevations are associated with an increased incidence of coronary events in men: results of a nested case-control analysis of the Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) study. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **16**, 13–21.
60. Matthan, N. R., Pencina, M., LaRoque, J. M., Jacques, P. F., et al. (2009) Alterations in cholesterol absorption/synthesis markers characterize Framingham offspring study participants with CHD. *J. Lipid Res.* **50**, 1927–1935.
61. Miettinen, T. A., Gylling, H., Strandberg, T., and Sarna, S. (1998) Baseline serum cholestanol as predictor of recurrent coronary events in sub-

- group of Scandinavian simvastatin survival study. Finnish 4S Investigators. *BMJ* **316**, 1127–1130
62. Miettinen, T. A. and Gylling, H. (2009) The effects of statins and sitosterols: benefit or not? *Curr. Atheroscler. Rep.* **11**, 23–27
63. Glueck, C. J., Speirs, J., Tracy, T., Streicher, P., et al. (1991) Relationships of serum plant sterols (phytosterols) and cholesterol in 595 hypercholesterolemic subjects, and familial aggregation of phytosterols, cholesterol, and premature coronary heart disease in hyperphytosterolemic probands and their first-degree relatives. *Metabolism* **40**, 842–848
64. Silbernagel, G., Fauler, G., Hoffmann, M. M., Lutjohann, D., et al. (2010) The associations of cholesterol metabolism and plasma plant sterols with all-cause and cardiovascular mortality. *J. Lipid Res.* **51**, 2384–2393
65. Weingärtner, O., Pinsdorf, T., Rogacev, K. S., Blömer, L., et al. (2010) The relationships of markers of cholesterol homeostasis with carotid intima-media thickness. *PLoS One* **5**, e13467.
66. Gylling, H. and Miettinen, T. A. (1996) Effects of inhibiting cholesterol absorption and synthesis on cholesterol and lipoprotein metabolism in hypercholesterolemic non-insulin-dependent diabetic men. *J. Lipid Res.* **37**, 1776–1785
67. Berge, K. E., von Bergmann, K., Lutjohann, D., Guerra, R., et al. (2002) Heritability of plasma noncholesterol sterols and relationship to DNA sequence polymorphism in ABCG5 and ABCG8. *J. Lipid Res.* **43**, 486–494
68. Strandberg, T. E., Gylling, H., Tilvis, R. S., and Miettinen, T. A. (2010) Serum plant and other noncholesterol sterols, cholesterol metabolism and 22-year mortality among middle-aged men. *Atherosclerosis* **210**, 282–287
69. Miettinen, T. A., Gylling, H., Hallikainen, M., Juonala, M., et al. (2010) Relation of non-cholesterol sterols to coronary risk factors and carotid intima-media thickness: the cardiovascular risk in Young Finns Study. *Atherosclerosis* **209**, 592–597