UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

***AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO EFEITO DOS ÁCIDOS GRAXOS OLÉICO,
PALMÍTICO E ESTEÁRICO SOBRE BIOMARCADORES DO PROCESSO
ATEROSCLERÓTICO***

Claudimar de Jesus Oliveira

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador: Prof. Tit. Jorge Mancini Filho

São Paulo

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

***AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO EFEITO DOS ÁCIDOS GRAXOS OLÉICO,
PALMÍTICO E ESTEÁRICO SOBRE BIOMARCADORES DO PROCESSO
ATEROSCLERÓTICO***

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Claudimar de Jesus Oliveira

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador: Prof. Tit. Jorge Mancini Filho

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Oliveira, Claudimar de Jesus
O48av   Avaliação comparativa do efeito dos ácidos graxos
          oléico, palmítico e esteárico sobre biomarcadores do processo
          aterosclerótico / Claudimar de Jesus Oliveira. -- São Paulo,
          2013.
          132p.

      Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
      da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e
      Nutrição Experimental.

      Orientador : Mancini Filho, Jorge

      1. Nutrição experimental : Ciência dos alimentos 2.
      Aterosclerose I. T. II. Mancini Filho, Jorge, orientador.

641.1   CDD

Claudimar de Jesus Oliveira

***AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO EFEITO DOS ÁCIDOS GRAXOS OLÉICO,
PALMÍTICO E ESTEÁRICO SOBRE BIOMARCADORES DO PROCESSO
ATEROSCLERÓTICO***

Comissão Julgadora
da
Tese pra obtenção do grau de Doutor

Presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, ___ de _____ de 2013.

A Deus, por toda força.

À minha amada família pelo apoio, amor, compreensão e exemplo de
dignidade, ética e tenacidade.

A Carlos Eduardo Wanderley, pelo amor e por tudo que é em minha vida.

Aos meus queridos amigos por sempre estarem ao meu lado, seja onde for.

AGRADECIMENTOS

Ao estimado Prof. Jorge Mancini Filho, pela orientação deste trabalho com dedicação, paciência e muitos ensinamentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por fomentar a realização desta pesquisa.

À querida equipe do Laboratório de Lípidos, da qual faço parte, com muito orgulho (Ana Mara, Eliane, Fernanda Shinagawa, Fernanda Santana, Illana, Lucília e Rosângela) e Liliane Pires, Viviane, Cristiane Hermes, Paula Garcia e Felipe Gomes, amigos sempre presentes.

Aos docentes que ministraram as disciplinas as quais cursei.

A todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

A equipe do Biotério de Experimentação Animal.

Aos técnicos Camila Marinho, Alexandre (B.16), Nilton, Alexandre Pimentel, Laila Santos, Tatiana Garofalo e Elias, não somente pelo apoio técnico, mas pela amizade.

Às professoras Sílvia Cozzolino, Sílvia Berlanga, Dulcinéia Paes e Ana Campa por sempre permitirem que possamos compartilhar de novas técnicas, equipamentos e estrutura para a realização dos nossos trabalhos.

Ao Dr. Artemir Coelho por sua amizade e por compartilhar seus conhecimentos.

À equipe orientada pela professora Dulcinéia Paes, principalmente Júlio, Fernanda, Martina e Marcela.

À Universidade de São Paulo, por toda sua estrutura.

Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1. Aterosclerose.....	7
2.2. Moléculas de adesão ICAM-1, VCAM-1, CD-36 e quimiocina MCP-1.....	12
2.3. Ácido oleico.....	22
2.4. Ácidos graxos saturados.....	25
2.5. Metabolismo de ácidos graxos.....	30
2.6. Peroxidação lipídica e aterosclerose.....	42
2.7. Enzimas antioxidantes.....	45
3. OBJETIVOS.....	50
3.1. Objetivo geral.....	50
3.2. Objetivos específicos.....	50
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1. Ensaio biológico.....	51
4.2. Elaboração das dietas – tratamentos.....	52
4.3. Coeficiente de Eficácia Alimentar – CEA.....	54
4.4. Lipidograma.....	54

4.5. Preparo dos tecidos hepático, cardíaco e cerebral.....	54
4.5.1. Fígado.....	54
4.5.2. Coração.....	55
4.5.3. Cérebro.....	55
4.6. Enzimas antioxidantes.....	56
4.6.1. Atividade da Superóxido Dismutase.....	56
4.6.2. Atividade da Catalase.....	57
4.7. Peroxidação lipídica do tecido hepático, cerebral e cardíaco....	57
4.8. Determinação de proteína dos tecidos.....	58
4.9. Perfil de ácidos graxos dos tecidos e rações.....	58
4.10 Extração, transcrição e amplificação do mRNA das moléculas de adesão e quimiocina – ensaio <i>Quantitative Real Time Poly-</i> <i>merase Chain Reaction</i>	59
4.10.1. Extração de RNA do tecido cardíaco.....	59
4.11. Estatística.....	62
 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 63
5.1. Perfil de ácidos graxos – rações.....	63
5.2. Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA).....	64
5.3. Resultados de HDL-c, LDL-c, colesterol total e TAG.....	65
5.4. Perfil lipídico do tecido hepático.....	74
5.5. Perfil lipídico do tecido cardíaco.....	78
5.6. Peroxidação lipídica.....	79
5.7. Atividade de enzimas antioxidantes.....	82
5.8. Biomarcadores ateroscleróticos – moléculas de adesão ICAM-1, VCAM-1, CD-36 e quimiocina MCP-1	86

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	94
7. CONCLUSÕES.....	96
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
9. ANEXOS.....	130

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resumo do processo aterosclerótico com migração, diferenciação de monócitos, células musculares lisas e expressão de moléculas de adesão.....	11
Figura 2. Vias para a produção e remoção de ERO's pelas enzimas SOD, CAT, GPx e GR.....	48
Figura 3. Determinação da concentração sérica (média) de colesterol HDL (mg/dL) em camundongos fêmeas alimentadas com ração suplementada com tioleato, tripalmitato e triestearato por período de seis semanas.....	66
Figura 4. Determinação da concentração sérica (média) de colesterol LDL (mg/dL) em camundongos fêmeas alimentadas com ração suplementada com tioleato, tripalmitato e triestearato por período de seis semanas.....	69
Figura 5. Determinação da concentração sérica (média) de colesterol total (mg/dL) em camundongos fêmeas alimentadas com ração suplementada com tioleato, tripalmitato e triestearato por período de seis semanas.....	72
Figura 6. Determinação da concentração sérica (média) de triacilglicerol (mg/dL) em camundongos fêmeas alimentadas com ração suplementada com tioleato, tripalmitato e triestearato por período de seis semanas....	73
Figura 7. Determinação da quantidade (média) de ácido linoleico (g/100g), no tecido hepático de camundongos fêmeas alimentadas com ração suplementada com tioleato, tripalmitato e triestearato por período de seis semanas.....	75
Figura 8. Determinação da quantidade (média) de ácido palmítico (g/100g), no tecido hepático de camundongos fêmeas alimentadas com ração suplementada com tioleato, tripalmitato e triestearato por período de seis semanas.....	76
Figura 9. Determinação da quantidade (média) de ácido palmítico (g/100g) tecido hepático de camundongos fêmeas alimentadas com ração suplementada com trioleato, tripalmitato e triestearato por período de seis semanas.....	76
Figura 10. Determinação da quantidade (média) de ácido oleico (g/100g) no tecido hepático de camundongos fêmeas alimentadas com ração suplementada com tioleato, tripalmitato e triestearato por período de seis	78

semanas

Figura 11. Determinação da concentração (média) de TBARS (nMol/mg ptn), no tecido hepático de camundongos fêmeas alimentadas com ração suplementada com trioleato, tripalmitato e triestearato por período de seis semanas.....	80
figura 12. Determinação da concentração (média) de TBARS (nMol/mg ptn), no tecido cerebral de camundongos fêmeas alimentadas com ração suplementada com trioleato, tripalmitato e triestearato por período de seis semanas.....	80
Figura 13. Determinação da concentração (média) de TBARS (nMol/mg ptn), no tecido cardíaco de camundongos fêmeas alimentadas com ração suplementada com trioleato, tripalmitato e triestearato por período de seis semanas.....	81
Figura 14. Determinação da atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD (U/mg de proteína), no tecido hepático e cardíaco de camundongos fêmeas alimentadas com ração suplementada com trioleato, tripalmitato e triestearato por período de seis semanas.....	86
Figura 15. Determinação da razão da expressão do gene da MCP-1 e gene normalizador, no tecido cardíaco de camundongos fêmeas alimentadas com ração suplementada com trioleato, tripalmitato e triestearato por período de seis semanas.....	87
Figura 16. Determinação da razão da expressão dos genes ICAM-1, VCAM-1 e gene normalizador, no tecido cardíaco de camundongos fêmeas alimentadas com ração suplementada com trioleato, tripalmitato e triestearato por período de seis semanas.....	91
Figura 17. Determinação da razão da expressão do gene do CD-36 e gene normalizador, no tecido cardíaco de camundongos fêmeas alimentadas com ração suplementada com trioleato, tripalmitato e triestearato por período de seis semanas.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição centesimal das dietas (fabricante).....	53
Tabela 2. Perfil de ácidos graxos das rações ofertadas <i>ad libitum</i> no ensaio biológico com modelo animal (camundongos fêmeas), suplementadas com ácidos graxos (TO, TP e TE), realizado no período de seis semanas.....	63
Tabela 3. Valores de ganho de peso (g), consumo de ração (g) e cálculo do Coeficiente de Eficácia Alimentar (razão entre o ganho de peso e consumo de ração) dos animais (camundongos fêmeas), estimado durante o tratamento com rações suplementadas, por seis semanas....	65
Tabela 4. Perfil de ácidos graxos do tecido hepático (g/100g) de camundongos fêmeas, alimentadas com rações (<i>ad libitum</i>) suplementadas com ácidos graxos (TO, TP e TE), por período de seis semanas.....	74
Tabela 5. Perfil de ácidos graxos do tecido cardíaco (g/100g) de camundongos fêmeas, alimentadas com rações (<i>ad libitum</i>) suplementadas com ácidos graxos (TO, TP e TE), por período de seis semanas.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

ACAT	<i>Acyl-Cholesterol-Acyl-Transferase</i>
acil- CoA	Acil-Coenzima A
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APOA-1	Apolipoproteína A1
ATP	Adenosina trifosfato
C	Centigrado
CAT	Catalase
CCL-2	CC Chemokine Ligand-2
CD-36	Cluster of Differentiation-36
CPT-I	Carnitina palmitoiltransferase I
CPT-II	Carnitina palmitoiltransferase II
CRP	C- Reactive Protein
CT	Colesterol Total
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DPec	Diethyl Pyrocarbonate
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
eNOS	endothelial Oxide Nítric Sintase
ERO's	Espécies Reativas de Oxigênio
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
GR	Glutathione Redutase
GSH	Glutathione Reduzida
GSH-Px	Glutathione Peroxidase
GSSG	Glutathione Oxidada
HCL	Ácido clorídrico
HDL-c	High Density Lipoprotein-cholesterol

ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IDL	<i>Intermediary Density Lipoprotein</i>
IL1β	Interleucina 1 Beta
IL10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina-6
INFγ	Interferon gama
KCN	Cianeto de Potássio
LDL-c	Low Density Lipoprotein-cholesterol
LOX-1	<i>Lectin-like Oxidized LDL receptor-1</i>
LPL	Lipase Lipoproteica
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MCSF	<i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
MDA	Malonaldeído
mRNA	messengerRibonucleic Acid
MUFA	Monounsaturated Fatty Acid
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NFκB	Nuclear Factor Kappa B
NOX	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase
NPC1L1	<i>Nieman-Pick C1 L1</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
ON	Oxído Nítrico
ox-LDL	Low Density Lipoprotein oxidada
p38MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
PA	Puro para Análise
PON1	Paraoxanase1

PPAR_γ	Peroxisome Proliferator Gama
P-SGL1	P-selectin glycoprotein ligand1
PUFA	Poliunsaturatede Fatty Acid
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	Ribonucleic Acid
RPM	Rotações por Minuto
SOD	Superóxido Dismutase
TAG	Triacilglicerol
TBARS	Thiobarbituric Acid Reactive Substances
TE	Triestearato
TEP	Tetrametoxipropano
TLR	Toll Like Receptor
TNF-α	Tumoral Necrose Factor Alpha
TO	Trioleato
TP	Tripalmitato
TxA₂	Tromboxano A ₂
VCAM-1	Vascular Cellular Adhesion Molecule-1
VLA-4	Very Late Antigen-4
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

OLIVEIRA, J. CLAUDIMAR - "**Avaliação comparativa do efeito dos ácidos graxos oléico, palmítico e esteárico sobre biomarcadores do processo aterosclerótico**".

2013. 132f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A aterosclerose é classificada como enfermidade crônica não transmissível e é considerada uma das principais causas de morte e morbidade em vários países, incluindo o Brasil. Entre as possíveis causas de sua gênese está o hábito alimentar, especificamente o consumo de ácidos graxos, principalmente saturados e *trans*. Ácidos graxos saturados possuem características biológicas e físico-químicas diferentes dos insaturados. Os mais abundantes na dieta humana são o palmítico e esteárico. Sua associação com acometimentos cardiovasculares vem sendo cada vez mais investigada, principalmente os que possuem mais de dez carbonos em sua cadeia interferindo no metabolismo de lipoproteínas podendo desencadear todo o processo aterosclerótico. A indústria de alimentos vem desenvolvendo algumas tecnologias opcionais para reduzir ou eliminar ácidos graxos *trans*, em especial, o elaídico, dentre elas a modificação no processo de hidrogenação que aumenta a quantidade de ácidos graxos saturados. Alguns alimentos industrializados necessitam de uma grande quantidade de ácidos graxos saturados promovendo um aumento no teor de ácido palmítico e esteárico, sendo este último considerado um ácido graxo saturado neutro, mas dependendo da concentração utilizada, pode contribuir no decréscimo da HDL-c (*High Density Lipoprotein*), dentre outras alterações deletérias. Desta forma, investigar as alterações de determinados parâmetros biológicos diante da mudança da proporção de ácidos graxos saturados, respeitando o teor total de lipídios de uma dieta é a base deste estudo. Foram realizados ensaios em material biológico para a determinação dos seguintes parâmetros: 1) Atividade de enzimas antioxidantes; 2) Peroxidação lipídica em tecidos; 3) Lipidograma; 4) Determinação do perfil de ácidos graxos de tecidos e rações e 5) Expressão de genes relacionados com o processo aterosclerótico (ICAM-1, VCAM-1, CD36 e MCP-1). A determinação da atividade de enzimas antioxidantes foi realizada considerando somente as enzimas Catalase (CAT) e Superóxido Dismutase (SOD), por se tratarem de enzimas com alteração expressiva no processo aterogênico, na ocorrência de disfunção endotelial. Neste trabalho, foi analisada a atividade das referidas enzimas no tecido hepático e cardíaco, onde não foram constatadas alterações. O mesmo processo biológico que estimula a produção excessiva de espécies reativas pode levar ao aumento da peroxidação lipídica, principalmente de ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares, em tecidos como fígado, cérebro e coração. A peroxidação lipídica apresentou diferenças significativas no tecido hepático. O grupo alimentado com ração enriquecida com tripalmitato apresentou peroxidação lipídica aumentada em relação ao grupo controle. Correlacionando com o perfil de ácidos graxos do tecido hepático, notamos que houve maior incorporação de ácido palmítico nesse tecido, que por apresentar configuração linear, quando incorporado à membrana celular, pode levar à disfunção e possível suscetibilidade a danos, como a peroxidação. No tecido cardíaco e no tecido cerebral não foram observadas alterações e diferenças entre os tratamentos. O

lipidograma consiste na quantificação de lipoproteínas e frações lipídicas, compondo o perfil lipídico no plasma sanguíneo. Os resultados obtidos mostraram que o colesterol total foi significativamente menor no grupo controle, assim como triacilglicerol e LDL colesterol (LDL-c). Já HDL colesterol (HDL-c) está reduzida no grupo que recebeu ração suplementada com ácido palmítico, assim como este grupo apresentou parâmetros aumentados nas dosagens de triacilglicerol e colesterol total. Os grupos alimentados com ração suplementada com triestearato e trioleato apresentaram resultados intermediários para a dosagem de HDL-c, com valores tendendo ao grupo suplementado com tripalmitato. Em relação à dosagem de LDL-c, foi constatada diferença entre os grupos suplementados e o grupo controle. Destaca-se que não houve diferença entre a dosagem entre os grupos suplementados. Portanto, o grupo alimentado com dieta enriquecida com ácido oleico (monoinsaturado) equipara-se aos grupos alimentados com dietas enriquecidas com ácido esteárico e palmítico (saturados). O perfil de ácidos graxos do tecido hepático mostrou uma porcentagem elevada de ácido palmítico no grupo alimentado com ração enriquecida com o mesmo ácido graxo, com diferença estatística em relação aos demais grupos. Já em relação ao ácido esteárico, não houve diferenças significativas entre os grupos. Em compensação, o teor de ácido oleico no grupo suplementado com este mesmo ácido graxo e com ácido palmítico foi significativamente diferente em relação aos demais, com valores superiores. Este resultado demonstra que não houve dessaturação do ácido esteárico a oleico, ao menos neste modelo. No tecido cardíaco, foi observado o mesmo comportamento. No tecido cardíaco não houve diferença estatística significativa da concentração de ácidos graxos, indicando que não houve incorporação ou dessaturação. Ressalta-se que de acordo com determinação realizada utilizando a técnica de cromatografia gasosa, as rações apresentavam em sua composição o teor de lipídios adequado ao modelo animal e as proporções de ácidos graxos alteradas como proposto no objetivo deste trabalho. Em relação às moléculas de adesão e quimiocinas (VCAM-1, ICAM-1, CD-36 e MCP-1) relacionadas com o processo aterosclerótico, houve somente alteração na molécula CD-36 no grupo alimentado com ração enriquecida com trioleato, com redução em relação aos demais. Mas, as moléculas de adesão relacionadas com o processo inicial da aterogênese, a expressão gênica realizada através da técnica de q-RT-PCR não foi relevante, não apresentando diferença entre os tratamentos. Conclui-se, portanto, que os tratamentos aplicados ao modelo animal selecionado possui o potencial de alterar lipoproteínas plasmáticas, mas não de manter a continuidade e desencadear o processo inflamatório relacionado à aterogênese.

Palavras-chave: ATEROSCLEROSE; ÁCIDO ESTEÁRICO; ÁCIDO PALMÍTICO; ÁCIDO OLEICO.

OLIVEIRA, C. J. **“Comparative evaluation of fatty acids, oleic, palmitic and stearic, effects on atherosclerosis biomarkers”**. 2013. 130f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Atherosclerosis is chronic a non-communicable disease considered one of a major cause of morbidity and mortality in several countries, including Brazil. Among all the possible causes of their genesis the dietary habit of high fatty acid intake, especially saturated and trans fatty acids is the most important. Saturated and unsaturated fatty acids possess different biological and physicochemical characteristics. The most abundant fatty acid in the human diet are palmitic and stearic and they association with cardiovascular events has been increasingly investigated, especially those one with more than ten carbons in its chain which interferes in the lipoproteins metabolism and can initiate the atherosclerotic process. The food industry has developed some optional technologies to reduce or eliminate the presence of *trans* fatty acids in foods, in particular elaidic, which after the hydrogenation process increases the saturated fatty acids content. Some industrialized foods requires a large amount of saturated fatty acids that promote an increase of palmitic and stearic content, the last fatty acid mentioned is considered a neutral saturated fatty acid that can contribute to the decrease in HDL-c (High Density lipoprotein), depending on the concentration used, among other deleterious changes. Thus, investigate changes of specifics biological parameters in response to consumption of different saturated fatty acids, respecting the total content of lipids in a normolipidic diet is the aim of this study. Assays were conducted to determine the following parameters in the tissues: 1) Activity of antioxidant enzymes, 2) Lipid peroxidation, 3) Lipidogram; 4) Fatty acid composition 5) Expression of genes related the atherosclerotic process (ICAM-1, VCAM-1, CD36 and MCP-1). The determination of the activity of antioxidant enzymes was carried out considering only the enzymes Catalase (CAT) and Superoxide Dismutase (SOD), because they are enzymes more sensitive and readily available in changes resulted of an atherosclerotic process with endothelial dysfunction. In the study, no changes were observed in activity of these enzymes in the liver and heart. The same biological process that stimulates the overproduction of reactive species can lead to increased lipid peroxidation, especially of polyunsaturated fatty acids present in cell membranes of tissues such as liver, brain and heart. The group fed with diet enriched with tripalmitate showed increased lipid peroxidation compared to control group. Correlating this information with the fatty acid profile in liver tissue, we noted that there was a greater incorporation of palmitic acid, which exhibit linear configuration when incorporated into the cell membrane and can lead to dysfunction and higher susceptibility to damages such as oxidation. No differences were observed in the others tissues analyzed. The lipidogram is the quantification of lipoprotein and lipid fractions, composing the lipid profile in blood plasma. The results

showed that total cholesterol was significantly lower in the control group, as well triglyceride and LDL cholesterol (LDL-c). HDL cholesterol (HDL-C) concentration is reduced and triacylglycerol and cholesterol increased in the group fed with diet supplemented with palmitic. The groups fed with diets supplemented with tristearate and trioleate presented intermediate results for the measurement of HDL-c, with values tending to the group supplemented with tripalmitate. Regarding LDL-c levels, significant differences were observed between the supplemented groups and the control group. Emphasis that there was no difference between the dosage between the supplemented groups. Therefore, the group fed with oleic acid (monounsaturated) supplemented diet equates to the groups fed with diets enriched with stearic and palmitic acid (saturated). The fatty acid profile of liver tissue showed a high percentage of palmitic acid in the group fed with diet enriched with the same fatty acid, with a statistical difference compared to the other groups. In relation to stearic acid, there were no significant differences between groups. As compensation, the oleic acid content in the group supplemented with the same fatty acid and palmitic acid was significantly higher when compared to the others. This result demonstrates that no desaturation of stearic acid to oleic happened in this experimental model. In cardiac tissue there was no statistically significant difference in the concentration of fatty acids, indicating no incorporation or desaturation. Regarding adhesion molecules and chemokines (VCAM-1, ICAM-1, CD-36 and MCP-1) related to the atherosclerotic process, there was only change in the gene expression of CD-36 molecule in the group fed diet enriched with trioleate, with reduction in relation to others. No other alterations were observed. In conclusion, we verified that the consumption of the different fatty acids in this experimental model has potential to alter lipoproteins levels but not to initiate or maintain the inflammatory process associated with atherogenesis.

Key words: ATHEROSCLEROSIS; STEARIC ACID; PALMITIC ACID; OLEIC ACID.

1. Introdução

Já se sabe há muito tempo que a dieta pode influenciar na composição das frações lipídicas plasmáticas e contribuir para o desenvolvimento da aterosclerose. Alguns fatores dietéticos têm influenciado na concentração de colesterol plasmático total. O mais importante de todos esses fatores são os lipídeos da dieta e sua composição em ácidos graxos. Dietas ricas em ácidos graxos insaturados têm sido associadas ao decréscimo da concentração do colesterol plasmático, enquanto que altas ingestões de ácidos graxos saturados e do próprio colesterol têm sido correlacionadas com aumento do colesterol plasmático, concomitante com elevação do risco de doenças cardiovasculares em humanos. O ácido graxo polinsaturado encontrado em maior quantidade é o ácido linoléico. Ele foi classificado como um agente hipocolesterolêmico. Já o efeito do ácido graxo α -linolênico pode ser hipotrigliceridêmico, além de outras funções associadas a ambos (AL-OTHMAN, 2000; UAUY e VALENZUELA, 2000; LOUALA *et al*, 2011).

Hipercolesterolemia é um importante fator de risco para acometimentos cardiovasculares, incluindo a aterosclerose e o tratamento padrão está baseado na diminuição do colesterol plasmático (SHÉRAZÈDE *et al*, 2009).

A IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose define: “aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre.”.

A aterosclerose pode ser desencadeada por fatores modificáveis e não modificáveis. Podem ser citados fatores modificáveis o tabagismo, ganho de peso, sedentarismo e o consumo alimentar.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2007), hábitos alimentares saudáveis e atividade física são comportamentos modificáveis que podem prevenir ou minimizar os riscos de acometimentos cardiovasculares, entre eles a aterosclerose.

Entende-se por hábitos saudáveis na alimentação o consumo adequado de lipídios, limitando a ingestão de ácidos graxos saturados, *trans*, colesterol, dando preferência para ácidos graxos insaturados (poli e mono), aumento no consumo de frutas, hortaliças, grãos integrais e castanhas oleaginosas. Além disso, recomenda-se a redução no consumo de açúcar, seus derivados e cloreto de sódio (OMS, 2007).

Em relação aos ácidos graxos saturados, sua absorção não possui limitação como o colesterol, promovendo um efeito muito mais pronunciado na colesterolemia. Dessa forma, a ocorrência de dislipidemias frente ao consumo de ácidos graxos saturados, torna-se maior. Ácidos graxos saturados possuem a capacidade de interferirem na expressão de receptores hepáticos para absorção e metabolismo da molécula de LDL-c (*Low Density Lipoprotein*). Assim, o aumento da concentração de LDL-c nativa, promove maior suscetibilidade à oxidação. Sabe-se que a LDL-c oxidada compõe um dos eventos iniciais da aterogênese (IV DIRETRIZ BRASILEIRA SOBRE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE, 2007).

De acordo com a RDC 360 da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), há a obrigatoriedade de relatar a quantidade de ácidos graxos *trans* e saturados nos rótulos, estimulado pela recomendação para redução na utilização de ácidos graxos *trans* na indústria alimentícia. A indústria de alimentos vem desenvolvendo algumas tecnologias opcionais para reduzir ou

eliminar ácidos graxos *trans*. Dentre elas a modificação no processo de hidrogenação que aumenta a quantidade de ácidos graxos saturados em detrimento aos ácidos graxos *trans*. Alguns alimentos industrializados necessitam de uma grande quantidade de ácidos graxos saturados para compensar a retirada de ácidos graxos *trans*, já que a proporção benéfica do ponto de vista nutricional seria de 1:1 (um grama de ácidos graxos *trans* por um grama de ácidos graxos saturados) não produz efeito positivo nas características organolépticas dos alimentos (biscoitos, bolos e afins) promovendo um aumento no teor de ácido graxo palmítico e esteárico (GAGLIARDI, MANCINI-FILHO e SANTOS, 2009; HUNTER, 2006).

A substituição de ácidos graxos *trans* tem sido feita utilizando ácido graxo esteárico. Mesmo sendo considerado um ácido graxo saturado neutro, dependendo da concentração utilizada, pode contribuir no decréscimo da HDL-*c* (*High Density Lipoprotein*). As lipoproteínas de alta densidade (HDL) são reconhecidamente anti-aterogênicas. Sua concentração plasmática está inversamente relacionada com acometimentos cardiovasculares. O mecanismo mais explorado para exercer esse papel é a via do transporte reverso de colesterol, que consiste no transporte do colesterol de tecidos periféricos para o fígado, via plasma (PAL, 2009).

HDL pode desempenhar um importante papel antioxidante por inibir a oxidação de fosfolípidos e reduzindo a atividade da LDL modificada. Os componentes da HDL que podem contribuir para essa atividade podem ser a apolipoproteína A1 (apoA-1) e a enzima paraoxanase 1(PON1). É válido ressaltar que a apoA-1 é a principal proteína constituinte da HDL. A PON1 previne a formação de hidroperóxidos lipídicos e fosfolípidos oxidados e os

hidrolisa quando são formados. A apoA-1 mostrou ser capaz de reduzir hidroperóxidos lipídicos na LDL-c, *in vitro*, independente da atividade da PON1 (MACKNESS et al, 2006; ROSENBLAT et al, 2005; GARNER et al, 1998; WATSON et al, 1995).

De forma contraditória, HDL pode apresentar caráter pró-inflamatório e pró-aterogênico, principalmente quando o desencadeamento da resposta inflamatória, seja na fase crônica ou aguda, esteja presente. Em processos inflamatórios já instalados, a HDL demonstra ineficácia em sua atividade antioxidante, além de contribuir com aumento da peroxidação e não evitar o retardo da oxidação da LDL-c (ANSELL et al, 2005).

Baseado nas evidências disponíveis sobre os efeitos biológicos do ácido esteárico, seus efeitos sobre outros marcadores de doenças cardiovasculares, assim como fatores inflamatórios permanecem desconhecidos (KRIS-ETHERTON et al, 2005).

O fator de transcrição NF- κ B está envolvido em várias respostas às injúrias desenvolvendo um papel central na regulação de citocinas envolvidas na patogênese da aterosclerose. Henning et al (2000) utilizando culturas de células, demonstraram a ativação deste fator de transcrição após incubá-las com ácido esteárico.

Evidências de estudos em humanos e animais sugerem que o ácido esteárico eleva a agregação plaquetária *in vivo*, um importante aspecto da aterosclerose (TURPEINEN et al, 1998).

Baer, Judd, Clevidence e Tracy (2004), ao conduzirem um estudo em humanos, observaram o aumento da concentração de fibrinogênio, proteína C-

reativa e IL-6 após consumo de ácido graxo esteárico, sendo os valores comparados ao consumo de ácidos graxos *trans* e ácido palmítico.

O fato de ao ácido graxo esteárico (18:0) ser dessaturado a ácido oléico (18:1), comportando-se como este, não afetando o metabolismo da LDL-c, pode ser um ponto positivo quando se avalia a substituição de ácidos graxos *trans* por ácidos graxos saturados, prioritariamente esteárico (WIJENDRAN et al, 2003; RHEE et al, 1997), mas necessitando de maiores esclarecimentos dessa via.

Valenzuela, Delplanque e Tavella (2011) sugerem que a o ácido esteárico, mesmo sendo um ácido graxo saturado, apresenta baixo nível de absorção devido seu posicionamento na molécula de triacilglicerol, localizado preferencialmente nas posições *sn*-1 e *sn*-3, sendo a posição *sn*-2, com maior absorção preenchida por ácidos graxos insaturados. As lipases encontradas no organismo, hidrolisam as ligações presentes nas posições *sn*-1 e *sn*-3. Quando o ácido esteárico se encontra nessas posições, após a hidrólise pode ocorrer a formação de complexos com sais de cálcio e magnésio, sendo assim excretados. Dessa forma, o ácido esteárico teria uma baixa biodisponibilidade. Os mesmos autores propõem que o ácido esteárico não seria um bom substrato para a enzima ACAT (*Acyl-Cholesterol-Acyl-Transferase*), responsável pela reesterificação do colesterol no intestino. Caso não ocorra a reesterificação do colesterol nos enterócitos, o mesmo é transportado para o lúmen intestinal e excretado. Outro mecanismo citado é a redução da expressão da proteína NPC1L1 (*Nieman-Pick C1 L1*), estimulada pelo ácido esteárico. Esta proteína é responsável pelo transporte do colesterol presente

na luz intestinal para os enterócitos. Assim, ambos os mecanismos contribuiriam para a redução da absorção do colesterol.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Aterosclerose

A maioria das doenças cardiovasculares é proveniente das complicações da aterosclerose.

Atualmente, representa uma das maiores causas de morbi-mortalidade em países desenvolvidos, mas com rápido aumento na incidência na população de países em desenvolvimento (GENG e JONASSON, 2012).

A aterosclerose trata-se de uma enfermidade crônica, inflamatória da parede vascular, de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre. Está associada com aumento do estresse oxidativo e outras causas, tornando sua patogênese muito complexa, tendo de forma resumida seus fatores de risco a dislipidemia, hipertensão arterial, fatores genéticos, gênero e idade. Um dos principais fatores que contribuem para sua gênese é a oxidação de partículas de lipoproteína, principalmente LDL-c, contendo substratos oxidáveis Além disso, caracteriza-se pela infiltração de monócitos com posterior diferenciação a macrófagos (WEISMANN e BINDER, 2012; SHEN *et al*, 2011; WHO, 2007; CATHCART, 2004).

A agressão endotelial pode ser proveniente de alteração no fluxo sanguíneo em artérias de grande calibre, passando de laminar a oscilatório, na presença de estenoses ou curvaturas de grandes vasos (SENEVIRATNE, SIVAGURUNATHAN e MONACO, 2012).

Acredita-se que um dos processos deflagradores da aterogênese seja a passagem da lipoproteína de baixa densidade oxidada (ox-LDL) através da parede vascular. Provavelmente essa passagem é ocasionada nos locais

lesionados pela própria ox-LDL e pode induzir a expressão de moléculas de adesão e fatores quimiotáticos como a MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*) e MCSF (*Macrophage Colony Stimulating Factor*). Todo esse processo conduz a ativação e ligação de monócitos e linfócitos T às células endoteliais. Células endoteliais, leucócitos e células musculares lisas secretam fatores de crescimento e quimiotáticos os quais resultam na migração de monócitos e leucócitos para o espaço subendotelial. A partir do momento que monócitos penetram na camada subendotelial, ocorre a maturação a macrófago que interiorizam lipoproteínas, principalmente ox-LDL (MANDAMANCHI, VENDROV e RUNGE, 2005).

Para interiorizar moléculas de ox-LDL, macrófagos expressam receptores em sua receptores, denominados *scanvegers*, principalmente o receptor CD-36 (BIEGHS *et al*, 2012; KZHYSHKOWSKA, NEYEN, GORDON, 2012).

Os macrófagos possuem capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio, as quais transformam LDL em LDL altamente oxidadas, transformando os macrófagos em células espumosas. Células espumosas associadas a leucócitos formam estrias gordurosas e um processo contínuo com secreção de fator de crescimento induz a migração de células musculares lisas para a camada íntima do vaso sanguíneo. A proliferação de células musculares lisas, associada ao influxo contínuo e propagação de monócitos e macrófagos, converte estrias gordurosas a lesões mais graves e por fim a formação de uma placa fibrosa que se projeta para o lúmen arterial. Posteriormente, poderá ocorrer calcificação dando continuidade à fibrose, gerando uma capa fibrosa. Em episódios coronarianos agudos pode ocorrer a

proliferação de macrófagos com produção de metaloproteases capazes de degradar a matriz celular podendo levar à ruptura da placa com posterior desprendimento de trombos podendo ocluir outros vasos, acarretando episódios secundários como o infarto. (BIEGHS et al, 2012; LIND, OLSÉN e LIND, 2012; PONNUSWAMY et al, 2012; MANDAMANCHI, VENDROV e RUNGE, 2005) ;

A instabilidade da placa aterosclerótica, com posterior ruptura, pode ser ocasionada pela morte de macrófagos em lesões ateroscleróticas avançadas, promovendo o surgimento de um núcleo necrótico (VRIES-SEIMON et al, 2005).

É válido ressaltar que, atualmente, a elevação da molécula de LDL, detectada através de dosagens bioquímicas, por si já pode ser considerada um fator de risco para eventos coronarianos (PONNUSWAMY et al, 2012; VASUDEVAN e GARBER, 2006;).

As características inflamatórias da lesão aterosclerótica foram primeiramente descritas em 1858, pelo patologista alemão Rudolf Vichow. O envolvimento de monócitos/macrófagos, linfócitos T e uma cadeia de produção de agentes inflamatórios e quimiotáticos, deixam claro o grande envolvimento da resposta imune celular e humoral. A resposta imune inata é governada principalmente por monócitos/macrófagos e células dendríticas, sendo os macrófagos apontados como os mais ativos no processo inflamatório. Posteriormente, há estímulo na produção de antígenos aos linfócitos T, localizados principalmente na capa fibrosa, gerando assim a resposta imune adaptativa, que é uma resposta com alto grau de especificidade, capaz de desenvolver uma memória imunológica, principalmente em relação à ox-LDL, mas também para quantidade expressiva de LDL não modificada

(PONNUSWAMY et al, 2012; MOORE e TABAS, 2011; HANSON e HERMANSSON, 2011; HERMANSSON et al, 2010; MANTOVANI et al, 2009)

Macrófagos e linfócitos T ativados dentro e fora da lesão aterosclerótica podem produzir citocinas e fatores de crescimento que desempenham papel fundamental na transdução do sinal pró-inflamatório, citocinas pró-inflamatórias e fatores quimiotáticos. A exposição ao interferon gama (IFN- γ), citocina produzida por linfócitos T, também ativa e induz células endoteliais a expressar altos níveis de moléculas de adesão, as quais promovem maior atração de células mononucleares (monócitos/macrófagos) na lesão vascular. Macrófagos estimulados por IFN- γ tornam-se biologicamente ativados e possuem um aumento na capacidade de expressar citocinas, produzir espécies reativas, migração de maior número de monócitos para o sítio inflamatório, fagocitose do tecido adjacente, todo e qualquer papel crítico na aterogênese. A coexistência de macrófagos e linfócitos T ativados na lesão aterosclerótica proporciona o aumento de síntese de citocinas colaborando para a disfunção endotelial. O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e INF- γ podem sinergicamente induzir expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) levando à síntese de um sinalizador molecular gasoso, óxido nítrico (ON) em grande quantidade em uma variedade de tipos celulares, incluindo células musculares lisas. A elevada produção de ON pode induzir a formação de complexos nitrosos, promovendo disfunção mitocondrial de células musculares lisas, levando à apoptose e colaborando para a desestabilização da placa (GENG e JONASSON, 2012; TEDGUI e MALLAT, 2006; HARVEY e RAMJI, 2005).

A expressão de receptores de membrana por leucócitos, linfócitos e células dendríticas, como *Toll-like receptors* (TLR), está aumentada na placa

aterosclerótica. Esta família de receptores pode afetar diretamente a formação do ateroma, promovendo a absorção de lipídios por macrófagos, contribuindo para formação de células espumosas (*foam cells*) (SENEVIRATNE, SIVAGURUNATHAN e MONACO, 2012).

Figura 1. Resumo do processo aterosclerótico, com migração e diferenciação de monócitos, células musculares lisas e expressão de moléculas de adesão

(SENEVIRATNE, SIVAGURUNATHAN e MONACO, 2012; BIEGHS *et al*, 2012; KZHYSHKOWSKA, NEYEN, GORDON, 2012; SENEVIRATNE, SIVAGURUNATHAN e MONACO, 2012; PONNUSWAMY *et al*, 2012; LIND, OLSÉN e LIND, 2012; WHO, 2007; CATHCART, 2004).

Outro mecanismo envolvido na patogênese da aterosclerose e suas complicações é a disfunção endotelial. Fatores de risco como hiperlipidemia, tabagismo, distúrbios no fluxo sanguíneo e estresse oxidativo são causas conhecidas que podem acarretar a disfunção celular endotelial (MUNZEL, 2008).

A disfunção endotelial está relacionada à redução do ON. A função endotelial depende de sinalização redox, que é mediada pela biodisponibilidade de ON. A redução na biodisponibilidade do ON está associada com o

desenvolvimento do ateroma (KRIEGER et al, 2006). O ON possui função vasodilatadora e na ocorrência da disfunção endotelial, há redução do ON e aumento de fatores de constrição. Como consequência, instala-se a ativação endotelial caracterizada por um meio proinflamatório, com proliferação de células musculares lisas, favorecendo a aterogênese (BONETTI, LERMAN e LERMAN, 2003).

Acompanhando o decréscimo da biodisponibilidade do ON, induzido pela diminuição da eNOS (*endothelial Oxide Nitric Sintase*), há o aumento da produção do ânion superóxido proveniente de fontes como NADPH oxidases, xantina oxidase ou óxido nítrico sintetases desacopladas (KRIEGER et al, 2006).

Os eventos desencadeadores do processo aterosclerótico podem ter início por diversos fatores. Pode-se citar o tabagismo, hipertensão arterial, diabetes *mellitus*, obesidade, dislipidemias e em caráter alimentar, consumo elevado de ácidos graxos saturados, ácidos graxos trans e colesterol (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007).

2.2. Moléculas de adesão ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1), VCAM-1 (Vascular Adhesion Molecule-1), DC-36 e quimiocina MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1)

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, em 2030 cerca de 24 milhões de indivíduos morrerão de enfermidades cardiovasculares. São classificadas como enfermidades cardiovasculares hipertensão arterial e aterosclerose (MACKAY e MENSAH, 2004). Outras enfermidades como dislipidemias, obesidade, diabetes mellitus e hábitos de vida como tabagismo, consumo de ácidos graxos saturados e estresse crônico também estão

correlacionados com o aumento de enfermidades cardiovasculares (ZHANG *et al*, 2010).

Como dito anteriormente, a aterosclerose é caracterizada por uma desordem relacionada com metabolismo do colesterol onde ocorrem degeneração e disfunção endotelial induzida por lipoproteínas oxidadas em artérias de médio e grosso calibre. A disfunção endotelial estimula liberação de citocinas que induzem à formação de moléculas de adesão principalmente para monócitos desencadeando ações do sistema imune (PSARROS *et al*, 2012; PELLO *et al*, 2011). O endotélio saudável, que tem como função ser uma barreira para passagem de moléculas e células, inibe a migração e adesão de leucócitos, não permite a agregação de plaquetas e células musculares lisas, além de inibir a coagulação sanguínea e estimular a fibrinólise (LANDMESSER, HORNIG e DREXLER, 2004).

Para a atuação dos monócitos no endotélio alterado, há a necessidade de ocorrer interação entre diversas estruturas entre elas as selectinas presentes na superfície do monócito e do lúmen endotelial. A L-selectina encontra-se localizada na superfície do monócito enquanto a P e E-selectina localizam-se na luz do endotélio estimulado. A interação das selectinas não indica que haverá uma forte adesão ao endotélio. Para que isso ocorra, os monócitos devem expressar integrinas que irão interagir com moléculas de adesão têm que estar expressas na região endotelial (ICAM-1 e VCAM-1) (BOBRYSHEV, 2006).

De acordo com *Gene Ontology Consortium*, moléculas de adesão são definidas como “moléculas expressas na superfície de células que medeiam a adesão de uma célula a outra célula ou à matriz extracelular”. Moléculas de

adesão intercelular (ICAM) compõem uma sub-família com cinco tipos (ICAM-1 a ICAM-5). A ICAM-1 é expressa normalmente em um nível basal, mas sua expressão aumenta em processos inflamatórios no endotélio e na presença de produtos bacterianos. A ICAM-2 está presente em leucócitos, no endotélio e em plaquetas. A ICAM-3, além de ser encontrada no endotélio e em leucócitos é a única expressa em neutrófilos (BLANKENBERG, BARBAUX e TIRET, 2003). É condição importante a localização apical da ICAM-1 para que haja movimentação dos monócitos no endotélio (HOPKINS, BAIRD e NUSRAT, 2004).

Já a VCAM-1 (Vascular Cellular Adhesion Molecule-1) é induzida por fatores de transcrição em células endoteliais. Liga-se à integrinas específicas e essa interação induz sinalizações celulares com o intuito de induzir mudanças na forma para ser possível a migração de leucócitos (monócitos) para o espaço subendotelial. A ação de enzimas proteolíticas transforma a VCAM-1 em sua forma solúvel e atualmente vem sendo estudada como preditor de risco cardiovascular.

As selectinas proporcionam a atração e o deslocamento de leucócitos (monócitos) sobre o endotélio vascular e sinaliza através da P-SGL1 (P-selectin glycoprotein ligand1) a ativação das integrinas e induz, consequentemente, a ativação de monócitos. A integrina mais importante encontrada na superfície dos monócitos é a VLA-4 (Very Late Antigen-4) ou $\alpha 4\beta 1$ integrina. São as integrinas que proporcionam a ligação entre monócitos e moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM-1). Parece ser mais pronunciado o papel da VCAM-1 na quimiotaxia de monócitos no endotélio vascular. Já ICAM-1 está envolvida no transporte transendotelial de monócitos (MESTAS e LEY, 2008).

As moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 são imunoglobulinas solúveis, podendo ser detectados no plasma humano e possuem receptores com afinidade para leucócitos, dentre eles, os monócitos, além de linfócitos (MASSBERG et al., 2002).

Na resposta às citocinas inflamatórias e presença da ox-LDL a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 está aumentada. Além de serem expressas na superfície endotelial e no espaço intercelular do endotélio vascular, são também encontradas nas células musculares lisas que migram para a placa aterosclerótica. Algumas pesquisas demonstram que grupos populacionais específicos podem expressar menos moléculas de adesão frente às injúrias relacionadas ao seu aumento de expressão ou em condições normais, seja em relação à raça ou idade (CONSTANTS e CONRI, 2006).

ICAM-1 e VCAM-1 são consideradas marcadores das fases iniciais do processo aterosclerótico, já na disfunção endotelial, facilitando a migração de monócitos para o sítio (GALKINA e LEY, 2007; AL-ISA, THALIBA e AKANJIB, 2010).

Atualmente, estudam-se as moléculas de adesão como biomarcadores inflamatórios de risco não somente em indivíduos que apresentam fatores de risco (tabagismo, diabetes, obesidade), mas principalmente em grupos que não se enquadram nesses fatores. Considera-se não somente esses biomarcadores, mas a carga genética do indivíduo. Acredita-se que cerca de 50% dos níveis de ICAM-1 solúvel são hereditários (KRIPA RAMAN et al, 2013).

Essas moléculas de adesão estão presentes nas artérias coronárias e são estimuladas por citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL6

(KLEINBONGARD, HEUSCH e SCHULZ, 2010). Além de serem estimuladas diretamente por citocinas pró-inflamatórias, uma dieta com características aterogênicas pode desempenhar o mesmo papel. Além disso, ox-LDL aumenta a expressão das referidas moléculas de adesão pela ativação da via do NF κ B e pela modificação de fosfolípedes de suas membranas (RAUCH et al, 2007; KAWAKAMI et al, 2006; KARABINA et al, 2006;).

A ICAM-1 tem seu papel como uma possível regulação no recrutamento de monócitos nas áreas de lesão e/ou disfunção. Uma característica destacável é que a ICAM-1 pode ter sua expressão estimulada não somente pela ox-LDL mas também pela forma nativa da lipoproteína (VERNA, GANDA e STEMERMAN, 2006). Estudos *in vitro* demonstram que placas ateroscleróticas que apresentam células musculares lisas expressam ICAM-1 em resposta a citocinas pró-inflamatórias, regulando a migração de monócitos. Assim, ICAM-1 e VCAM-1 regulam a transmigração e retenção das células leucocitárias no interior do tecido (GALKINA e LEY, 2007).

Além da oxidação de estruturas da molécula de LDL, a oxidação da própria molécula de colesterol formando oxisteróis também proporciona o aumento da expressão de moléculas de adesão, tanto VCAM-1 quanto ICAM-1, CD-36 e quimiocinas como MCP-1 definindo o papel de demais produtos da oxidação na aterogênese (LEONARDUZZI et al, 2012).

Kaperonis et al (2006) cita como outro fator preponderante na expressão de moléculas de adesão a alteração do fluxo sanguíneo, principalmente na bifurcação de grandes artérias. Contribui também para a produção de proteoglicanas por células musculares lisas, que podem colaborar para a oxidação de lipoproteínas colaborando ainda mais com o processo inflamatório

da aterosclerose. Ressalta-se que a alteração do fluxo sanguíneo pode ocasionar um turbilhão intenso ou mesmo quando o fluxo é mais lento, situação descrita por Turhan et al (2006).

Quando são desenvolvidos modelos que suprimem a expressão de moléculas de adesão, observa-se que há uma redução no acúmulo de monócitos, bem como áreas de lesão e formação de placas confirmando a correlação dessas moléculas com o processo aterosclerótico (BLANCO-COLIO, 2007).

Ao contrário do endotélio, o epitélio humano é desprovido de moléculas de adesão em condições normais. Em resposta à exposição a citocinas inflamatórias como $INF\gamma$, $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ e $IL-6$ principalmente na luz intestinal. Além disso, pode ocorrer interação entre moléculas de adesão e patógenos para a progressão de enfermidades (HOPKINS, BAIRD e NUSRAT, 2004).

Em relação ao CD-36 é um receptor que apresenta muitas funções. Encontra-se na superfície de monócitos e macrófagos como um receptor de ox-LDL e também como receptor de ácidos graxos em adipócitos. Ressalta-se que monócitos diferenciam-se em macrófagos após internalização na camada subendotelial. Dessa forma, desempenha um papel chave nos acometimentos cardiovasculares e outras enfermidades. Na aterosclerose, CD-36 é responsável pela internalização de ox-LDL por macrófagos, atuando como *scavengers*, resultando na formação de células espumosas, dando origem as estrias gordurosas, colaborando para o início da formação do ateroma (FEBBRAIO e SILVERSTEIN, 2007; STEWART e NAGARAJAN, 2006).

O processo de influxo de ox-LDL colabora não somente para a formação de células espumosas, mas para o acúmulo de colesterol e pequenas

quantidades de lipídios no citosol. A internalização de ox-LDL agrava o caráter de estresse oxidativo de macrófagos levando ao aumento da síntese de mediadores pró-inflamatórios como TNF, MCP-1 e interleucinas, como por exemplo, IL-6 (MOONEY, McCARTHY e BELTON, 2012). Em enfermidades como a aterosclerose há evidências que a peroxidação lipídica aumenta, incluindo fosfolípidos presentes na molécula LDL-c (BOCHKOV et al, 2010). As investigações atualmente focam em como os fosfolípidos oxidados influenciam na adesão de monócitos/macrófagos. A molécula de ox-LDL aumenta a liberação de CCL23, um membro da família de quimiocinas CC. A CCL23 estimula a migração de células humanas THP-1, uma linhagem de células monocíticas, além de integrina, uma molécula de adesão da superfície de monócitos. Isto indica que a CCL23 possui papel importante no desenvolvimento da aterosclerose, influenciada por lipídios oxidados na LDL-c (GREIG, KENNEDY e SPICKETT, 2012).

Os lipídios oxidados têm sido reconhecidos como estimuladores de receptores de membrana com função *scavenger*, como o CD-36, bem presente em humanos quanto em modelos animais (FEBBRAIO, HAJJAR e SILVERSTEIN, 2001). O CD-36 é reconhecidamente o receptor primário envolvido na internalização, por macrófagos, de fosfolípidos modificados e ox-LDL, com papel expressivo na aterogênese (GREIG, KENNEDY e SPICKETT, 2012; SENEVIRATNE, SIVAGURUNATHAN, MONACO, 2012;).

CD-36 quando localizado na membrana de monócitos desempenha um papel crucial na regulação de citocinas pró e anti-inflamatórias. Já em macrófagos, regula a inflamação de modo localizado tanto citocinas pró quanto anti-inflamatórias (HU et al, 2011).

Uma das vias de regulação do aumento da expressão de CD-36 é através de PPAR/RXR (Retinoid X Receptor), que pode ser estimulada justamente pelo aumento da concentração de ox-LDL e dessa forma alimentar o ciclo contínuo de influxo de ox-LDL em macrófagos. (NAGY, CZIMMERER e NAGY, 2012; ZAMORA et al, 2012; SHIE et al, 2009).

A característica fundamental que torna o CD-36 como um eficiente receptor de membrana é a cauda terminal de sua estrutura que promove a internalização eficiente da molécula de ox-LDL, sendo decisivo para a eficiência da via não somente de transporte mas da degradação desta molécula. O papel do CD-36 na absorção de ox-LDL e sua contribuição na aterogênese fica bem evidenciado quando são utilizados modelos onde este receptor “scavenger” é suprimido, prejudicando a formação de células espumosas e consequentemente, inibindo a aterogênese (KZHYSHKOWSKA, NEYENC e GORDON, 2012).

A MCP-1, também conhecida por CCL-2 (CC Chemokine Ligand-2), foi inicialmente identificada inicialmente a partir da linhagem de células mielomonocíticas como Fator Quimiotático de Monócitos (Monocyte Chemotactic Factor), sendo rapidamente produzida em resposta a indução por interleucina-1 (IL-1) e TNF. É caracterizada por conservar quatro resíduos de cisteína formando pontes dissulfeto entre as moléculas para estabilização (GUPTA, CHATURVEDI e JAIN, 2013; PANEE, 2012).

A atração de monócitos para sítios inflamatórios localizados no espaço subendotelial vascular é estimulada pela MCP-1, dando início a migração de monócitos para a parede da artéria, sendo precursores de macrófagos que

poderão gerar células espumosas na presença de ox-LDL (PIEMONTI et al, 2009; DEO et al, 2004; DE LEMOS et al, 2003).

Aumento da MCP-1 foi encontrado associado com complicações da aterosclerose incluindo acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio e mortalidade por doença cardiovascular relacionada com obesidade, mas não em indivíduos eutróficos (TRETJAKOV et al, 2009; ARAKELIAN et al, 2005).

Por ser potente quimiotático de monócitos/macrófagos, a MCP-1 acaba desempenhando um papel crucial nas enfermidades cardiovasculares já que macrófagos são capazes de secretar inúmeras enzimas proteolíticas que degradam a matriz extracelular da capa fibrosa protetora gerando instabilidade do ateroma (ARYA et al, 2012).

Em geral, níveis de MCP-1 são inversamente proporcionais aos níveis de HDL-c e positivamente relacionados aos níveis de proteína-C reativa (CRP), estando fortemente correlacionado com a predição de risco cardiovascular. Além desta correlação, fica evidenciado em estudos que a HDL-c possui a capacidade de atenuar a secreção de quimiocinas como a MCP-1, interferindo no processo inflamatório que alimenta a aterogênese (MARSCHE et al, 2013; JULVE et al, 2010; KIM et al, 2006).

Potencialmente, a MCP-1 tem se mostrado ser um possível biomarcador aterogênico, sendo considerado um alvo para intervenções terapêuticas a ser explorado (LINIC, 2013).

Se uma dieta tipicamente aterogênica leva a um quadro inflamatório, alguns alimentos, nutrientes e compostos alimentares podem exercer um papel inverso. Polifenóis presentes no azeite de oliva, nozes e castanhas mostraram eficiência em reduzir citocinas pro-inflamatórias e moléculas de adesão,

interferindo na redução da ativação do fator de transcrição NF κ B (URPI-SARDA et al, 2012).

Outro nutriente que pode estar envolvido na supressão de citocinas pró-inflamatórias e consequentemente moléculas de adesão relacionadas com o processo aterogênico é o selênio. Esse micronutriente exerce seu papel através de selenoproteínas como a enzima glutathione peroxidase que auxilia na prevenção da peroxidação lipídica que leva a formação de hidroperóxidos capazes de ativar o fator de transcrição NF κ B. A peroxidação lipídica pode ocorrer inclusive na molécula de LDL. Além disso, a diminuição da biodisponibilidade de selênio está relacionada com o aumento da adesão de neutrófilos na região endotelial e seu déficit prejudica a defesa antioxidante geral do organismo (ZHANG et al, 2002).

Durante o processo de migração e adesão de monócitos, a participação de ICAM-1 e VCAM-1 é ativa e inquestionável. Como possível agente de inibição indireta de moléculas de adesão, mas direta de TNF- α , o licopeno (carotenoide proveniente do tomate) tem mostrado potencial para esta ação. Hung et al (2008) demonstraram que há uma possível atuação do licopeno na inibição do TNF- α , com consequente redução na expressão ICAM-1 e VCAM-1 em nível transcricional.

Compostos considerados não convencionais, como a própolis, podem contribuir para a redução de lesões ateroscleróticas bem como a interrupção da aterogênese. Daleprane et al (2012) demonstrou que os polifenóis contidos na própolis inibiram a progressão da aterosclerose e redução na expressão de moléculas de adesão como VCAM-1 e CD-36, indicadores claros de lesão aterosclerótica.

Outro polifenol, hidroxiestilbeno resveratrol ou simplesmente resveratrol, é um composto natural encontrado em altas concentrações em uvas escuras (vermelhas ou roxas) possui propriedades cardioprotetoras, sendo vasoprotetor e antioxidante. Dessa forma, também é capaz de regular a expressão de genes relacionados com citocinas pró-inflamatórias. Resveratrol tem sido considerado um inibidor da expressão de ICAM-1, via supressão de $\text{TNF-}\alpha$, por bloquear a ativação do $\text{NF}\kappa\text{B}$ (WUNG et al, 2005).

Estudos têm demonstrado que a vitamina D ($1,25(\text{OH})_2 \text{D}$) é capaz de suprimir o estresse no retículo endoplasmático induzido por macrófagos. Isto leva à diferenciação dos macrófagos e previne a formação de células espumosas através da supressão de CD-36, sugerindo que a vitamina D promove o fenótipo de um macrófago anti-aterogênico (RIEK, OH e BERNAL-MIZRACH, 2013).

Os compostos encontrados no café comum e descafeinado (cafeína, ácido clorogênico, cafestrol, trigonelina) mostraram habilidade para reduzir $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 e MCP-1 (FROST-MEYER e LOGOMARSINO, 2012).

2.3. Ácido oléico

Os ácidos graxos $\omega 9$ (ômega nove) cis são denominados ácidos graxos monoinsaturados (MUFA's), com uma única dupla ligação. São considerados hipocolesterolêmicos, mas com menor potencial que os ácidos graxos polinsaturados. Eles têm sido associados à melhora na sensibilidade à insulina e maior resistência às modificações oxidativas (VASSILIOU et al, 2009; CHONG, SINCLAIR e GUYMER, 2006).

Em relação aos MUFA's, especificamente o ácido oléico, da família $\omega 9$, sua importância está atrelada à Dieta do Mediterrâneo. O interesse pela Dieta

do Mediterrâneo vem crescendo ao longo dos anos devido ao fato do consumo alimentar na região mediterrânea ter sido ligado a longevidade, aumento da qualidade de vida, menor incidência de doenças cardiovasculares e outras enfermidades não transmissíveis e menor declínio cognitivo. Tradicionalmente, os benefícios de dietas ricas em MUFA's foram ligados aos efeitos sobre o metabolismo de lipoproteínas e em menor extensão, a outros fatores de risco. Mas atualmente se identificou que existe um conjunto de outros benefícios sobre os mecanismos de trombogênese e aterogênese (URPI-SADA et al, 2012; PAPAGEORGIOU et al, 2011; PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2006).

As principais fontes de ácido graxo oléico são as nozes e o azeite de oliva, sendo que este último possui em sua composição cerca de 80% deste ácido graxo. Preferencialmente o azeite extra virgem deve ser consumido, já que o refino retira outras substâncias que colaboram com o potencial benéfico deste produto (BULLO, LAMUELA-RAVENTOS e SALAS-SALVADO, 2011; RAMOS e RAMOS, 2005).

O ácido oléico, em diversos estudos, apresentou um efeito benéfico na substituição de ácidos graxos saturados. A substituição de 5% de ácidos graxos saturados por ácido oléico, em uma dieta isocalórica, reduziu o risco de doença coronariana entre 20 e 40%, principalmente promovendo redução de LDL-c (LOPEZ-HUERTAS, 2010).

Um raro evento que pode desencadear o processo aterogênico, independente da instalação de dislipidemia, é o elevado nível de lipoproteína rica em triacilgliceróis (TAG). Os TAG não necessitam ser oxidados para ser fagocitado e contribuir para a aterogênese. Assim como qualquer triacilglicerol, esta molécula sofre hidrólise, liberando ácidos graxos contidos em sua

estrutura. Entre esses ácidos graxos está o ácido oleico e a ele sendo atribuído uma contribuição entre o balanço pró-inflamatório e anti-inflamatório (SCHWARTZ e REAVEN, 2011). Evidências sugerem que moléculas de adesão vascular e intracelular apresentam valores diminuídos em indivíduos saudáveis ou hipertensos, acompanhados de hipertrigliceridemia (PACHECO et al, 2008).

Sala-Vila et al (2011) em seus experimentos demonstraram que indivíduos que consomem fontes de ácido oleico, com alta proporção deste ácido graxo, possuem uma menor associação com resistência à insulina e seus efeitos deletérios. Resistência à insulina normalmente é encontrada em indivíduos com sobrepeso e obesidade, hipertrigliceridemia e redução de HDL-c em comparação a indivíduos que não apresentam resistência insulínica. O relaxamento vascular está frequentemente comprometido neste quadro, sendo considerado um pré-requisito para aterogênese (PARK et al, 2003).

Em contraposição aos benefícios, o ácido oléico pode induzir a proliferação de células musculares lisas, contribuindo para a disfunção endotelial. Células incubadas com soluções de ácido oleico foram capazes de expressar mRNA (Ácido desoxirribonucleico-mensageiro) de endotelina 1, que é definida como um peptídeo derivado do endotélio com forte efeito vasoconstritor e de proliferação celular, sendo um antagonista do óxido nítrico, contribuindo para a disfunção endotelial, provavelmente pela via de sinalização envolvendo PKC, MAPK e NF- κ B (PARK et al, 2003; LU et al, 1996).

2.4. Ácidos graxos saturados

A substituição do consumo de ácidos graxos saturados por ácidos graxos insaturados tem sido recomendada há décadas para a prevenção de doenças cardiovasculares (KRITCHEVSKY, 1998).

Desde 1957, em estudo conduzido por *Ance! Keys* demonstrou ácidos graxos saturados são associados ao aumento da concentração plasmática de colesterol (KEYS, ANDERSON e GRANDE, 1957). Populações que consomem altas taxas de ácidos graxos saturados têm alta incidência de acometimentos cardiovasculares (SUN et al., 2011).

Uma análise de consumo individual de ácidos graxos mostrou que ácidos graxos saturados compostos por doze a dezoito carbonos podem ser considerados como um alto fator de risco de doença cardiovascular (HU et al, 1999).

Ácidos graxos provenientes da dieta, durante seu metabolismo, são incorporados por quilomícrons remanescentes. Quilomícrons remanescentes ricos em ácidos graxos saturados são mais rapidamente internalizados por macrófagos, podendo resultar no desencadeamento do processo aterosclerótico (BOTHAM et al, 2005; YU, e MAMO, 2000).

Lipase lipoprotéica (LPL) presente na parede arterial pode quadruplicar a internalização de LDL-c por macrófagos (RUMSEY et al, 1992). Uma dieta rica em ácidos graxos saturados foi associada ao aumento de LPL na parede arterial, contribuindo para a instalação de um quadro aterosclerótico (CHANG et al, 2009; SEO et al, 2005; SEO et. al, 2002).

O consumo de ácidos graxos e colesterol têm efeito sobre a expressão de vários genes hepáticos, entre eles a família de ativadores de enzimas SREBP (*Sterol Regulatory Element Binding Proteins*). A SREBP2 está

relacionada com a síntese de colesterol e com a expressão de receptores hepáticos para o colesterol. Quando há consumo de ácidos graxos saturados, esses são considerados substratos pobres para a esterificação do colesterol hepático, o que pode levar à redistribuição do colesterol nas células. Dessa forma, há a regulação da maturação da SREBP2 pelo colesterol livre, levando ao seu decréscimo (VALLIM e SALTER, 2010).

Outro mecanismo para o acréscimo da LDL-c plasmática é a aceleração da síntese de VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) tanto enteral quanto hepática. Ácidos graxos saturados, em especial o palmítico, estimulam a hipersecreção de triglicérides e colesterol através da VLDL hepática. Como se sabe, partículas VLDL ao serem secretada pelos hepatócitos atingem a circulação sanguínea e nos tecidos periféricos, sofrendo ação da lipase lipoprotéica presente no endotélio dos capilares. Dessa forma, sofrem remoção de triacilgliceróis, transformando-se em remanescentes de VLDL, as IDL (*Intermediary Density Lipoprotein*). Parte de IDL é removida da circulação e outra permanece por mais tempo na circulação e sofre ação da lipase hepática, originando LDL. Na ausência ou redução dos receptores hepáticos para LDL, esta permanecerá circulante sujeita à oxidação, contribuindo para a gênese do processo aterosclerótico (KURUSHIMA et al, 1995; OTHANI et al, 1990).

Células musculares lisas são componentes que fazem parte da placa aterosclerótica. Quando incubadas com ácidos graxos saturados, proliferam podendo contribuir para a instabilidade do ateroma (SUDHEENDRAN, CHANG e DECKLBAUM, 2010; BERMUDEZ et al, 2008).

Os ácidos graxos saturados mais abundantes na alimentação humana são o ácido palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0). O ácido palmítico pode ser

sintetizado no organismo a partir de carboidratos ou através de produtos de oxidação de triglicerídeos (ácidos graxos). A partir do ácido palmítico, outros ácidos graxos podem ser sintetizados, incluindo o ácido esteárico (ERKKILÄ et al, 2008). Além disso, o ácido palmítico é o ácido graxo mais abundante no plasma (STENTZ e KIBABCHI, 2006).

Já como referência alimentar, o óleo de palma talvez seja a fonte mais expressiva de ácido palmítico, enquanto a manteiga de cacau é uma fonte rica de ácido esteárico (DUSSERT et al, 2013; THOLSTRUP, TANG e RAFF, 2011; KARUPAIAH, 2011; NG, LIM e BOEY, 2003).

O ácido palmítico é considerado um ácido graxo hipercolesterolêmico (SUGANO e IMAIZUMI, 1995). Também está envolvido no processo de ativação e linfócitos T, peroxidação lipídica e expressão de E-selectina (molécula de adesão endotelial) quando incubado com células epiteliais aórticas, onde foi observada ativação da proteína C quinase (moduladora) e consequente elevação de diacilgliceróis (STENTZ e KIBABCHI, 2006).

Aumento da atividade da colesterol ester transferase pode interferir na passagem de ésteres de colesterol da partícula de VLDL ou LDL para a de, com consequente remodelamento da molécula de HDL-c e catabolismo de seu receptor APO A1, sendo todo este processo influenciado pelo ácido palmítico (PÉREZ-MENDÉZ et al, 2007).

O ácido palmítico é capaz de induzir a apoptose das células progenitoras epiteliais, possivelmente através da via de ativação da p38MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), que desenvolve um papel central no controle do estresse e resposta inflamatória. As células epiteliais progenitoras contribuem para a reconstituição do endotélio vascular. A disfunção das células epiteliais

progenitoras desempenham um importante papel nas complicações trombóticas, ateroscleróticas e outros acometimentos cardiovasculares (JIANG et al, 2010).

Outra causa indutora da apoptose de células cardíacas estimulada pela sobrecarga de ácido palmítico, é o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, agravado pelo quadro de hiperglicemia. Esta via pode ser controlada por um conjunto de proteínas da família Bel-2 que pode promover ou prevenir a apoptose (GOSH et al, 2004).

O ácido palmítico pode estar envolvido no desenvolvimento da aterosclerose através de ação direta sobre o endotélio vascular inibindo a óxido nítrico sintase endotelial, prejudicando a vasodilatação e promovendo a adesão de monócitos. A sinalização pró-inflamatória exercida pelo ácido palmítico inclui a produção de citocinas como TNF- α e interleucina 6 (IL6). Além disso, induz à expressão de receptores para internalização de oxLDL, como CD36 e LOX-1 (*Lectin-like Oxidized LDL receptor-1*) (ISHIYAMA et al, 2010).

A lipotoxicidade do ácido palmítico pode ocasionar estresse do retículo endoplasmático interferindo na síntese de proteínas, apoptose celular incluindo pré-adipócitos, células β pancreáticas, células ovarianas, cardiomiócitos, hepatócitos e neurônios. O mecanismo envolvido está atrelado ao estresse oxidativo, que altera a permeabilidade da membrana mitocondrial, alteração da morfologia do retículo endoplasmático, culminando com o estresse do retículo (KATSOULIERIS et al 2009).

O ácido esteárico, dentre os saturados, possui uma predileção para a produção de gorduras via interesterificação por, supostamente, não afetar a colesterolemia (TUOMASJUKKA, VIITANEN e KALLIO, 2009).

Estudos epidemiológicos sugerem que o aumento no consumo de lipídios na dieta aumenta de modo significativo o risco de desenvolver doença de Alzheimer e o grau de saturação é um determinante no aumento desse risco, devido a elevação da fosforilação da proteína, levando a quebra do citoesqueleto de neurônios, conduzindo à degeneração tecidual. Dietas ricas em ácidos graxos saturados, incluindo o ácido esteárico, estimulam o cérebro a aumentar a absorção de ácidos graxos livres do plasma através da barreira hematoencefálica (PATIL e CHAN, 2005).

Ácido esteárico, mesmo sendo considerado um ácido graxo saturado neutro, dependendo da concentração utilizada, pode contribuir no decréscimo da HDL-c (KRIS-ETHERTON et al, 2005). Além do mais, pôde-se observar que a agregação plaquetária mostrou-se potencializada, *in vitro*, na presença de ácido esteárico, devido a indução da produção de tromboxano A₂ (TxA₂), potente agregador plaquetário (MUSTAD et al, 1993).

Estudo em humanos demonstrou o aumento da concentração de fibrinogênio, proteína C-reativa e IL-6 após consumo de ácido graxo esteárico, sendo os valores comparados ao consumo de ácidos graxos *trans* e ácido palmítico (BAER et al, 2004).

Henning et al (2000) utilizando culturas de células, demonstraram a ativação do fator de transcrição NF-κB após incubá-las com ácido esteárico. O fator de transcrição NF-κB está envolvido em várias respostas às injúrias desenvolvendo um papel central na regulação de citocinas envolvidas na patogênese da aterosclerose.

Evidências de estudos em humanos e animais sugerem que o ácido esteárico eleva a agregação plaquetária *in vivo*, um importante aspecto da aterosclerose (TURPEINEN et al, 1998).

Em contra partida, ácido esteárico apresentou efeito neuroprotetor *in vitro*, durante privação de oxigênio e glicose por bloquear os receptores de aminoácidos com funções excitatórias (WANG et al, 2006).

De acordo com Pan et al (2010), em injúrias hepáticas de várias origens, o ácido esteárico sugere efeito protetor, com estímulo a produção de compostos anti-inflamatórios, como IL10 (interleucina 10).

No mesmo estudo onde Mustad (1993) discorre brevemente sobre o poder de adesão plaquetária induzida pelo ácido esteárico, seus resultados demonstraram que o ácido esteárico pode induzir a diminuição da síntese de tromboxano A₂.

Hunter et al (2000) utilizaram dietas com diferentes ácidos graxos, em humanos. Neste trabalho, não houve nenhuma alteração em componentes capazes de induzir a agregação plaquetária.

2.5. Metabolismo de ácidos graxos

Os ácidos graxos na dieta humana encontram-se em sua maioria na forma de triacilgliceróis, que são moléculas apolares formadas por três ácidos graxos unidos ao glicerol através de ligação éster. Os ácidos graxos comumente encontrados nos triacilgliceróis são os de cadeia longa, sendo os saturados palmítico e esteárico, ácido oleico como insaturado e o ácido linoleico como polinsaturado. (SANT'ANA, 2004)

Produtos ricos em ácidos graxos saturados comumente apresentam textura sólida à temperatura ambiente. Já os ricos em ácidos graxos insaturados (mono ou poli) se apresentam na forma líquida.

Comumente, o total de óleos e gorduras consumidos em uma dieta é denominado de lipídios.

O fígado desempenha o principal papel na regulação da disponibilidade de lipídios para outros tecidos corporais modulando sua síntese. É o principal local da síntese de colesterol e triacilgliceróis (TAG). A síntese de TAG é amplamente regulada pela disponibilidade de ácidos graxos. Quando o suprimento de ácidos graxos supera a mobilização dos mesmos, o fígado é capaz de estocar grandes quantidades de ácidos graxos, armazenados na forma de TAG (VALLIM e SALTER, 2010).

Depois de consumidos, os lipídios são clivados inicialmente no estômago a partir da ação da lipase lingual e lipase gástrica, além da influência da ação mecânica. A lipase lingual atua sobre a ligação éster da posição três da molécula de glicerol, com preferência para ácidos graxos de cadeia média, dando origem a diacilglicerol e ácido graxo livre. O sítio de melhor atuação dessa enzima é o estômago. Uma característica da lipase lingual é sua afinidade aos triacilgliceróis, pois apresenta baixa solubilidade em meio aquoso (KULKARNI e MATTES, 2013; STEWART et al, 2010).

No estômago há a atuação da lipase gástrica, produzida pela mucosa gástrica e apresenta papéis similares à lipase lingual, inclusive na clivagem de ácidos graxos sitiados na posição três do glicerol. Possui ação exclusiva sobre triacilgliceróis, não agindo sobre ésteres de colesterol e fosfolípides. Essa é a

enzima com maior atuação na digestão gástrica de lipídios (KAWAI e FUSHIKI, 2003; DeNIGRIS et al, 1988; DeNIGRIS et al, 1985; LEVY et al, 1981) .

Os movimentos gástricos são essenciais para promover a emulsificação dos ácidos graxos facilitando, assim, a ação das enzimas duodenais por aumentar a superfície de contato. O resultado da mistura do suco gástrico, enzimas e alimentos é denominado quimo. O quimo após atingir o duodeno, passa a sofrer ação de sais biliares provenientes da bile, que também possui alto teor de fosfolípidos (principalmente fosfatidilcolina). A bile possui a capacidade de intensificar o processo de emulsificação. A formação de uma emulsão auxilia na aumento de área de contato para ação de enzimas pancreáticas que atuam na digestão lipídica (GUERRA et al, 2012; FLANIGAN et al, 2008; KURBEL, KURVEL e VCEV, 2006; CAMILLERI, 2006).

São listadas três enzimas que possuem importante ação no duodeno: lipase pancreática, colesterol esterase, e fosfolipase A₂.

A lipase pancreática é secreta por células acinares do pâncreas exócrino, mas na forma inativa (zimogênio) e torna-se ativa no duodeno com a ação da tripsina. A lipase pancreática é a principal enzima que atua na digestão duodenal dos lipídios e necessita de meio alcalino para ter seu ponto ótimo de ação. Essa enzima atua nas ligações um e três, dando origem a uma molécula de 2-monoacilglicerol e ácidos graxos livres (KELLER et al, 2011; XIAO et al, 2011).

A bile atua sobre os ácidos graxos para a formação de micelas ricas em ácidos graxos, sais biliares e fosfolípidos. A concepção de micelas é necessária para facilitar a absorção junto à borda em escova já que há presença de uma camada estacionária de água sobre essa camada,

dificultando a absorção de ácidos graxos não emulsificados e incorporados em micelas. As micelas são capazes de penetrar a fase estacionária de água.

Já os fosfolípidos provenientes da bile são hidrolisados pela fosfolipase A₂, que atua sobre a posição dois da molécula de glicerol para a liberação de ácidos graxos que também situam nos fosfolípidos da membrana celular (ROSA e RAPAPORT, 2009; SCHALOSKE e DENNIS, 2006; KUDO e MURAKAMI, 2002).

Os monoacilgliceróis e os ácidos graxos de cadeia longa são absorvidos através de micelas na borda em escova e após sua interiorização nos enterócitos, são conduzidos ao retículo endoplasmático liso para a síntese de triacilgliceróis. Há uma família de pequenas proteínas que promovem o transporte de ácidos graxos no espaço citosólico. São denominadas proteínas ligantes de ácidos graxos, mais comumente denominadas FABP (fatty acid binding protein). Essas proteínas têm como uma de suas funções a manutenção de estoques de ácidos graxos de cadeia longa intracelulares para serem metabolizados em organelas como o retículo endoplasmático liso, protegem a membrana celular contra a ação detergente de altas concentrações de ácidos graxos não esterificados, são moduladores do crescimento e diferenciação celular. A afinidade dessas proteínas é alta para o ácido palmítico, oleico e esteárico (LOCKWOOD et al, 2003; STORCH e THUMSER, 2000).

No retículo endoplasmático liso ocorre a ressíntese de triacilgliceróis a partir da reação de acilação dos monoglicerídeos, onde é formada uma ligação tio éster (rica em energia) entre o grupo carboxila do ácido graxo e o grupo sulfidril da coenzima A. Uma das características importantes dos

triacilgliceróis é que durante sua ressíntese no enterócito são incorporados principalmente ácidos graxos de cadeia longa. Após a ressíntese, os triacilgliceróis são incorporados às lipoproteínas (CAO et al, 2004).

Outra via que deve ser considerada para a ressíntese de triacilgliceróis no retículo endoplasmático liso é a via do ácido fosfatídico. Nessa via, o glicerol-3-fosfato recebe um grupamento acil, dando origem ao ácido fosfatídico, o qual é hidrolisado originando um diacilglicerol. A molécula de diacilglicerol sofre ação de enzimas específicas sendo assim convertida a triacilglicerol. A via do ácido fosfatídico encontra-se mais ativa no período de jejum (ALVES-BEZERRA e GONDIM, 2012; LEWIN e COLEMAN, 2003).

A associação de triacilgliceróis, ésteres de colesterol, colesterol com apolipoproteínas de diversas famílias e fosfolípidos ocorrem em compartimentos no retículo endoplasmático liso do enterócito, sendo as principais VLDL e os quilomícrons. Os triacilgliceróis são incorporados às apolipoproteínas e outras biomoléculas como fosfolípidos e colesterol dando origem às lipoproteínas. Os ácidos graxos provenientes de triacilgliceróis, em geral, são destinados para a síntese de quilomícrons (nascentes) e os derivados de fosfatidilcolina (fosfolípido) estão relacionados com a formação de VLDL (KINDEL, LEE e TSO, 2010).

A absorção aumentada de triacilgliceróis estimula o aumento da síntese de quilomícrons enquanto que a absorção de colesterol influencia a concentração de VLDL. Para atingir a circulação sanguínea, as lipoproteínas formadas no retículo endoplasmático liso migram para o complexo de Golgi, sendo armazenadas em vesículas. As vesículas possuem a capacidade de migrarem para a membrana basolateral do enterócito. É válido ressaltar que

não há combinação de VLDL e quilomícrons em uma mesma vesícula. As lipoproteínas são liberadas no espaço intercelular e atravessam a membrana basal atingindo o sistema linfático até o ducto torácico, passando para a circulação sanguínea (BUHMAN et al, 2002).

A via que contempla o transporte dos ácidos graxos em qualquer uma de suas formas do intestino para o fígado é denominada via exógena. Na via exógena, os ácidos graxos sofrem ação da lipase pancreática e lipase intestinal sobre as micelas formadas no processo digestivo, facilitando sua absorção. Já na fase pós-absortiva, ácidos graxos de cadeia média e curta são transportados diretamente ao plasma, conjugados à albumina, diferente de ácidos graxos de cadeia longa que necessitam ser re-esterificados a triacilgliceróis para serem transportados por lipoproteínas, especificamente os quilomícrons (IQBAL e HUSSAIN, 2009).

Assim, os quilomícrons sofrem ação da enzima lipase lipoprotéica (LPL) que hidrolisa os triacilgliceróis presentes nessa lipoproteína, dando origem a ácidos graxos, que podem ir para tecidos periféricos ou serem reesterificados, e glicerol. Além do mais, realiza um processo de câmbio de componentes de sua superfície com os de outras lipoproteínas, principalmente com HDL, incorporando algumas apolipoproteínas. Ressalta-se que algumas das apolipoproteínas incorporadas estimulam a síntese da LPL por adipócitos. Ao longo da circulação dos quilomícrons (sentido capilar-célula), o mesmo diminui sua concentração de TAG, aumenta a presença de apolipoproteínas, dando origem aos quilomícrons remanescentes, que são interiorizados por hepatócitos dando fim a via exógena (SAHADE et al, 2012; FERNANDES et al, 2012).

Já a via endógena, apresenta o transporte do fígado para tecidos periféricos. Esse transporte é executado por proteínas transportadoras, lipoproteínas e albumina. A albumina possui a função de transportar ácidos graxos não esterificados provenientes do tecido adiposo. Já as lipoproteínas (VLDL, HDL e LDL) transportam ácidos graxos na forma esterificada (TAG, CE, FL, principalmente) (BRUNALDI, HUANG e HAMILTON, 2010; CUPP, KAMPF e KLEINFELD, 2004).

A principal forma de transporte na via endógena é através da VLDL, que é formada no fígado, secretada para a circulação pelos hepatócitos. Na circulação recebe em sua superfície apo CII, proveniente da HDL. Já nos tecidos periféricos, os TAG da VLDL sofrem ação da LPL endotelial dos capilares, ao mesmo tempo em que recebe apo E, tornando-se remanescentes de VLDL, denominadas IDL (Intermediate Density Lipoprotein). A IDL tem parte removida pelos hepatócitos e a outra permanece na circulação sofrendo ação da lipase hepática dando origem a LDL (HODSON, SKEAFF e FIELDING, 2008).

As vias de transporte de ácidos graxos proporcionam a liberação dos mesmos para que possam exercer suas funções, dentre elas o provimento de energia.

Uma das principais funções dos ácidos graxos é a produção de energia a partir de processos oxidativos. Como descrito anteriormente, os ácidos graxos são liberados do tecido adiposo ou dos alimentos ingeridos através de lipólise e clivagem de triacilgliceróis. A partir de sua liberação e transporte plasmático, os ácidos graxos são transportados para o interior das células por

proteínas específicas, além do transporte citossólico por outras proteínas ligadoras (YEN et al, 2005).

A função que o ácido graxo desempenhará em sua oxidação dependerá do local onde for oxidado. Na maioria dos tecidos periféricos, tecido muscular e cardíaco, sua função é prioritariamente energética direta. Já no fígado, a produção de energia indireta ocorre pela formação de corpos cetônicos e seus precursores que serão conduzidos pela circulação, principalmente no estado de jejum.

A oxidação de ácidos graxos ocorre por três vias principais: a α -oxidação, β -oxidação e a ω -oxidação.

Durante a α -oxidação há a retirada somente de um átomo de carbono do grupamento terminal carbonila do ácido graxo. Esse tipo de oxidação ocorre pra metabolizar ácidos graxos que não são metabolizados pela β -oxidação e produção de precursores de esfingolípides. Os ácidos graxos que sofrem esse tipo de oxidação necessitam ter grupamentos removidos para poderem sofrer ação de enzimas específicas da β -oxidação (BORGE, SLINDE e NILSON, 1997).

A β -oxidação é a principal via de oxidação de ácidos graxos. Ocorre em dois compartimentos celulares: mitocôndria e peroxissomos. Essa oxidação é iniciada através do carbono β da cadeia do ácido graxo, com posterior remoção de um grupamento composto por dois átomos de carbono (acetil coenzima A) e assim sucessivamente. A acetil coenzima A sofre oxidação no ciclo de Krebs, contribuindo para liberação de energia para síntese de ATP (adenosina trifosfato) ou utilizados na síntese de corpos cetônicos. Durante esse processo,

elétrons são liberados e transportados através da cadeia respiratória da mitocôndria (CHEGARY et al, 2009).

Os ácidos graxos para serem oxidados através da β -oxidação devem ser transportados para o interior mitocondrial e serem submetidos a quatro reações sucessivas: desidrogenase ligada ao FAD (Flavina Adenina Dinucleotídeo), hidratação, desidrogenação ligada ao NAD (Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida) e clivagem tiolítica.

Para o início da β -oxidação, antes de serem transportados para o interior mitocondrial, os ácidos graxos sofrem ativação a acil coenzima A (acil- CoA), catalisado pela acil-CoA sintetase, onde ocorre a formação de uma ligação tio éster entre a sulfidril da coenzima A e a carboxila do ácido graxo.

O transporte das moléculas de acil-CoA é realizado com a intermediação de três proteínas: carnitina palmitoiltransferase II (CPT-II), carnitina palmitoiltransferase I (CPT-I) e carnitina acilcarnitina translocase. A CPT-I, localizada na membrana externa da mitocôndria, catalisa a reação de conversão da acil-CoA em acilcarnitina. A acilcarnitina é translocado para a matriz mitocondrial. Interiorizadas, sofrem conversão novamente a acil-CoA pela ação da CPT-II, com ação na face interna da membrana interna mitocondrial, ou seja, com o sítio ativo voltado para a matriz mitocondrial. Juntamente com a CPT-I, as demais enzimas possuem sítios de ação bem próximos, o que garante o acoplamento das reações, tornando todo sistema bem eficiente. (ZHANG et al, 2010; SIM, HAMMOND e WILCKED, 2002).

Há três possíveis níveis que regulam a β -oxidação na mitocôndria sendo eles a regulação fisiológica extrínseca, regulação via CPT-I e regulação intramitocondrial. A enzima antagonista à CPT-I é a malonil coA, ou seja, a

CPT-I acaba exercendo um importante papel para controlar o fluxo de ácidos graxos na β -oxidação (STANLEY, RECCHIA e LOPASCHUK, 2005) .

Ao ser interiorizado na mitocôndria, a molécula de acil-CoA sofre desidrogenação ligada ao FAD, ou seja, há uma deprotonação do carbono α da molécula de acil-CoA e a transferência de um íon híbrido do carbono β para FAD (grupo prostético catalisador). Essa reação dá origem à molécula *trans*- Δ^2 -enil-CoA e à redução do FAD gerando FADH₂. O FADH₂ é reoxidado na cadeia transportadora de elétrons para promover a redução da coenzima Q. As reações finais na cadeia transportadora de elétrons são a redução de O₂ para H₂O relacionada à síntese de ATP (ANDREYEV, KUSHNAREVA e STARKOV, 2005).

A continuação da β -oxidação mitocondrial se dá pela adição de H₂O à *trans*- Δ^2 -enil-CoA, especialmente à instauração *trans*- α , β da etapa anterior, dando origem ao 3-L- β -hidroxiacil-CoA. Esta etapa é catalisada por enzimas específicas que atuam sobre ácidos graxos de acordo com o comprimento da cadeia carbônica. A 3-L- β -hidroxiacil-CoA sofre oxidação dando origem a uma cetona. Um grupamento hidroxila do carbono β é recrutado e o NAD⁺ é utilizado como oxidante. Esta reação dá origem ao β -cetoacil-CoA e ao NADH entra na cadeia de transportadora de elétrons (HILL, HAMID e EXIL, 2008).

A última das reações sucessivas da β -oxidação é a clivagem tiolítica. Nessa reação, a molécula de β -cetoacil-CoA é transformada em uma molécula de acetil-CoA e uma nova molécula de acil-CoA, mas com dois carbonos a menos que a molécula inicial. Para obtenção dos produtos, um tiolato de cisteína localizado no sítio da enzima tiolase reage com o grupamento β -carbonil da β -cetoacil-CoA, com formação de uma ligação tioéster entre a

enzima e o substrato. Ocorre, posteriormente, a clivagem da ligação entre carbonos liberando uma molécula intermediária, que é protonado por um grupo ácido da tiolase, dando origem à molécula de acetil-CoA. A ligação tioéster é substituída por uma ligação entre a cadeia de carbono e uma nova CoA, formando uma molécula de acil-CoA com dois carbonos a menos (WANDERS, 2004).

É válido lembrar que ácidos graxos de cadeia com número par e número ímpar de carbonos dão origem a produtos diferentes quando são degradados nas quatro reações da β -oxidação, devido à remoção de uma unidade de dois carbonos (acetil-CoA) a cada ciclo. Ácidos graxos de cadeia par, ao final das reações, apresentam uma molécula de acil-CoA com quatro carbonos, ao passo que ácidos graxos com número ímpar de carbono geram grupo acil-CoA com cinco carbonos. Grupamento acil-CoA com quatro carbonos sofrem uma última reação dando origem a duas moléculas de acetil-CoA, enquanto que a ação da tiolase sobre grupo acil-CoA com cinco carbonos dá origem a uma molécula de acetil-CoA e uma propionil-CoA (com três carbonos) (GU e LI, 2003).

As moléculas de acetil-CoA podem assumir dois papéis: 1) utilização para geração de ATP via oxidação no ciclo de Krebs; 2) síntese de corpos cetônicos. Já a molécula de propionil-CoA é convertida a succinil-CoA devido a três reações catalisadas por propionil-CoA carboxilase, metil-malonil-CoA epimerase e metilmalonil-CoA mutase. O próprio succinil pode ser utilizado na neoglicogênese ou sofrer oxidação no ciclo de Krebs após conversão a malato que passa da matriz mitocondrial para o citosol, onde é descarboxilado a piruvato, que entra novamente na matriz mitocondrial para sofrer ação da

piruvato desidrogenase, formando acetil-CoA para ser oxidada no ciclo de Krebs.

Os ácidos graxos insaturados são oxidados através da β -oxidação, mas são necessárias enzimas específicas para as insaturações com o intuito de torná-los suscetíveis a ação das enzimas da β -oxidação (LE et al, 2000).

Outra via de oxidação de ácidos graxos é a ω -oxidação, que está presente nas células dos eucariotos, mais especificamente no retículo endoplasmático. A função da ω -oxidação está relacionada à oxidação de pequenas quantidades de ácidos graxos de cadeia média e cadeia longa a ácidos dicarboxílicos (VISSER et al, 2007; WANDERS e WATERHAM, 2006; WESTIN, HUNT e ALEXSON, 2005) .

Uma das características da ω -oxidação é a hidroxilação do último carbono da cadeia (carbono ω) pelo citocromo P450 (monooxigenase que utiliza O_2 e NADPH) e promove a oxidação de uma hidroxila dando origem a um ácido dicarboxílico que pode esterificar com a CoA, sendo degradado pela β -oxidação em peroxissomos ou em menor parte, na mitocôndria. Em geral, ácidos dicarboxílicos não são totalmente oxidados, sendo excretados pela urina na forma de ácidos graxos de cadeia mais curta. Esta via está mais ativa principalmente na sobrecarga por ácidos graxos (jejum, diabetes descompensada, aumento da ingestão de ácidos graxos de cadeia média) e quando a oxidação mitocondrial está limitada (HARDWICK, 2008; DRAVE e VAMECQ, 1989).

Desta forma, a oxidação dos ácidos graxos contribui para o aporte energético fornecendo em média 123 moléculas de ATP e 146 moléculas de água.

2.6. Peroxidação lipídica e aterosclerose

A peroxidação lipídica em tecidos resulta na produção e propagação da reação com espécies reativas, primeiramente envolvendo PUFA's da membrana celular ou de organelas. Isto tem sido implicado na patogênese de inúmeras doenças incluindo aterosclerose, diabetes, câncer e artrite reumatóide (KOTA, KRISHNA e POLASA, 2008). Acredita-se que ácidos graxos saturados possam exercer um papel protetor na peroxidação por não possuírem insaturações.

Os dienos conjugados formados durante a peroxidação podem ser detectados espectrofotometricamente. A elevação dessas substâncias em animais e humanos pode estar associada ao estresse oxidativo, segundo pesquisas (JACKSON, 1999).

A mesma oxidação desses ácidos graxos insaturados pode levar à formação de outros compostos, como o dialdeídomalônico (MDA), facilmente detectável pelo método do TBA (ácido tiobarbitúrico). Quando o estresse oxidativo é desencadeado a produção excessiva de ERO's pode causar peroxidação lipídica e dano irreversível à membrana celular e proteínas. Além do mais, esses danos podem levar à lesão oxidativa do endotélio vascular. Um dos produtos gerados na peroxidação lipídica é o malonaldeído ou aldeído malônico (MDA). O MDA é um produto final estável do metabolismo após a peroxidação lipídica da membrana celular (SHEN *et al*, 2011).

O MDA ainda mostra uma correlação inversa com o óxido nítrico, um fator de vasodilatação. Baskin *et al* (2003), analisando homogenato de tecidos contendo ateromas identificaram uma quantidade três vezes inferior de óxido

nítrico do que em tecidos íntegros. Igualmente, homogenatos de tecidos lesionados possuíam dez vezes mais MDA que tecidos livres de lesões.

Entretanto, outras substâncias além do MDA, podem reagir com o TBA, resultando em produtos com absorção similar ao MDA. Por esta característica, este método é identificado como TBARS, quantificando as substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico. Esta reação gera compostos de cor rósea, os quais podem ser medidos através do espectrofotômetro a 532nm (JENTZSCH, 1995).

Várias hipóteses têm sido propostas em relação à formação de MDA *in vivo*. Algumas hipóteses descreveram a oxidação lipídica como sendo capaz de produzir MDA como produto de decomposição de ácidos graxos. O mecanismo envolve formação de endoperóxidos provenientes de PUFA's com duas ou mais ligações. Um mecanismo alternativo apresentado por Esterbauer et al (1991) , é baseado na formação sucessiva de hidroperóxidos através da β -oxidação de PUFA's. MDA é então diretamente formado a partir de um 3-hidroperoxialdeído ou pela reação entre acroleína e radical hidroxil. Aldeídos, como MDA, são capazes de formarem adutos com biomoléculas como proteínas, DNA e RNA (LYKKESFELDT, 2007).

Para a identificação de dialdeído malônico outras metodologias vêm sendo aplicadas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (SELJESKOG, HERVIG e MANSOOR, 2006).

As células endoteliais vasculares formam uma barreira entre a parede dos vasos e o conteúdo intersticial para a manutenção dos processos fisiológicos, regulação dos tons adequado dos vasos e a permeabilidade seletiva. A injúria do endotélio por qualquer evento altera a integridade

vascular, ocasionando disfunção endotelial. Um dos fatores que contribuem para essa disfunção são as ERO's que mediam reações, incluindo a peroxidação lipídica. O estresse oxidativo resulta de uma produção excessiva de ERO's e uma ineficiência dos mecanismos antioxidantes diante desse quadro, culminando com lesão ou disfunção tecidual. Este mecanismo tem sido proposto para explicar a patogênese da aterosclerose. Em um estado de inflamação crônica ou aguda, as ERO's podem ser deflagradoras e potencializar a resposta inflamatória, o que caracteriza o estresse oxidativo. Esse processo pode ser iniciado pela LDL, que quando oxidada, deflagra vias que ocasionam a aterogênese, pois estimulam a formação de células espumosas, provocando a disfunção endotelial e estimulando a expressão de moléculas de adesão no endotélio e em monócitos/macrófagos. Além desse processo sugerido, a produção do ânion superóxido via xantina oxidase, também pode gerar o estresse oxidativo no endotélio vascular (NEZAMI, 2011; HENNIG e CHOW, 1987).

A placa aterosclerótica tanto monócitos, como células endoteliais e células musculares lisas são capazes de gerar ERO's. Particularmente, macrófagos derivados de monócitos têm a habilidade de fagocitar ox-LDL formando células espumosas e produzindo vários tipos de ERO'S como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil. Essas ERO'S têm a capacidade de induzir a peroxidação lipídica. Os peróxidos produzidos induzem a disfunção da membrana celular, inativação de enzimas, desnaturação protéica e de DNA, tendo a peroxidação um importante papel no desenvolvimento e progressão da aterosclerose. A peroxidação lipídica no

processo aterogênico gera produtos reativos ao ácido tiobarbitúrico, sendo que o MDA é o mais expressivo (NISHI et al, 2002).

MDA é um marcador confiável do estresse oxidativo e tem sido associado a múltiplas enfermidades, incluindo a aterosclerose. Nos últimos anos, várias pesquisas mostraram que várias estruturas específicas são geradas durante a peroxidação lipídica nos processos inflamatórios. O MDA é um desses compostos, dentre outros aldeídos. Esses compostos reagem com grupamentos amino de proteínas bem como de alguns lipídios, com PUFA's e lípidos facilmente oxidáveis da membrana da LDL-c, propagando ainda mais o mecanismo de peroxidação (DURYEE et al, 2010; WEISMANN e BINDER, 2012).

Os produtos da peroxidação lipídica podem ser citotóxicos e dessa forma alterando a produção de elementos que contribuem para a homeostase vascular, como o óxido nítrico. Estudos demonstraram que há uma correlação inversa entre a concentração de MDA e óxido nítrico (BASKIN et al, 2003; CABRÉ et al, 2003).

2.7. Enzimas antioxidantes

Um dos mecanismos de defesa utilizado por organismos aeróbios contra o dano causado por espécies reativas de oxigênio ERO's é a atividade de enzimas para eliminar essas espécies através de sua conversão a compostos menos tóxicos. Deste modo, enzimas são geralmente referidas, como as enzimas antioxidantes e dentre essas, as mais amplamente distribuídas incluem a superóxido dismutase, catalase e glutational peroxidase. O reconhecimento da importância do papel dessas enzimas contra o dano causado por ERO's aconteceu rapidamente após a descoberta da primeira

enzima antioxidante, que foi a superóxido dismutase, através do trabalho de McCord e Fridovich, em 1969. As enzimas antioxidantes constituem uma importante parte na defesa dos organismos aeróbios contra a produção de ERO's, bem como na prevenção e reparo dos danos moleculares gerados em várias situações (JOHNSON, 2002).

Essas enzimas formam um grupo que tem como característica estagnar o processo de propagação em cadeia dos danos ocasionados por ERO's. Elas são denominadas enzimas de detoxificação, constituindo uma segunda linha de defesa (GENESTRA, 2007).

A superóxido dismutase (SOD) é uma das mais eficientes enzimas antioxidantes intracelulares. A SOD catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot -}$ a O_2 e a H_2O_2 . Há algumas isoformas da SOD e humanos apresentam três: citosólica (Cu, Zn-SOD), mitocondrial (Mn-SOD) e extracelular (EC-SOD) (BAFANA et al, 2011; VALKO et al, 2006).

A reação de dismutação pode ser descrita de maneira simplificada, da seguinte forma:

A atividade da catalase consiste em converter o H_2O_2 gerado, inclusive, na dismutação do $O_2^{\cdot -}$, a água e oxigênio. Esta enzima opera a elevados níveis de H_2O_2 (JEZEK e HLAVATÁ, 2005).

Além da detoxificação do H_2O_2 , a catalase é responsável pela detoxificação de outros fenóis e álcoois. É encontrada tanto em peroxissomos quanto na fração citosólica (KARIHTALA e SOINI, 2007; VALKO et al, 2006).

A reação de detoxificação do H_2O_2 pode ser descrita de maneira simplificada, da seguinte forma:

Já a glutathione peroxidase (GSH-Px), juntamente com a glutathione reduzida (GSH), converte H_2O_2 a água e glutathione oxidada (GSSG). Posteriormente, a glutathione oxidada é reduzida novamente a GSH, pela glutathione redutase (GR), tendo o NADPH como cofator (ROVER JUNIOR et al, 2001).

A GSH-Px compete com a catalase para detoxificação do H_2O_2 e é a maior fonte de proteção contra baixos níveis de peróxido de hidrogênio (VALKO et al, 2006).

Geradores importantes de espécies reativas e o papel das enzimas antioxidantes estão resumidos na figura 2.

As enzimas que possuem alterações mais expressivas na aterosclerose são a SOD e CAT. Embora o dano ao DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) pode ser causado por fatores ambientais, as maiores lesões surgem devido à ação patológica das ERO's e das espécies reativas de nitrogênio no núcleo celular. Mecanismos celulares de defesa antioxidante compreendem a atividade de enzimas antioxidantes como a CAT e SOD que possuem um eficiente potencial de varredura de ERO's e das espécies reativas de nitrogênio (GRAY e BENNETT, 2011).

Figura2. Vias para produção e remoção de ERO's pelas enzimas SOD, CAT; GPx e GR (AFONSO et al., 2007).

Estudos têm mostrado que o ânion superóxido está elevado no desenvolvimento da camada neointima e é essencial para a proliferação de células musculares lisas e sinalização do fator de transcrição nuclear NF- κ B nestas mesmas células, no processo aterogênico. Felizmente, a presença das três isoformas da SOD (citosólica ou cobre-zinco SOD; manganês SOD-mitochondrial e uma forma extracelular ligada às membranas celulares) na parede dos vasos sanguíneos atuam contra a produção exagerada de espécies reativas (WANG, SHI e CHEN, 2012).

Óxido nítrico é bem instável com uma meia-vida de poucos segundos em soluções aquosas. Entretanto, sua meia-vida aumenta de forma expressiva quando os ânions superóxido são removidos pela ação da SOD. A habilidade das células endoteliais de liberar óxido nítrico é uma parte importante para a

manutenção do funcionamento normal da parede vascular limitando a proliferação de células musculares lisas, vasoconstrição e agregação plaquetária. (HARRINGTON et al, 2011).

A SOD atua auxiliando na atenuação da oxidação da LDL-c, dismutando o superóxido e dessa forma prevenindo o acúmulo de oxLDL. O ânion superóxido produzido a partir de macrófagos está positivamente correlacionado com a oxidação da LDL-c, mediada por macrófagos. (CHEN et al, 2012).

Outra via para produção de espécies reativas, em especial ânion superóxido, derivadas da NADPH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Oxidase*) oxidases que são enzimas catalisadoras da produção de superóxido, produzido pela redução do oxigênio utilizando o NADPH como doador de elétron (TOUZY, 2004). Este conjunto de enzimas reduz a biodisponibilidade de óxido nítrico e conduz à oxidação da LDL-c e disfunção endotelial (CATHCART, 2004; GUZIK et al, 2000).

Avaliação questionando os ácidos graxos monoinsaturados e saturados e a relação destes com processos oxidativos, têm estimulado diversos grupos de investigação a esclarecer o papel desses ácidos graxos em diferentes tipos de reações (VALENZUELA, DELPLANQUE e TAVELLA, 2011; HUNTER, ZHANG e KRIS-ETHERTON, 2010; GAGLIARDI, MANCINI-FILHO e SANTOS, 2009).

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar o impacto de ácidos graxos saturados (palmítico e esteárico) e monoinsaturados (oléico) em animais *knockout* para o receptor LDL-c (Camundongos, linhagem B6 129S7-Ldlrtm1 Her/J), com o intuito de averiguar fundamentos do ácido esteárico em relação ao processo aterosclerótico.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Determinar o colesterol plasmático (CT, LDL-c e HDL-c) e triacilglicerol dos animais tratados com diferentes ácidos graxos sobre os biomarcadores de risco para aterosclerose.
- ✓ Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase e Catalase em diferentes órgãos;
- ✓ Verificar a extensão da oxidação tecidual após intervenção com as dietas em estudo;
- ✓ Analisar o perfil lipídico dos tecidos hepático e cardíaco, além do perfil lipídico das rações ofertadas aos animais.
- ✓ Realizar ensaios de expressão gênica relacionados às moléculas de adesão ICAM-1, VCAM-1 e CD-36, além da quimiocina MCP-1.

4. Material e métodos

4.1. Ensaio biológico

O ensaio biológico foi conduzido no Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (Anexo 1), e Comitê de Biossegurança (Anexo 2).

Foram utilizadas 88 fêmeas, camundongos da linhagem B6 129S7-Ldlrtm1 Her/J, com idade de sessenta dias. Os animais desta linhagem apresentam como característica a redução de receptores para colesterol no fígado, leve hipercolesterolemia e elevação das frações lipídicas quando a eles ofertado qualquer substância capaz de promover essa alteração.

Os animais foram distribuídos em quatro grupos de vinte e dois animais sendo denominados Grupo Controle (C), Grupo Triestearato (TE), Grupo Trioleato (TO) e Grupo Tripalmitato (TP). Os mesmos foram mantidos em caixas plásticas, com quatro animais cada, portando bebedouro com água *ad libitum*. As condições ambientais eram: temperatura controlada a $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12h.

Todos os animais foram submetidos a um período de adaptação de sessenta dias, até atingir idade adequada para início da intervenção, consumindo ração padrão, NUVILAB CR-1 irradiada.

Após este período os animais receberam as rações, *ad libitum*, definidas para cada grupo durante seis semanas.

Os animais foram pesados duas vezes por semana assim como restos alimentares com a finalidade de se determinar o Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA).

Os animais foram eutanasiados, com posterior retirada de sangue e tecidos (coração, fígado e cérebro) perfundidos com solução salina, com concentração igual a 0,9%.

Após a extração, os tecidos, assim como o plasma foram colocados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer -80°C para análises posteriores.

O fragmento cardíaco que corresponde ao sino aórtico. Após perfusão de três mililitros de solução salina (0,9%), o sino aórtico é retirado através de incisão com lâmina de bisturi e imerso em solução *RNA late* (500µL) *overnight*, para preservação do RNA. Após expirado o período, a solução RNA late® (500µL) foi drenada e imediatamente o fragmento imerso em nitrogênio líquido, para posterior armazenamento em freezer a -80°C.

4.2. Elaboração das dietas – tratamentos

As dietas foram confeccionadas pela empresa Prag Soluções, localizada na cidade de Jau, interior do estado de São Paulo, de acordo com especificações determinadas. Para a elaboração das rações foram utilizados triacilgliceróis sintéticos e purificados.

Seguiu-se a recomendação para elaboração de ração padrão AIN-93, para roedores adultos, peletizadas.

As rações foram divididas em quatro especialidades: 1) ração padrão AIN-93; 2) ração padrão modificada, tendo 40% do teor total de lipídios substituídos por triestearato (Sigma); 3) ração padrão modificada, tendo 40% do teor total

de lipídios substituídos por trioleato (Sigma) e 4) ração padrão modificada, tendo 40% do teor total de lipídios substituídos por tripalmitato (Sigma).

O grupo consumidor da dieta padrão foi identificado como grupo controle (C). A dieta modificada com triestearato foi identificada por TE. Já o grupo consumidor da dieta modificada com trioleato, identificado como TO e com tripalmitato, TP. A composição centesimal das dietas está detalhada na tabela 1.

Foram utilizadas rações normolipídicas com o perfil de ácidos graxos alterado com predomínio de ácidos graxos específicos. O uso de rações normolipídicas se fez necessário para que os resultados não fossem influenciados pelo excesso de lipídios consumidos.

Tabela 1. Composição centesimal das dietas (fabricante)

Produto (%)	Controle	TO	TP	TE
Amido de milho	46.57	46.57	46.57	46.57
Caseína	14.00	14.00	14.00	14.00
Amido dextrinizado	15.50	15.50	15.50	15.50
Sacarose	10.00	10.00	10.00	10.00
Óleo de soja	4.00	2.40	2.12	2.40
Trioleato	0.00	1.60	0.00	0.00
Tripalmitato	0.00	0.00	1.88	0.00
Triestearato	0.00	0.00	0.00	1.60
Celulose microcristalina	5.00	5.00	5.00	5.00
Mix mineral AIN 93M	3.50	3.50	3.50	3.50

Produto (%)	Controle	TO	TP	TE
Mix vitamina AIN 93M	1.00	1.00	1.00	1.00
L Cistina	0.18	0.18	0.18	0.18
Bitartarato de colina	0.25	0.25	0.25	0.25
BHT	0.001	0.001	0.001	0.001

4.3. Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA)

Para a determinação do CEA, foram tomados os pesos de consumo de ração de animais e o peso de cada animal, durante o período da intervenção.

O CEA é a razão entre o ganho de peso e o consumo de ração de cada animal, finalizando com a média de cada grupo.

$$\text{CEA} = \frac{\text{ganho de peso do animal (g)}}{\text{consumo de ração (g)}}$$

4.4. Lipidograma

O lipidograma composto por dosagem de colesterol total (CT), *High Density Lipoprotein* (HDL-c), *Low Density Lipoprotein* (LDL-c) (Equação de Friedwald) e triacilgliceróis (TAG), foi realizado com a utilização de testes previamente validados e comercializados pela Labtest em forma de *kits*.

4.5. Preparo dos tecidos hepático (avaliação da atividade de enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica), cerebral (peroxidação lipídica) e cardíaco (atividade de enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica)

4.5.1 - Fígado

Após a retirada do fígado perfundido, o mesmo foi pesado e 500 mg do órgão foram retirados e homogeneizados em Potter-Elvehjem, utilizando

tampão fosfato a 0,1M, pH 7,0, imerso em gelo, por trinta segundos. O volume de tampão foi igual a três vezes o peso do órgão. O homogenato foi centrifugado a 3.500 rpm (1.010 x g) por 20 minutos, a 4° C e o sobrenadante reservado para avaliação da peroxidação lipídica. Foram retirados 600 µL do sobrenadante e submetido a nova centrifugação a uma velocidade de 10.500 rpm (11.000 x g) por 15 minutos a 4° C, com a finalidade de ser utilizado na determinação da atividade de enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT).

4.5.2 – Coração

Para o preparo do homogenato do tecido cardíaco foram tomados 150 mg e homogeneizados em Potter-Elvehjem, utilizando tampão fosfato a 0,1M, pH 7,0, imerso em gelo, por trinta segundos. O volume de tampão foi igual a quatro vezes o peso do órgão. O homogenato foi centrifugado a 3.500 rpm (1.010 x g) por 20 minutos, a 4° C e o sobrenadante retirado para nova centrifugação, a uma velocidade de 10.500 rpm (11.000 x g) por 15 minutos a 4° C, com a finalidade de ser utilizado na determinação da atividade de enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT).

4.5.3 – Cérebro

Após a retirada do cérebro perfundido, o mesmo foi pesado e 500 mg do órgão foram retirados e homogeneizados em Potter-Elvehjem, utilizando tampão fosfato a 0,1M, pH 7,0, imerso em gelo, por trinta segundos. O volume de tampão foi igual a quatro vezes o peso do órgão. O homogenato foi centrifugado a 3.500 rpm (1.010 x g) por 20 minutos, a 4° C e o sobrenadante retirado para nova centrifugação, a uma velocidade de 10.500 rpm (11.000 x g)

por 15 minutos a 4° C, com a finalidade de ser utilizado na determinação da peroxidação lipídica.

Tanto para fígado quanto para coração e cérebro o homogenato extraído para análise de peroxidação lipídica, foi armazenado em ultra freezer a -80° C.

4.6. Enzimas antioxidantes

Foram realizadas as determinações da atividade de enzimas antioxidantes específicas no tecido hepático e cardíaco. Utilizou-se a fração citosólica dos tecidos.

4.6.1 - Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

Para determinação da atividade da SOD, o meio de reação foi composto por Citocromo C (100µM), Xantina (500µM), EDTA (1mM) e KCN (200µM) em tampão fosfato de potássio a 0,05M (pH7,8). O volume de Xantina oxidase (0,6 unidades/mg de proteína), determinada através de um “branco”, foi o último item adicionado. Em uma cubeta de quartzo, foi inicialmente adicionado 1mL do meio, 15 µL da fração citosólica de cada tecido e o volume determinado de Xantina oxidase. A medição foi feita em duplicata a 550nm, a 25° C.

O fundamento baseia-se na produção dos ânions peróxidos produzidos pela Xantina oxidase na presença de Xantina. O ânion superóxido oxida o Citocromo C, gerando um aumento da densidade ótica a 550nm, a 25° C, em espectrofotômetro.

Os resultados são expressos em U/mg de proteína.

A unidade U pode ser descrita como a atividade da enzima que promove 50% de inibição da reação da Xantina nas condições citadas.

O método utilizado foi descrito por McCord e Fridovich (1969).

4.6.2 - Atividade da Catalase (CAT)

O meio de reação para a atividade da catalase, é composto por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 10mM (obtidos a partir de 10 μL de peridrol 30% em 10mL de H_2O miliQ) em tampão Tris HCl 1M EDTA 5mM (pH8,0). Para compor a reação, foram utilizadas duas alíquotas dos homogenatos, 15 μL e 20 μL , completados com 985 μL e 980 μL , respectivamente. Foram incubadas a 37° C para a posterior leitura a 230nm, em espectrofotômetro, com decréscimo da densidade ótica.

Os resultados são expressos em U/mg de proteína, onde U corresponde a atividade da enzima que promove a hidrólise de 1 μmol de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por minuto, a 37° C em pH8,0.

O método utilizado foi descrito por Beutler (1975).

4.7. Peroxidação lipídica do tecido hepático, cerebral e cardíaco

Para a análise de peroxidação lipídica através do método TBARS, foram tomados 200 μL do homogenato de tecido, obtido segundo descrição acima. A esses 200 μL , foram adicionados 600 μL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,5%, em solução de ácido acético a 20% (v/v). A esta diluição, foram adicionados 350 μL de solução de ácido acético a 20%, a mesma da diluição do TBA. Após homogeneização em vortex, foi deixado em banho-maria, sob agitação moderada, a 85°C durante uma hora. Após resfriamento, foram adicionados 50 μL de SDS (8,1%), sendo homogeneizado e centrifugado a 12.000 rpm, por 15 minutos, a 20° C. A leitura após centrifugação foi realizada através de análise espectrofotométrica a 532nm. As leituras foram determinadas em triplicata e o aparelho calibrado com um “branco” contendo

apenas tampão no lugar do homogenato e submetido a todas as condições do ensaio.

A curva padrão foi feita a partir de uma solução de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TEP) a uma concentração de 6×10^{-6} mol/L e os resultados expressos em nMol de TBARS/mg de proteína.

O método utilizado foi descrito por OHKAWA et al (1979).

4.8. Determinação de proteína dos tecidos

Para se determinar o conteúdo de proteínas nos tecidos foi realizado o método de Bradford (1985).

O método consiste em diluir o homogenato utilizado tanto para TBARS quanto utilizadas na atividade enzimática, em tampão fosfato em 250 vezes. Desta primeira diluição, foram tomados 50 μ L e adicionados 750 μ L de H₂O miliQ e 200 μ L da solução de Bradford. Após homogeneização, este homogenato foi incubado por, no mínimo, cinco minutos até leitura da absorbância a 595nm, em triplicata.

Para auxiliar a determinação da concentração de proteínas, foi feita uma curva padrão de albumina.

4.9. Perfil de ácidos graxos dos tecidos e rações

A extração e derivatização dos ácidos graxos foram realizadas de acordo com metodologia descrita pela *Association of Official Analytical Chemists* (2002).

Foram utilizados 200 mg de tecido e a este tecido foram adicionados ácido pirogálico (25 mg), padrão interno C13:0 na forma de triacilglicerol (concentração igual a 5mg/mL – 200 μ L), etanol (500 μ L), ácido clorídrico (8.3M – 2,5mL).

Os reagentes foram agitados de forma vigorosa, em contato com a amostra e conduzidos ao shaker Durbnoff, em temperatura entre 70°C e 80°C, com agitação moderada por quarenta minutos.

Após o resfriamento, foi realizada a esterificação dos ácidos graxos, utilizando trifluoreto de boro (BF₃), para posterior injeção em cromatógrafo a gás, GC 17A Shimadzu/Class GC10, coluna cromatográfica de sílica fundida (SP-2560 – biscinopropil polisiloxana) com 100m e 0,25mm de diâmetro interno. A programação da temperatura da coluna foi determinada da seguinte forma: isotérmico a 140°C por cinco minutos e posterior aquecimento a 4 °C/min, até 240°C, permanecendo nesta temperatura por trinta minutos. A temperatura do vaporizador foi estipulada em 250°C. Temperatura de detector igual a 260°C, sendo o hélio o gás de arraste (fluxo igual a 1mL/min). A razão de divisão das amostras foi de 1/100.

As áreas obtidas foram plotadas em planilhas para a quantificação em gramas por amostra.

Para a análise das rações, foi utilizado um grama de amostra e as determinações foram realizadas com padrão interno C13, em triplicata.

4.10. Extração, transcrição e amplificação do mRNA das moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1, CD-36) e quimiocina MCP-1 - ensaio de *Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*

4.10.1. Extração, transcrição e amplificação de RNA do tecido cardíaco

Antes do início do procedimento, a superfície das bancadas e equipamentos foram rinsados com solução RNase-ZAP® (*Life Thecnologies*) e todos os tubos e ponteiros utilizadas foram autoclavadas.

Para a extração do RNA do tecido cardíaco, o fragmento correspondente ao sino aórtico foi descongelado e homogeneizado com reagente TRIzol® (*Invitrogen*), 1mL, utilizando turrax, tubo de vidro e haste de teflon.

A cada nova homogeneização, tanto o tubo quanto a haste era higienizado com água e detergente neutro, enxague em água destilada e rinsados com água DEPC.

Após esta etapa, o homogenato foi transferido para tubos (Eppendorf) com capacidade de 1,5mL, sempre em banho de gelo. Este homogenato foi centrifugado a 10.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C.

Seguida a centrifugação, o sobrenadante foi aspirado e transferido para outro tubo e incubado por mais cinco minutos, à temperatura ambiente. Respeitado o período de incubação, foram adicionados 200µL de clorofórmio (PA) e agitado em vórtex por quinze segundos e incubado por três minutos à temperatura ambiente.

Após o período de incubação, este homogenato foi novamente centrifugado a 10.000 rpm, por 15 minutos, a 4°C e recolhida cuidadosamente a fase aquosa (superior), transferindo-a para novos tubos (entre 400 e 600µL) e acrescentando 500µL de isopropanol (álcool isopropílico) para precipitação do material extraído. A agitação seguida à adição do isopropanol foi executada de forma manual, com posterior repouso da amostra por 10 minutos para nova centrifugação.

Este material foi centrifugado a 10.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C e em seguida, o sobrenadante foi totalmente retirado, restando somente o precipitado.

O precipitado foi lavado com álcool etílico (etanol) a 75% (v/v com água DEPC), agitado em vórtex (velocidade moderada), por 15 segundos. Após agitação, foi feita nova centrifugação (10.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C) e a fase etanólica foi desprezada. Este procedimento foi realizado por duas vezes e ao final da segunda vez, o pelete foi mantido em repouso por 15 minutos (até completa secagem) e ressuspenso em 40µL de água DPec e armazenado a -80°C.

Para a fase de transcrição, foi necessário quantificar, em duplicata, o RNA total numa amostra de 2µL, utilizando o equipamento NanoDrop® (Espectrofotômetro *Applied Biosystems*®).

Após a quantificação, foi realizada a transcrição onde foi tomado um total de RNA correspondente a 1µg. A esta quantidade, foram adicionados 4µL do pool, contendo a enzima transcriptase reversa, SuperScript® (*Life Technologies*) e água DPec suficiente para atingir o volume final de 20µL, em microtubos com capacidade para 200µL, devidamente autoclavados.

Ao finalizar o preparo do homogenato para a transcrição, os microtubos foram inseridos em termociclador (*Applied Biosystems*®) com programação definida.

Após a transcrição, o c-DNA formado foi armazenado em freezer a -80°C. Ressalta-se que nesta etapa o material possui maior estabilidade por se tratar de uma dupla fita.

Para a amplificação dos genes em estudo, um novo homogenato foi feito utilizando para cada amostra 25µL de *Fast SyBr Green Master Mix*, usado para a detecção da amplificação dos genes em estudo. A este homogenato, foram acrescentados 22µL de água DPec, 1µL dos *primers forward* e *reverse* de cada

gene e para finalizar, 1 μ L da amostra transcrita, dando um total de 50 μ L de homogenato para a amplificação em duplicata.

A amplificação foi realizada utilizando placas específicas, contendo 96 poços, inseridas no equipamento RT-PCR 7500 (*Applied Biosystems*).

Com os dados da amplificação, foram realizados cálculos utilizando o método 2(-Delta Delta C(T)) (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

A Ciclofilina foi o gene normalizador utilizado.

Este ensaio foi realizado de acordo com metodologia descrita por Daleprane et al (2012).

4.11. Estatística

A análise estatística foi feita utilizando o software Prisma 3.0, sendo realizados testes ANOVA, aplicando-se posteriormente Tukey, para comparação concomitante de todos os dados, com índice de significância menor que 0,05 ($p < 0,05$).

5. Resultados e discussão

5.1. Perfil de ácidos graxos - rações

A análise realizada nas rações foi necessária para averiguar a quantidade dos ácidos graxos presentes em quantidades expressivas e ácidos graxos suplementados em cada ração em estudo, como mostrado na tabela 2, onde as rações utilizadas neste projeto possuíam os ácidos graxos selecionados para estudo, além dos ácidos graxos essenciais.

Tabela 2. Perfil de ácidos graxos (g/100g de amostra) das rações ofertadas *ad libitum* no ensaio biológico com modelo animal (camundongos fêmeas), suplementadas com ácidos graxos (TO, TP e TE), realizado no período de seis semanas.

Fórmula	Nome	Controle	TO	TP	TE
16 : 0	Palmítico	0,8 ± 0,0	0,3 ± 0,0	1,5 ± 0,1	0,5 ± 0,0
18 : 0	Esteárico	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,7 ± 0,3
18 : 1 (n-9)	Oleico	1,0 ± 0,0	2,1 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,0
18 : 2 (n-6)	Linoleico	2,2 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,7 ± 0,0	1,84 ± 0,0
18 : 3 (n-3)	α -Linolênico	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	—	0,2 ± 0,0

Análise estatística realizada através do teste ANOVA (média e desvio padrão), pós teste de Tukey, com $p < 0,05$.

Tendo em vista avaliar a quantidade exata dos ácidos graxos é em decorrência da possibilidade de realizar correlações com as possíveis alterações encontradas, sejam elas de origem bioquímica ou de expressão gênica.

O perfil de ácidos graxos foi realizado através de cromatografia gasosa, sob condições específicas para a detecção dos mesmos.

5.2. Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA)

O Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA) permite avaliar a o consumo alimentar de modelos animais, o ganho do peso e a razão entre as duas informações.

A importância deste coeficiente se dá pela capacidade de serem detalhados dados da diferença ou não de ingestão de nutrientes específicos em estudo.

Através do CEA é possível justificar resultados onde a diferença na ingestão de nutrientes pode desencadear alterações fisiológicas seja em nível bioquímico ou molecular.

O coeficiente de eficácia alimentar (CEA) nos dá o ganho de peso proporcional à quantidade de ração consumida. Além do mais, fornece a eficácia de dietas na manutenção corporal do animal e indiretamente, um parâmetro na influência de intervenções paralelas.

Neste estudo realizado, não houve diferença significativa entre os dados de consumo e ganho de peso, consequentemente com valores de CEA próximos.

Desta forma, qualquer alteração em dados biológicos não sofreu influência de um maior consumo de ração ou maior ganho de peso entre os animais e sim, possivelmente, pelos ácidos graxos ofertados.

Tabela 3. Valores de ganho de peso (g), consumo de ração (g) e cálculo do Coeficiente de Eficácia Alimentar (razão entre o ganho de peso e consumo de ração) dos animais (camundongos fêmeas), estimado durante o tratamento com rações suplementadas, por seis semanas.

Grupos	Ganho de peso (g)	Consumo (g)	CEA
C	1,65 ± 1,03	50,70 ± 17,40	0,03
TO	1,13 ± 0,40	58,88 ± 17,11	0,02
TP	1,40 ± 0,55	57,50 ± 20,73	0,02
TE	1,41 ± 1,20	63,50 ± 13,40	0,02

Análise estatística realizada através do teste ANOVA (média e desvio padrão), pós teste de Tukey, com $p < 0,05$.

É válido analisar os índices peso e consumo separadamente pelo fato de que grupos que tiveram consumos diferentes com ganhos de peso diferentes podem apresentar o mesmo valor de CEA ou valores que não apresentem diferenças significativas, dando uma falsa noção de equiparidade.

5.3. Resultados de HDL-c, LDL-c, colesterol total e TAG

Um dos métodos para o monitoramento dos parâmetros de normalidade do colesterol plasmático e suas frações é a realização do lipidograma. No presente trabalho as dosagens foram realizadas em relação à concentração do total de colesterol, HDL-c, LDL-c e triacilgliceróis.

O consumo de ácidos graxos polinsaturados e monoinsaturados pode contribuir para o aumento da síntese e atividade da HDL. No entanto nos resultados obtidos com trioleato não se pôde observar essa propriedade onde os valores de HDL-c para o monoinsaturado ácido oleico é similar ao grupo controle e TE (Figura 3).

Figura 3. Determinação da concentração sérica (média) de colesterol HDL (mg/dL) em camundongos fêmeas alimentadas com ração suplementada com tioleato, tripalmitato e triestearato por período de seis semanas. Análise estatística realizada através do teste ANOVA, pós-teste de Tukey, com $p < 0,05$.

Em relação à fração HDL-c, o grupo contendo tripalmitato na ração apresentou decréscimo na concentração plasmática, como demonstrado na figura 3, diferentemente nos animais que receberam ácido oleico e esteárico. A literatura vastamente aborda a influência de ácidos graxos saturados, principalmente ácidos graxos de cadeia longa, sobre a dosagem de HDL-c. Um dos prováveis mecanismos é o aumento da atividade da CETP induzida principalmente pelo ácido palmítico, ocasionando modificações e remodelamento da HDL e consequentemente alterando sua principal proteína, apoA-1. O catabolismo da apoA-1 ocasiona modificações no tamanho da partícula de HDL-c e em sua meia-vida e pode ter uma forte influência sobre o catabolismo da própria HDL-c (PÉREZ-MÉNDEZ, 2007; CARRÉON-TORRES *et al*, 2005; HUESCA-GÓMEZ *et al*, 2002; PIETZSCH *et al*, 1998).

A correlação realizada com a determinação de TBARS no fígado, que está elevada em relação ao grupo controle, com o decréscimo de HDL-c e consequente diminuição de PON1 (enzima Paroxonase-1, com atividade antioxidante), pode-se inferir que a síntese desta lipoproteína pode estar

afetada no tecido hepático, já que é um local de formação da mesma (ABBAS e SAKR, 2013).

Os resultados na avaliação de HDL-c apresentados na figura 3 indicam que os ácidos graxos oleico e esteárico não apresentaram atividades deletérias à partícula de HDL-c.

Já a fração LDL-c está intimamente relacionada com o processo aterosclerótico. A oxidação desta fração deflagra uma cadeia de processos fisiológicos, com envolvimento da imunidade humoral e celular. A LDL-c é um alvo primário nas terapias para a redução de colesterol devido sua estreita relação com aterogênese. O decréscimo de LDL-c está envolvido como a diminuição do risco de doença cardiovascular. Acredita-se que uma redução de 1,8 mg/dL diminua o risco de algum evento cardiovascular em 1%. Ácidos graxos saturados aumentam a taxa de LDL-c de uma forma dose-dependente (KATCHER *et al*, 2009; WOODSIDE e KROMHOUT, 2005).

Observações epidemiológicas, como o estudo *Seven Countries* (Ancel Keys, 1958), mostraram que populações com elevada ingestão de ácidos graxos saturados possuem alto nível de colesterol sérico e aumento na incidência de doenças cardiovasculares. É indiscutível que ácidos graxos saturados têm um impacto importante no aumento da LDL-c. Além da redução da expressão de receptores hepáticos para LDL-c, o aumento do colesterol hepático (livre e esterificado) também é verificado (OOSTERVEER *et al*, 2009; MENSINK *et al*, 2003).

Os resultados apresentados demonstraram que o ácido esteárico contribuiu para o acréscimo da fração LDL-c (Figura 4), mesmo sendo considerado um ácido graxo neutro. O ácido esteárico possui um caráter

controverso e muitas vezes, sem explicação. Além de não influenciar de modo expressivo na colesterolemia, principalmente no aumento da LDL-c, sua absorção parece ser menos eficiente que a absorção do ácido palmítico, além de ser convertido a ácido oleico rapidamente (BAER et al, 2003; RHEE et al, 1997; BONANOME, BENNETT e GRUNDY, 1992).

O grupo controle, o qual foi alimentado com ração composta por óleo de soja, foi estatisticamente diferente, apresentando dosagem menor da LDL-c, pois o ácido linoleico, principal ácido graxo do óleo de soja, é frequentemente relatado como um ácido graxo hipocolesterolêmico (IV DIRETRIZ BRASILEIRA SOBRE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE, 2007).

Em nosso experimento foi utilizado aproximadamente 1,8% de energia como ácido esteárico e pudemos observar alteração do colesterol total, LDL-c e TAG, quando comparados ao grupo controle contendo somente óleo de soja (Figuras 4, 5 e 6,). Valenzuela, Delplanque e Tavella (2011) destacam que o ácido esteárico apresenta um baixo índice de absorção intestinal e pode modificar os lípides plasmáticos, propriedade que o caracteriza como neutro para saúde cardiovascular. Os níveis plasmáticos da apoproteína B100, que determina a concentração de VLDL-c e LDL-c, transportadores de triacilgliceróis e colesterol, respectivamente, não são modificadas em dietas que contenham até 7% de energia como ácido esteárico.

Hunter, Zhang e Kris-Etherton (2010) em sua revisão estimaram que o consumo de ácido esteárico pela população americana corresponde a 3,5% da energia. Enquanto que em catorze países europeus o consumo de ácido esteárico situa-se na faixa de 1,8 a 4,4% da energia, apesar de difícil associação dos efeitos dos ácidos graxos saturados em humanos e animais.

Wang et al (2006) assumiram que o ácido esteárico pode desempenhar um papel de modulador para a sinalização de moléculas que protegem os neurônios contra lesões através da inibição de determinados receptores de aminoácidos que desencadeariam o estresse oxidativo.

Corroborando o caráter protetor do ácido esteárico, Pan et al (2010) discorreram em relação ao efeito benéfico sobre o dano hepático induzido pela colestase (acúmulo anormal de ácido biliar por dificuldade em seu transporte), principalmente em relação à fibrose tecidual e processo inflamatório, com redução da atividade do fator de transcrição NF κ B.

O aumento da fração LDL-c (Figura 4) verificado neste estudo pelos ácidos graxos palmítico e esteárico apresentaram resposta semelhante entre os dois. No entanto, Hu *et al* (1999) avaliando o efeito dos ácidos graxos saturados individualmente puderam observar que os ácidos graxos butírico, capríco, caprílico e cáprico não apresentaram associação como o risco de doenças coronarianas, enquanto que os ácidos graxos láurico, mirístico, palmítico e esteárico estavam associados com aumento entre 9 e 24%.

Figura 4. Determinação da concentração sérica (média) de colesterol LDL (mg/dL) em camundongos fêmeas alimentadas com ração suplementada com tioleato, tripalmitato e triestearato por período de seis semanas. Análise estatística realizada através do teste ANOVA, pós-teste de Tukey, com $p < 0,05$.

Em contrapartida, vários estudos (HARVEY et al, 2010; HARVEY et al, 2010; THIJSEN, HORNSTRA e MENSINK, 2005) associam o uso do ácido esteárico a efeitos deletérios como: decréscimo de HDL-c; estímulo à produção de compostos pró-inflamatórios; aumento da agregação plaquetária; ativação do fator de transcrição NF κ B; aumento na concentração de fibrinogênio; acréscimo de proteína C reativa e elevação da concentração de interleucina 6-pro-inflamatória (IL6). Neste trabalho, não foi encontrado decréscimo significativo de LDL-c no grupo alimentado com ração rica em ácido esteárico.

Ácidos graxos saturados possuem uma estreita relação com aumento da LDL-c no plasma sanguíneo. Enquanto que o ácido oleico, monoinsaturado é caracterizado como um ácido graxo que não estimula a elevação da LDL-c, podendo estar relacionado com o decréscimo da mesma. No estudo de Krieglstein *et al* (2010) não houve formação da placa aterosclerótica com uso de trioleato administrado por dieta, mas foram detectadas mudanças severas no tecido cardíaco, sendo possível demonstrar apoptose em cardiomiócitos causados por ácido oleico de forma dose-dependente. Este fato está relacionado com a ativação da enzima PP2C α e β pelo ácido oleico por possuir uma estrutura específica. A ativação da PP2C está relacionada com apoptose de várias células, incluindo células do endotélio vascular e tecido cardíaco.

Pelo mesmo mecanismo descrito acima, PP2C pode induzir apoptose de neurônios, astrócitos, células endoteliais e macrófagos (HUFNAGEL et al, 2008; KRIEGLSTEIN et al, 2008; SCHWARZ et al, 2006; KLUMPP, THISSEN e KRIEGLSTEIN, 2006; HUFNAGEL et al, 2005; KLUMP et al, 2002).

Fujiyama-Fujiwara e Igarashi (1994) relataram em seus trabalhos que o ácido oleico eleva a produção de apoB, além de regular a secreção de VLDL, aumentando a mesma.

Como demonstrado neste trabalho, a fração LDL-c da ração com ácido oleico (Figura 4) está elevada assim como no trabalho de Krieglstein et al (2010) que utilizou dieta com 24% de trioleto em modelo animal. Além deste achado, Krieglstein et al (2010) observaram também depósitos de lipídios ao longo de artérias e este acúmulo pode ter acarretado a diferenciação de lipoproteínas intermediárias (IDL-c) provenientes de VLDL, em LDL-c.

No estudo de Park et al (2003), o ácido oleico apresentou capacidade de elevar a expressão do mRNA do fator de constrição vascular endotelina-1, um antagonista do óxido nítrico, através da ativação da proteína C quinase e fator de transcrição NF κ B.

Outros fatores independentes para eventos cardiovasculares é o aumento de TAG e redução de HDL-c (KATCHER et al, 2009).

Evidências de vários estudos epidemiológicos embasam uma associação independente entre os níveis de TAG e incidência de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares (LABREUCHE et al, 2010).

Diversos estudos compararam dietas com elevado teor de ácido esteárico ou dietas contendo teores elevados de ácido oleico, sendo que a substituição do ácido oleico pelo ácido esteárico resulta em expressivo aumento da LDL-c, diminuição da HDL-c e aumento de TAG (BERRY, MILLER e SANDERS, 2007; THIJSEN e MENSINK, 2005).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram essa associação, pois não obtivemos diferença entre os animais que consumiram trioleato, tiestearato e tripalmitato, em relação ao grupo controle (Figuras 4, 5 e 6).

A figura 5 sumariza o resultado dos quatro grupos em relação ao colesterol total, onde se pode visualizar que os três grupos que receberam os ácidos graxos oleico, palmítico e esteárico apresentaram mesmo nível de colesterol, sendo esses superiores ao grupo controle. Ressalta-se que o colesterol total engloba HDL-c, IDL-c e demais frações.

Figura 5. Determinação da concentração sérica (média) de colesterol total (mg/dL) em camundongos fêmeas alimentadas com ração suplementada com tioleato, tripalmitato e triestearato por período de seis semanas. Análise estatística realizada através do teste ANOVA, pós-teste de Tukey, com $p < 0,05$.

Como o colesterol total engloba as frações HDL-c, LDL-c e outras, foram realizadas as avaliações destas frações.

TAG podem ser transportados por lipoproteínas, em seu núcleo. A hidrólise de TAG presentes ocorre quando são submetidos à ação da lipase lipoproteica, liberando ácidos graxos. Lipoproteínas ricas em TAG podem estar mais suscetíveis à oxidação, o que poderia contribuir para a gênese da aterosclerose. Outro fator é que o pico de síntese de TAG após uma refeição

rica em lipídios está associado a uma disfunção endotelial transitória, o qual precede a formação da lesão aterosclerótica. TAG estimula a expressão de moléculas de adesão endotelial e promove a quimiotaxia a macrófagos (BOULLART, GRAAF e STALENHOEF, 2012; BAE et al, 2001).

Figura 6. Determinação da concentração sérica (média) de triacilglicerol (mg/dL) em camundongos fêmeas alimentadas com ração suplementada com tioleato, tripalmitato e triestearato por período de seis semanas. Análise estatística realizada através do teste ANOVA, pós-teste de Tukey, com $p < 0,05$.

Oosterveer et al (2009), ao conduzirem pesquisa com camundongos alimentados com dieta rica em ácidos graxos saturados observaram que a contribuição de TAG no processo aterogênico pode estar no fato dessas partículas serem carreadoras de ácidos graxos tanto saturados como insaturados. São passíveis de hidrólise e oxidação, podendo liberar ácidos graxos saturados na corrente sanguínea ou sofrerem oxidação quando internalizadas em lipoproteínas e dessa forma contribuir para a gênese do processo aterosclerótico. Neste estudo foi encontrado resultado onde a concentração de TAG foi aproximadamente 80% maior que o grupo controle.

Da mesma forma, como pôde ser observado na figura 6, os grupos que receberam dietas ricas em ácidos graxos saturados, tiveram um aumento na síntese de TAG em relação ao grupo controle. Este resultado coincide com os resultados apresentados no trabalho descrito acima.

5.4. Perfil lipídico do tecido hepático

O perfil lipídico do tecido hepático foi realizado através de metodologia utilizando cromatografia gasosa, em triplicata. A tabela 4 detalha o perfil de ácidos graxos do tecido hepático.

Tabela 4. Perfil de ácidos graxos do tecido hepático (g/100g) de camundongos fêmeas, alimentadas com rações (*ad libitum*) suplementadas com ácidos graxos (TO, TP e TE), por período de seis semanas.

Fórmula	Nome	Controle	TO	TP	TE
14 : 0	Mirístico	0,08 ± 0,03	0,09 ± 0,03	0,20 ± 0,16	0,10 ± 0,03
16 : 0	Palmítico	3,24 ± 0,53	3,02 ± 0,70	4,45 ± 0,93	3,26 ± 0,87
16 : 1 (n-7)	Palmitoleico	—	1,40 ± 0,58	2,19 ± 0,82	0,98 ± 0,28
17 : 0	Margárico	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,05 ± 0,05	0,02 ± 0,01
18 : 0	Estearico	0,69 ± 0,22	0,69 ± 0,28	0,91 ± 0,35	0,73 ± 0,26
18 : 1 (n-9)	Oleico	5,28 ± 1,08	12,24 ± 2,51	12,69 ± 3,10	5,91 ± 1,23
18 : 2 (n-6)	Linoleico	2,63 ± 0,95	2,94 ± 0,89	3,48 ± 0,93	1,70 ± 0,48
20 : 1 (n-9)	Eicosenóico	0,05 ± 0,01	0,09 ± 0,07	0,07 ± 0,02	0,05 ± 0,01
18 : 3 (n-3)	α-Linolênico	0,06 ± 0,02	0,17 ± 0,06	0,22 ± 0,08	0,09 ± 0,03
22 : 0	Docosanóico	0,21 ± 0,02	0,04 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,07 ± 0,00
20 : 4 (n-6)	Araquidônico	0,66 ± 0,17	1,23 ± 0,53	1,56 ± 0,76	0,70 ± 0,25

Fórmula	Nome	Controle	TO	TP	TE
20 : 5 (n-3)	Eicosapentaenóico	0,04 ± 0,03	—	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,00
22 : 5 (n-6)	Docosapentaenóico	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00
22 : 6 (n-3)	Docosahexaenóico	—	0,66 ± 0,30	1,42 ± 0,50	0,42 ± 0,17

Análise estatística realizada através do teste ANOVA (média e desvio padrão), pós teste de Tukey, com $p < 0,05$.

Foi realizado com o intuito de observar incorporação de ácidos graxos e a provável conversão de ácido esteárico a ácido oleico.

Foram evidenciados os quatro ácidos graxos enfatizados neste estudo: ácido linoleico, ácido oleico, ácido esteárico e ácido palmítico, apresentados nas figuras 7, 8, 9 e 10.

O grupo TE obteve decréscimo em relação aos demais, quando se considera a quantidade de ácido linoleico no tecido.

Figura 7. Determinação da quantidade (média) de ácido linoleico (g/100g), no tecido hepático de camundongos fêmeas alimentadas com ração suplementada com tioleato, tripalmitato e triestearato por período de seis semanas. Análise estatística realizada através do teste ANOVA, pós-teste de Tukey, com $p < 0,05$.

A quantidade de ácido palmítico, como era de se esperar, apresentou-se elevada no grupo TP ocasionando diferenças estatísticas entre este e os demais grupos (Figura 7).

Figura 8. Determinação da quantidade (média) de ácido palmítico (g/100g), no tecido hepático de camundongos fêmeas alimentadas com ração suplementada com trioleato, tripalmitato e triestearato por período de seis semanas. Análise estatística realizada através do teste ANOVA, pós-teste de Tukey, com $p < 0,05$.

Não houve diferença estatística entre os grupos em relação à quantidade de ácido esteárico, não sendo comprovada a conversão, ao menos no tecido hepático, de ácido esteárico a oleico. Na figura 9 pode-se observar que os três grupos experimentais apresentam o mesmo valor de ácido esteárico, sendo inclusive, igual ao controle.

Figura 9. Determinação da quantidade (média) de ácido esteárico (g/100g) no tecido hepático de camundongos fêmeas alimentadas com ração suplementada com trioleato, tripalmitato e triestearato por período de seis semanas. Análise estatística realizada através do teste ANOVA, pós-teste de Tukey, com $p < 0,05$.

Estudos demonstram que na presença de enfermidades ou pequenas alterações fisiológicas, a taxa de conversão do ácido esteárico a oleico pode estar alterada (COPLAND et al, 1992).

Dobrzy, et al (2012), em experimentos realizados utilizando ratos *Wistar*, observaram aumento na concentração de ácido oleico no coração de animais alimentados com triestearato, assim como acréscimo da expressão da enzima *SCD1* (DOBRZYN et al, 2010; DOBRZYN, NTAMBI e DOBRZYN, 2008).

O argumento da utilização de ácido esteárico como um dos substitutos de ácidos graxos *trans* como sendo um ácido graxo neutro e capaz de ser convertido a oleico, nas condições apresentadas neste estudo, não foram confirmadas, como pode ser visto na figura 10, o teor de ácido oleico no tecido hepático no grupo que recebeu triestearato foi semelhante ao grupo controle (óleo de soja), enquanto os grupos tripalmitato e trioleato os teores de ácido oleico foram superiores ao controle e ao grupo TE. Havia uma expectativa de maior teor de ácido oleico no grupo TE.

Em relação ao ácido oléico, houve maior incorporação no tecido do grupo TO sem diferença estatística em relação ao grupo TP.

Verificou-se uma quantidade de palmitoléico aproximadamente 50% em relação ao ácido palmítico, no grupo TP. De acordo com Rodríguez-Cruz, González, García e Lòpez-Alarcòn (2012) descrevem que as elongases são enzimas capazes de converter o ácido palmítico a esteárico e a partir dessa elongação, sofrer dessaturação dando origem ao ácido oleico. É válido ressaltar que este comportamento foi verificado em roedores como modelo animal.

Figura 10. Determinação da quantidade (média) de ácido oleico (g/100g) no tecido hepático de camundongos fêmeas alimentadas com ração suplementada com trioleato, tripalmitato e triestearato por período de seis semanas. Análise estatística realizada através do teste ANOVA, pós-teste de Tukey, com $p < 0,05$.

Em relação ao ácido oleico, os grupos TO e TP não apresentaram diferenças estatísticas entre si, mas diferentes entre os demais grupos.

5.5. Perfil lipídico tecido cardíaco

O tecido cardíaco, por natureza, possui baixa concentração de lipídios em sua estrutura.

A tabela (Tabela 5) abaixo descreve a quantidade dos ácidos graxos palmítico, esteárico, linoleico, oleico, araquidônico e docosahexaenóico, pois estes se apresentam em maior concentração no tecido cardíaco, não apresentando diferença estatística significativa, indicando que não houve incorporação dos ácidos graxos em estudo nos grupos suplementados com os mesmos.

Tabela 5. Perfil de ácidos graxos do tecido cardíaco (g/100g) de camundongos fêmeas, alimentadas com rações (*ad libitum*) suplementadas com ácidos graxos (TO, TP e TE), por período de seis semanas, em triplicata.

Fórmula	Nome	Controle	TO	TP	TE
16 : 0	Palmitico	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,06	0,13 ± 0,03
18 : 0	Estearico	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,06	0,13 ± 0,01
18 : 1 (n-9)	Oleico	0,18 ± 0,03	0,19 ± 0,02	0,15 ± 0,09	0,20 ± 0,09
18 : 2 (n-6)	Linoleico	0,15 ± 0,02	0,10 ± 0,00	0,15 ± 0,09	0,13 ± 0,02
20 : 4 (n-6)	Araquidônico	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,05 ± 0,03	0,06 ± 0,01
22 : 6 (n-3)	Docosahexaenóico	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,08 ± 0,04	0,09 ± 0,00

Análise estatística realizada através do teste ANOVA (média e desvio padrão), pós teste de Tukey, com $p < 0,05$.

Isso pode indicar a seletividade do tecido cardíaco e a capacidade em manter sua integridade mesmo diante de altas concentrações de ácidos graxos.

5.6. Peroxidação lipídica (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)

Os resultados obtidos neste estudo não descrevem elevação da peroxidação lipídica no tecido hepático e cerebral, como demonstrado nas figuras 11 e 12, apresentados a seguir.

Como descrito anteriormente, a aterosclerose é um processo complexo. Uma atenção maior tem sido dada à formação de peróxidos como um dos fatores que prejudicam o funcionamento vascular e estimulando o desencadeamento de cascatas imunológicas.

Figura 11. Determinação da concentração (média) de TBARS (nMol/mg ptn), no tecido hepático de camundongos fêmeas alimentadas com ração suplementada com trioleato, tripalmitato e triestearato por período de seis semanas. Análise estatística realizada através do teste ANOVA, pós-teste de Tukey, com $p < 0,05$.

Figura 12. Determinação da concentração (média) de TBARS (nMol/mg ptn), no tecido cerebral de camundongos fêmeas alimentadas com ração suplementada com trioleato, tripalmitato e triestearato por período de seis semanas. Análise estatística realizada através do teste ANOVA, pós-teste de Tukey, com $p < 0,05$.

Um dado interessante é a correlação entre níveis de MDA e outros compostos como dosagens séricas de triacilgliceróis (TAG). Há a possibilidade da peroxidação lipídica inibir a atividade da lipase lipoprotéica e assim a hidrólise de TAG plasmático (YU et al, 2007).

Já no tecido cardíaco, a concentração de TBARS não diferiu entre os grupos. Apesar de que o acúmulo de ácidos graxos saturados no endotélio ser suficiente para induzir a lesão e disfunção endotelial, os resultados evidenciados não demonstram isso.

Figura 13. Determinação da concentração (média) de TBARS (nMol/mg ptn), no tecido cardíaco de camundongos fêmeas alimentadas com ração suplementada com trioleato, tripalmitato e triestearato por período de seis semanas. Análise estatística realizada através do teste ANOVA, pós-teste de Tukey, com $p < 0,05$.

Os dados expressos neste estudo não apresentaram diferenças significativas indicando que um ou outro ácido graxo poderia agravar a peroxidação no tecido cardíaco diante de uma dieta normocalórica enriquecida com ácidos graxos monoinsaturados, polinsaturados e saturados.

Lemieux et al (2011) demonstraram utilizando tecido cardíaco de camundongos alimentados com 8% de lipídios totais na ração, sendo que grupos receberam óleo de coco, azeite de oliva e óleo de peixe, redução na concentração de MDA no grupo que utilizou óleo de coco, rico em ácido láurico. Em sua discussão, atribui esse efeito possível à estabilidade dos ácidos graxos saturados frente à oxidação e presença de vitamina e demais antioxidantes do óleo de coco.

Nevin e Najamohan (2006), em modelo animal, utilizaram uma dieta normolípídica tendo sido a fonte de lipídios substituída por óleo de coco (*copra oil*), óleo de amendoim ou óleo virgem de coco e analisando tecido cardíaco. A explicação dada para justificar este fato coincide com a mesma descrita por Lemieux et al (2011). Além do mais, nenhuma fonte expressiva de ácidos graxos mono ou polinsaturados foi utilizada para efeito comparativo.

Em estudo utilizando ratos Wistar saudáveis, com dieta enriquecida com ácidos graxos saturados conduzido por Girard et al (2005), não houve alteração na concentração de TBARS em tecido cardíaco e também em lipoproteínas de baixa densidade que poderiam desencadear eventos ateroscleróticos quando oxidadas.

É esperado que animais alimentados com óleos ricos em ácidos graxos polinsaturados tenham um aumento na produção de peróxido de hidrogênio (ERO's) em mitocôndrias do tecido cardíaco em relação aos animais que consomem ácidos graxos saturados (RAMSEY et al, 2005).

5.7. Atividade de enzimas antioxidantes

As enzimas antioxidantes constituem uma importante parte na defesa dos organismos aeróbios contra a produção de ERO's, bem como na prevenção e reparo dos danos moleculares gerados em várias situações (MING et al, 2009; JOHNSON, 2002).

Essas enzimas formam um grupo que tem como característica estagnar o processo de propagação em cadeia dos danos ocasionados por ERO's. Elas são denominadas enzimas de detoxificação, constituindo uma segunda linha de defesa (BAFANA et al, 2011; GENESTRA, 2007).

As enzimas Catalase (CAT) e Superóxido Dismutase (SOD), em geral, são as enzimas que sofrem maior influência no processo aterosclerótico. A determinação da atividade de enzimas antioxidantes foi realizada considerando somente a enzima Catalase (CAT) e Superóxido Dismutase (SOD) (Figura 14). Essas duas enzimas foram selecionadas por se tratarem de enzimas com alteração expressiva no processo aterogênico, na ocorrência de disfunção endotelial, um dos primeiros passos desencadeadores da aterogênese. Quando o fluxo sanguíneo e as forças de cisalhamento nas paredes dos vasos tornam-se oscilatórios por algum motivo, este processo pode ser deflagrador da geração de espécies reativas assim como o ânion superóxido. Dessa forma, a atividade da SOD poderá estar alterada justamente para a dismutação do ânion superóxido possivelmente produzido em excesso (não fisiológico), dando origem ao peróxido de hidrogênio. A SOD é a primeira enzima envolvida no sistema enzimático de defesa. Assim, o segundo passo seria a alteração da atividade da CAT para a formação de moléculas de água e oxigênio (NEZAMI et al, 2011; SCHÖNFELD, e WOTJCZAK, 2008).

O estresse oxidativo vascular e a disfunção endotelial desempenham um papel crítico na aterogênese. As alterações, didaticamente, seguem os seguintes passos: produção excessiva de ERO's mediada por fatores de risco cardiovascular, incluindo o ânion superóxido; disfunção endotelial mediada pelo superóxido; redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (vasodilatador), ocasionando a produção de espécies reativas de nitrogênio; ativação de células do sistema imune, desencadeando o processo inflamatório e a inflamação vascular propriamente dita (KONIOR et al, 2011).

Entre as várias fontes em potencial da produção crônica de ERO's, está a mitocôndria, xantina oxidase, enzimas do complexo p450, óxido nítrico sintases desacopladas e enzimas do grupo NAD(P)H oxidase (não fagocíticas). Aumento da produção de ERO's e disfunção da organela estão associados com doenças cardiovasculares. Amostras da artéria aorta de pacientes portadores de aterosclerose apresentaram grande dano no DNA mitocondrial, comparado com artérias de indivíduos não ateroscleróticos (MADAMANCHI e RUNGE, 2007).

As células endoteliais também são capazes de gerar ERO's principalmente ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, sendo que o ânion superóxido é o primeiro a ser formado, já que estudos que utilizaram catalase para diminuição de produção de espécies reativa, não demonstraram resultados. Enzimas antioxidantes presentes no endotélio incluem a SOD e CAT. É válido ressaltar que a SOD dismuta o ânion superóxido a peróxido de hidrogênio, que por sua vez é degradado a hidrogênio e água pela CAT (LI e SHAH, 2004).

Ballinger et al (2002) ao pesquisarem a atividade da SOD em aortas humanas e em outros modelos animais com instalação da aterosclerose, observaram um aumento da atividade da SOD.

Didion et al (2002) demonstraram elevação da produção do ânion superóxido em modelos animais deficientes em SOD, após injúria vascular.

Em concordância com os resultados obtidos neste estudo e apresentados nas figuras 14A e 14B, Diniz et al (2004) utilizando ratos da linhagem *Wistar* alimentados com rações ricas em ácidos graxos saturados, não observaram alterações nas atividades das enzimas SOD e CAT no tecido

cardíaco Dieterich et al (2000) em estudo com humanos, verificaram que na presença de disfunção cardíaca, há elevação da atividade da CAT como uma resposta compensatória.

Como pode ser observado nas figuras 14B e 14D, houve decréscimo da atividade de enzimas antioxidantes nos grupos tratados com triestearato e tripalmitato, respectivamente, apesar de não haver diferença estatística significativa. Azevedo-Martins e Curi (2008) observaram o acúmulo de peróxido de hidrogênio e redução na atividade da catalase em culturas celulares tratadas com ácidos graxos saturados, acompanhando a tendência deste estudo.

Neste estudo, não foram observadas alterações nas atividades das enzimas SOD e CAT dos tecidos cardíaco e hepático, como mostram os gráficos abaixo, provavelmente por não ter havido estímulo à produção de ERO's seja diretamente por ácidos graxos ou processo desencadeado por disfunção endotelial, apesar de alguns grupos, isoladamente, apresentarem tendência à redução da atividade das enzimas antioxidantes em questão.

Figuras 14. Determinação da atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD (U/mg de proteína), no tecido hepático e cardíaco de camundongos fêmeas alimentadas com ração suplementada com trioleato, tripalmitato e triestearato por período de seis semanas. Figuras 14.A-SOD (Coração); 14.B-CAT (Coração); 14.C-SOD (Fígado); 14.D-CAT (Fígado). Análise estatística realizada através do teste ANOVA, pós-teste de Tukey, com $p < 0,05$.

5.8. Biomarcadores ateroscleróticos – moléculas de adesão ICAM-1, VCAM-1, CD-36 e quimiocina MCP-1

Os resultados obtidos na expressão gênica de moléculas de adesão e quimiocinas (Figuras 15, 16A e 16B, 17), alterando somente as proporções de ácidos graxos e não necessariamente o aumento da quantidade total de lipídios ofertados tornando a dieta hiperlipídica, mostra que não há impacto significativo na expressão das mesmas podendo ser um indicador indireto de que não houve lesão ou disfunção no endotélio do tecido cardíaco.

Na aterogênese, moléculas de adesão desempenham um papel crucial na progressão de todo quadro inflamatório.

As moléculas de adesão pesquisada neste estudo localizam-se na superfície endotelial, no espaço subendotelial e na superfície de macrófagos.

Além da contribuição das moléculas de adesão, a MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) é uma citocina produzida por células endoteliais, mastócitos e macrófagos que colabora para o aumento da migração de monócitos que, posteriormente, se diferenciarão em macrófagos capazes de expressar moléculas de adesão para internalizar partículas oxidadas de LDL-c dando origem às células espumosas ou comumente denominadas “foam cells” (KENEDDY et al, 2013; LINIC et al, 2013).

Figura 15. Determinação da razão da expressão do gene da MCP-1 e gene normalizador, no tecido cardíaco de camundongos fêmeas alimentadas com ração suplementada com trioleato, tripalmitato e triestearato por período de seis semanas. Análise estatística realizada através do teste ANOVA, pós-teste de Tukey, com $p < 0,05$.

Em modelo animal similar ao utilizado neste estudo, Coenen et al (2007) demonstraram que submetidos a dieta hiperlipídica ou normolipídica os animais apresentaram aumento na migração de macrófagos no tecido adiposo, sendo este evento mais pronunciado na dieta hiperlipídica.

Em humanos, Nappo e seus colaboradores (2002) e Libby (2002) observaram aumento na expressão de moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM-1), citocinas como IL-6 e TNF- α com posterior redução da Óxido Nítrico Sintase-endotelial (eNOS) após o consumo de dieta hiperlipídica.

As informações apresentadas nas figuras 15, 16A e 16B mostram que não houve diferença estatística significativa na quimiocina MCP-1 e nas moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 e essas informações sendo relacionadas à peroxidação lipídica no tecido cardíaco (Figura 13) e atividade de enzimas antioxidantes no mesmo tecido (Figuras 14A e 14B), pode-se inferir que o processo inflamatório relacionado à aterogênese, com ativação de fatores de transcrição pró-inflamatórios, produção de ERO's e citocinas não foi desencadeado.

Circunstâncias como o consumo de ácidos graxos saturados podem induzir à inflamação endotelial com o aumento do fator de transcrição NF κ B relacionado com processo inflamatório. Uma das vias possíveis onde os ácidos graxos saturados induzem a inflamação celular é através da geração do ânion superóxido por enzimas da família das NADPH oxidases (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate oxidase - NOXs). Culturas de células endoteliais expostas a altos níveis de ácidos graxos aumentam a síntese de NOXs tendo um papel central na resposta inflamatória principalmente induzida pelo ácido palmítico. Citocinas pró-inflamatórias como IL-6, citocinas quimiotática (MCP-1) e moléculas de adesão como ICAM e VCAM têm seus níveis aumentados à exposição aos ácidos graxos saturados (LOTTENBERG et al, 2012; KIM et al, 2008; KIM et al, 2007; BEDARD e KRAUSE, 2007; ARTWOHL et al, 2004; INOGUCHI et al, 2000).

Os ácidos graxos saturados promovem um aumento na expressão e secreção de citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF- α) e do fator de transcrição NF κ B. Esses ácidos graxos são capazes de se ligar ao receptor *Toll Like Receptor 4* (TLR-4) que faz parte de uma via inflamatória em macrófagos, induzindo a produção de quimiocinas e citocinas pro-inflamatórias, contribuindo para a super expressão da MCP1, alimentando o processo inflamatório com maior recrutamento de monócitos ao sítio inflamatório (YOUSSEF-ELABD et al, 2012; BRADLEY, FISHER e MARATOS-FLIER, 2008; COENEN et al, 2007; SUGANAMI et al, 2007) .

Maloney et al (2009) descrevem em suas pesquisas que a exposição constante de células endoteliais tanto em concentrações fisiológicas quanto a altas taxas de ácidos graxos desencadeiam produção de superóxido via NOXs e aumento na expressão das citocinas e moléculas de adesão citadas acima.

Fujiyama et al (2007) descreve que ácidos graxos saturados possuem a capacidade de promover a captação seletiva da LDL-c na parede arterial. Desta forma, a LDL-c estaria suscetível à oxidação e dando início a cascata para a formação do ateroma. Além disso, foi observado em estudo conduzido por este mesmo grupo utilizando quantidade próxima do recomendado de lipídios totais, que animais que consumiram manteiga obtiveram maior número de linfócitos aderindo aos microvasos da mucosa do intestino delgado e maior expressão de ICAM-1 e VCAM-1, possivelmente estimulada pelo maior número de linfócitos, o que não foi evidenciado nos grupos que receberam ácido oleico e ácido linoleico.

Os dados descritos por Maloney et al (2009) e Fujiyama et al (2007) contradizem as informações expostas nesse trabalho que em uma situação de

dieta normolipídica, mesmo com porcentagem elevada de ácidos graxos, não há expressiva indução de moléculas de adesão e quimiocinas.

Ao passo que ácidos graxos monoinsaturados e da família ω -3 podem exercer papel protetor no endotélio vascular, ácidos graxos poli-insaturados, especificamente ácido linoleico, podem desempenhar um papel crucial no desenvolvimento de um quadro de inflamação arterial subclínica. O mecanismo proposto é a ativação do fator de transcrição NF κ B em células endoteliais estimulando a expressão de moléculas de adesão e citocinas pró-inflamatórias (HENNING et al, 2000).

Estudos pregressos determinaram o aumento de expressão da ICAM-1 em células endoteliais quando incubadas com ácido linoleico, além de citocinas pró-inflamatórias e TNF- α , que estimula a expressão de moléculas de adesão. Da mesma forma, a exposição de células endoteliais a uma concentração de 100 μ mol/L de ácido linoleico, o que pode ser considerada uma expressiva concentração, também demonstrou elevação na expressão da molécula de adesão VCAM-1, dependente do fator de transcrição NF κ B, como demonstrado por Dichtl e seus colaboradores (2002).

O ácido linoleico está associado à síntese do ácido araquidônico, podendo estar relacionado com a formação de eicosanoides pró-inflamatórios, ocasionando aumento de outros marcadores inflamatórios. Mas, nos estudos onde foram detectados aumento na expressão de fatores pró-inflamatórios e moléculas de adesão, as doses de ácido linoleico foram elevadas. Em situações de dosagens fisiológicas, não houve aumento na expressão dos marcadores supracitados, assim como neste estudo (JOHNSON e FRITSCHKE, 2012).

Figuras 16A e 16B. Determinação da razão da expressão dos genes ICAM-1 (16A), VCAM-1 (16B) e gene normalizador, no tecido cardíaco de camundongos fêmeas alimentadas com ração suplementada com trioleato, tripalmitato e triestearato por período de seis semanas. Análise estatística realizada através do teste ANOVA, pós-teste de Tukey, com $p < 0,05$.

Uma dieta hiperlipídica possui a capacidade de aumentar a adesão de monócitos às células endoteliais (MOTOJIMA et al, 2008). Em indivíduos saudáveis, uma única refeição hiperlipídica pode aumentar a lesão endotelial e elevar de forma aguda os marcadores pró-inflamatórios (CERIELLO et al, 2004; NAPPO et al, 2002; CERIELLO et al, 2002).

Nicholls et al (2006) desenvolveram uma investigação em humanos aplicando uma dieta hiperlipídica e rica em saturados (óleo de coco) onde foi observado aumento dos níveis das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 em relação a dieta hiperlipídica e rica em poli-insaturados.

Em nosso estudo, como evidenciado na figura 17, em relação ao CD-36 houve diferença significativa somente no grupo suplementado com trioleato com valores inferiores em relação aos demais. Considerando que o CD-36 possui o papel de auxiliar não somente na internalização de ox-LDL, mas também no influxo de demais ácidos graxos nos tecidos, sendo o principal transportador de ácidos graxos na membrana plasmática de cardiomiócitos (KOK e BRINDLEY, 2012; FEBBRAIO e SILVERSTEIN, 2007; Vallvé et al, 2002), algumas vias podem sugerir o porque dessa ocorrência. Nos tecidos,

em geral, o ácido oleico possui uma alta solubilidade sendo capaz de atravessar a membrana celular sem necessitar de transportadores que auxiliem no seu influxo, como poderia se o papel do CD-36 (KAMP et al, 2003).

Se forem feitas correlações com a quantidade de ácido oleico no tecido cardíaco, será notado que não houve diferenças estatísticas em relação aos outros grupos, demonstrando que a quantidade de ácido oleico neste tecido poderia corroborar com os estudos de Dobrzyn et al (2012), Vallvé et al (2002) Farràs et al (2012), o que não aconteceu. É válido ressaltar que nos dois primeiros estudos citados, foram utilizadas culturas celulares, com isolamento de macrófagos, sendo que em nosso estudo foi utilizado o sino aórtico que possui uma estrutura tecidual mais complexa.

Figura 17. Determinação da razão da expressão do gene do CD-36 e gene normalizador, no tecido cardíaco de camundongos fêmeas alimentadas com ração suplementada com trioleato, tripalmitato e triestearato por período de seis semanas. Análise estatística realizada através do teste ANOVA, pós-teste de Tukey, com $p < 0,05$.

triestearato e trioleato onde observaram que houve aumento na expressão de CD-36 em tecido cardíaco, através do aumento do uso desses ácidos graxos como substrato energético, aumentando a taxa de oxidação mitocondrial e uma

super expressão de genes envolvidos na oxidação lipídica e decréscimo na absorção de glicose e de mediadores do metabolismo glicolítico.

Vallvé et al (2002) após ensaios com culturas celulares incubadas com ácidos graxos saturados, ácido oleico e ácido linoleico, obtiveram como resultado o acréscimo da expressão do CD-36 em macrófagos quando incubados com ácido oleico, devido a sua oxidação, sendo este um estímulo direto. Ácidos graxos saturados não estimularam relevante expressão gênica.

Diante da presença de ox-LDL, Farràs et al (2013) em estudo realizado em humanos administrando azeite de oliva virgem com alto e moderado teor de fenólicos, constatou que houve acréscimo da expressão gênica do CD-36 via aumento na expressão de co-ativador de PPAR γ .

Considerando somente os grupos tratados, pode-se afirmar que não houve nenhum estímulo capaz de elevar a expressão do gene do CD-36, como lipoproteínas oxidadas e demais lipídios oxidados ou até mesmo ácidos graxos individualizados que poderiam desempenhar o papel de estimular a expressão do gene em estudo.

6. Considerações finais

Os trabalhos, em sua maioria, enfatizam que o perfil de ácidos graxos possui relação direta com a manutenção da integridade de tecidos como coração e fígado, além de outras estruturas evidenciadas em análises bioquímicas.

Ácidos graxos monoinsaturados ou polinsaturados, em geral, apresentam influência no decréscimo de lipoproteínas relacionadas com processo aterogênico. Em contra partida, ácidos graxos saturados, destacando-se os de cadeia longa, geralmente estão relacionados com lesão tecidual, incluindo o endotélio cardíaco, além da disfunção do mesmo tecido.

Por outro lado, alguns grupos de pesquisadores já voltaram os olhares para o excesso do consumo de ácidos graxos insaturados, que por sua suscetibilidade à oxidação podem ocasionar o aumento de peroxidação em tecidos além de elevar a expressão de moléculas de adesão relacionadas a processos oxidativos.

Além desta observação, o fato de se consumir uma dieta hiperlipídica ou normolipídica pode agravar ou amenizar efeitos deletérios. Dietas hiperlipídicas acompanhadas de quantidades expressivas de ácidos graxos saturados, exarcebam processos relacionados à aterogênese.

Já o consumo de uma dieta normolipídica, mesmo associada a quantidades expressivas de ácidos graxos saturados parece não provocar o mesmo efeito deletério em condições determinadas, como descritas neste estudo.

Sendo assim, o efeito pró-aterogênico dos ácidos graxos está mais relacionado à quantidade total de lipídios consumidos associada ao tipo de ácido graxo do que somente ao ácido graxo.

Por essas considerações, esta tese foi elaborada dentro da perspectiva de se buscar maiores informações sobre os efeitos dos ácidos graxos oleico, palmítico e esteárico sobre os biomarcadores dos processos ateroscleróticos, estando apresentadas a seguir as conclusões dos resultados experimentais obtidos.

7. Conclusões

- ✓ Neste estudo sob as condições descritas, o perfil de ácidos graxos no tecido hepático não evidenciou a conversão do ácido esteárico ao ácido oleico, uma alegação dita benéfica e que justificaria o aumento da utilização do ácido esteárico, no processamento de alimentos.
- ✓ Já o perfil de ácidos graxos do tecido cardíaco mostrou que não houve incorporação dos ácidos graxos ofertados, mostrando a capacidade do tecido em manter sua integridade.
- ✓ Pelos resultados obtidos pôde-se confirmar que os ácidos graxos saturados estimulam a síntese de TAG, sendo considerado um fator de risco isolado para doenças cardiovasculares.
- ✓ O ácido palmítico reduziu a concentração de HDL-c. O ácido esteárico, em relação ao ácido palmítico, não apresentou redução significativa, mas tende a acompanhar o comportamento do ácido palmítico.
- ✓ A LDL-c estava elevada nos grupos TE, TO e TP. O estímulo de ácidos graxos saturados já era um resultado esperado. O ácido oleico, tido como ácido graxo protetor, no entanto, neste modelo contribuiu também para elevação de LDL-c.
- ✓ A peroxidação lipídica, assim como, as enzimas SOD e CAT não apresentaram alterações que poderiam indicar ausência de disfunção endotelial.
- ✓ As moléculas de adesão, VCAM-1, ICAM-1 e CD-36, que estão relacionadas com processo aterogênico, não apresentaram alteração significativa, mais uma vez indicando que o processo inflamatório relacionado com a aterogênese, neste modelo, não foi desencadeado.

8. Referências Bibliográficas

ABBAS, A.M.; SAKR, H.F. Simvastatin and vitamin E effects on cardiac and hepatic oxidative stress in rats feed on high fat diet. **J Physiol Biochem**, *In press*, 2013.

AFONSO, V. et al. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. **Joint, Bone, Spine**, v.74, n.4, p.324-329, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Governo do Brasil, 2003.
<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/legis/especifica/rotuali.htm>

AL-ISA, A.N.; THALIBA, L.; AKANJIB, A.O. Circulating markers of inflammation and endothelial dysfunction in Arabadolescent subjects: Reference ranges and associations with age, gender, body mass and insulin sensitivity. **Atherosclerosis**, v.208, p.543–49, 2010.

AL-OTHMAN, A.A. Growth and lipid metabolism responses in rats fed different sources. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.51, p.159-167, 2000.

ALVES-BEZERRA, M.; GONDIM, K. Triacylglycerol biosynthesis occurs via the glycerol-3-phosphate pathway in the insect *Rhodnius prolixus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1821, p.1462-71, 2012.

ANDREYEV, A.Y.; KUSHNAREVA, Y.E.; STARKOV, A.A. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. **Biochemistry (Moscow)**, v.70, n.2, p.200-14, 2005.

ANSELL, B.J. *et al.* High-density lipoprotein function. **Journal of the American College of Cardiology**, v.46, n.10, p.1792-8, 2005.

ARAKELYAN, A. *et al.* Serum levels of the MCP-1 chemokine in patients with ischemic stroke and myocardial infarction. **Mediators Inflamm**, v.2005, p.175-9, 2005.

ARTWOHL, M. *et al.* Free fatty acids trigger apoptosis and inhibit cell cycle progression in human vascular endothelial cells. **Faseb J**, v.18, p.146-8, 2004.

ARYA, A.K. Correlation between IL-7 and MCP-1 in diabetic chronic non healing ulcer patients at higher risk of coronary artery disease. **Cytokine**, v.60, p.767-71, 2012.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, n.996.06, cap.41, p.20-4A, 2002.

AZEVEDO-MARTINS, A.K.; CURI, R. Fatty acids decrease catalase activity in human leukaemia cell lines. **Cell Biochem Funct**, v.26, p.87-94, 2008.

BAE, J.H. *et al.* Postprandial hypertriglyceridemia impairs endothelial function by enhanced oxidant stress. **Atherosclerosis**, v.155, p.517-23, 2001.

BAER, D.J. *et al.* Dietary fatty acids affect plasma markers of inflammation in health men fed controlled diets: a randomized crossover study. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.79, p.969-73, 2004.

BAER, D.J. *et al.* Stearic acid absorption and its metabolizable energy value are minimally lower than those of other fatty acids in healthy men fed mixed diets. **J. Nutr.**, v.133, p.4129-34, 2009.

BAFANA, A. *et al.* The basic and applied aspects of superoxide dismutase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.68, p.129-38, 2011.

BALLINGER, S.W. *et al.* Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. **Circulation**, v.106, p.544-49, 2002.

BASKIN, Y. *et al.* The inversely proportional relation between nitric oxide and lipid peroxidation in atherosclerotic plaque formation in human. **International Journal of Cardiology**, v.91, p.53-7, 2003.

BEDARD, K.; KRAUSE, K.H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiol Rev**, n. 87, p.245-313, 2007.

BERMUDEZ, B. *et al.* Influence of postprandial triglyceride-rich lipoproteins on lipid-mediated gene expression in smooth muscle cells of the human coronary artery. **Cardiovasc. Res.**, v.79, p.294-303, 2008.

BERRY, S.E.E.; MILLER, G.J.; SANDERS, T.A.B. The solid fat content of stearic acid-rich fats determines their postprandial effects. **Am J Clin Nutr**, v.85, p.1486-94, 2007.

BEUTLER, E. Red Cell Metabolism. In: **Manual of Biochemical Methods**. 2 ed. New York: Grune e Stratton, 1975, p.89-90.

BIEGHS, V. *et al.* NASH and atherosclerosis are two aspects of a shared disease: Central role for macrophages. **Atherosclerosis**, v.220, p.287-93, 2012.

BLANCO-COLIO, L.M. *et al.* Elevated ICAM-1 and MCP-1 plasma levels in subjects at high cardiovascular risk are diminished by atorvastatin treatment. Atorvastatin on Inflammatory Markers study: A substudy of Achieve Cholesterol Targets Fast with Atorvastatin Stratified Titration. **Am Heart J**, v.153, p.881-8, 2007.

BLANKENBERG, S.; BARBAUX, S; TIRET, L. Adhesion molecules and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v.170, p.191-203, 2003.

BOBRYSHEV, Y. Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. **Micron**, v.37, p.208-22, 2006.

Bochkov, V. N. *et al.* Generation and biological activities of oxidized phospholipids. **Antioxid.Redox Signal**, v.12, p.1009–59, 2010.

BONANOME, A.; BENNETT, M.; GRUNDY, S.M. Metabolic effects of dietary stearic acid in mice: changes in the fatty acid composition of triglycerides and phospholipids in various tissues. **Atherosclerosis**, v.94, p.119-27, 1992.

BONETTI, P.O.; LERMAN, L.O.; LERMAN, A. Endothelial dysfunction – A marker oftherosclerotic risk. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.23, p.168-75, 2003.

BORGE, G.I.; SLINDE, E.; NILSSON, A. Long-chain saturated fatty acids can be α -oxidised by a purified enzyme (M_r 240 000) in cucumber (*Cucumis sativus*). **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1344, p. 47–58, 1997.

BOTHAM, K. *et al.* Direct interaction of dietary lipids carried in chylomicron remnants with cells of the artery wall: implications for atherosclerosis development. **Curr. Pharm. Des.**, v.11, p.3681-95, 2005.

BOULLART, A.C.I.; GRAAF, J.; STALENHOEF, A.F. Serum triglycerides and risk of cardiovascular disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1821, p.867-75, 2012.

Bradley, R.L.; Fisher, F.M.; Maratos-Flier, E. Dietary fatty acids differentially regulate production of TNF- α and IL-10 by murine 3T3-L1 adipocytes. **Obesity**, v.16, p.938–44, 2008.

BRUNALDI, K.; HUANG, N.; HAMILTON, J.A. Fatty acids are rapidly delivered to and extracted from membranes by methyl- β -cyclodextrin. **J. Lipid Res.**, v.51, p.120-31, 2010.

BUHMAN, K.K. *et al.* DGAT1 is not essential for intestinal triacylglycerol absorption or chylomicron synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, n.28, p.25474-79, 2002.

BULLO, M.; LAMUELA-RAVENTOS,R.; SALAS-SALVADO,J. Mediterranean diet and oxidation: nuts and olive oil as importante sources of fat and antioxidants. **Curr Top Med Chem**, v.11, p.1797-1810, 2011.

CABRÉ, A. *et al.* Cytotoxic effects of the lipide peroxidation product 2,4-decadienal in vascular smooth muscle cells. **Atherosclerosis**, v.169, p.245-50, 2003.

CAMILLERI, M. Integrated upper gastrointestinal response to food intake. **Gastroenterology**, v.131, p.640-58, 2006.

CAO, J. *et al.* A predominant role of acyl-CoA:monoacylglycerol acyltransferase-2 in dietary fat absorption implicated by tissue distribution, subcellular localization and up-regulation by high fat diet. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, n.18, p.18878-86, 2004.

CARRÉON-TORRES, E. *et al.* Pioglitazone increases the fractional catabolic and production rates of high-density lipoproteins apo AI in the New Zealand White Rabbit. **Atherosclerosis**, v.181, p.233-40, 2005.

CARTHCART, M.K. Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages – Contributions to atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.24, p.23-8, 2004.

CERIELLO, A. *et al.* Effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on circulating adhesion molecules and oxidative stress generation and the possible role of simvastatin treatment. **Diabetes**, v.53, p.701-10, 2004.

CERIELLO, A. *et al.* Evidence for an independent and cumulative effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on endothelial dysfunction and oxidative stress generation: effects of short and long-term simvastatin treatment. **Circulation**, v. 106, p.1211-8, 2002.

CHANG, C.L. *et al.* n-3 fatty acids reduce arterial LDL-cholesterol delivery and arterial lipoprotein lipase levels and lipase distribution. **Arterioscler. Thromb.**, v.29, p.555-61, 2009.

CHEGARY, M. *et al.* Mitochondrial long chain fatty acid β -oxidation in man and mouse. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1791, p.806–15, 2009.

CHEN, W. *et al.* Amelioration of atherosclerosis by tanshinone IIA in hyperlipidemic rabbits through attenuation of oxidative stress. **European Journal of Pharmacology**, n.674, p.359-64, 2012.

CHONG, E.W.T.; SINCLAIR, A.J.; GUYMER, R. Facts on fats. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, v.34, p.464-471, 2006.

COENEN, K.R. *et al.* Diet-induced increases in adiposity, but not plasma lipids, promote macrophage infiltration into white adipose tissue. **Diabetes**, v.56, p.564-73, 2007.

CONSTANTS, J.; CONRI, C. Circulatin markers of endothelial function in cardiovascular disease. **Clinica Chimica Acta**, v.368, p.33-47, 2006.

COPLAND, S.A. *et al.* Altered platelet stearic to oleic acid ratio in malignancy. **Eur J Cancer**, v.28A, n.6/7, p.1135/37, 1992.

CUPP, D.; KAMPF, P.; KLEINFELD, A.M. Fatty acid-albumin complexes and the determination of the transport of long chain free fatty acids across membranes. **Biochemistry**, v.43, p.4473-81, 2004.

DALEPRANE, J.B. *et al.* Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.23, p.557–66, 2012.

DAVE, J.P.; VAMECQ, J. The gluconeogenicity of fatty acids in mammals. **Trends Biochem Sci**, v.14, p.478-9, 1989.

DE LEMOS, J.A. et al. Association between levels plasma of monocyte chemoattractant protein-1 concentration and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. **Circulation**, v.107, p.690-5, 2003.

DeNIGRIS, S. et al. Lingual and gastric lipases: species differences in the origin of prepancreatic digestive lipases and in the localization of gastric lipase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.959, p.38-45, 1988.

DeNIGRIS, S. et al. Secretion of human gastric lipase from dispersed gastric glands. **Biochimica et Biophysics Acta**, v.836, p.67-72, 1985.

DEO, R. et al. Association among plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1, traditional cardiovascular risk factors and subclinical atherosclerosis. **J Am Coll Cardiol**, v.44, p.1812-8, 2004.

DICHTL, W. et al. Linoleic acid-stimulated vascular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells depends on nuclear factor-kB activation. **Metabolism**, v.51, n. 3, p. 327-33, 2002.

DIETERICH, S. et al. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart- Increased expression of catalase in the end stage failing heart. **Circulation**, v.101, p.33-9, 2002.

DINIZ, Y.S. et al. Diets rich in saturated and polyunsaturated fatty acids: metabolic shifting and cardiac health. **Nutrition**, v.20, p.230-4, 2004.

DOBRZYN, P. et al. Increased availability of endogenous and dietary oleic acid contributes to the upregulation of cardiac fatty acid oxidation. **Mitochondrion**, v.12, p.132-7, 2012.

DOBRZYN, P. et al. Loss of stearyl-CoA desaturase 1 rescues cardiac function in obese leptin-deficient mice. **J Lipid Res**, v.51, p.2202-2210, 2010.

DOBRZYN, P.; NTMABI, J.M.; DOBRZYN, A. Stearoyl-CoA desaturase: a novel control point of lipid metabolism and insulin sensitivity. **Eur J Lipid Sci Technol**, v.110, p.93-100, 2008.

DURYEE, M.J. *et al.* Malondialdehyde-acetaldehyde adduct is the dominant epitope after MDA modification of proteins in atherosclerosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v.49, p.1480-6, 2010.

DUSSERT, S. *et al.* Comparative transcriptome analysis of three oil palm fruit and seed tissues that differ in oil content and fatty acid composition. **Plant Physiol**, *In press*, 2013.

ERKKILÄ, A. *et al.* Dietary fatty acids and cardiovascular disease: An epidemiological approach. **Progress in Lipid Research**, v.47, p.172-87, 2008.

FARRÀS, M. *et al.* Olive oil polyphenols enhance the expression of cholesterol efflux related genes in vivo in humans - A randomized controlled trial. **Journal of Nutritional Biochemistry**, *IN PRESS*, 2013.

FEBBRAIO, M.; HAJJAR, D.P.; SILVERSTEIN, R.L. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. **J. Clin. Invest.**, v.108, p.785–91, 2001.

FEBBRAIO, M.; SILVERSTEIN, R.L. CD36: Implications in cardiovascular disease. **IJBCB**, v.39, p.2012-30, 2007.

FERNANDES, F.S. *et al.* Dietary lipids during early pregnancy differently influence adipose tissue metabolism and fatty acid composition in pregnant rats with repercussions on pup's development. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.86, p.167–174, 2012.

FLANIGAN, T.L. et al. Supraphysiologic extracellular pressure inhibits intestinal epithelial wound healing independently of luminal nutrient flow. **The American Journal of Surgery**, v.196, p.683-9, 2008.

FROST-MEYER, N.J.; LOGOMARSINO, J.V. Impact of coffee components on inflammatory markers: A review. **Journal Functional Foods**, v.4, p.819-30, 2012.

FUJIYAMA, Y. et al. Butter feeding enhances TNF- α production from macrophages and lymphocyte adherence in murine small intestinal microvessels. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.22, p.1838-45, 2007.

FUJIYAMA-FUJIWARA, Y.; IGARASHI, O. Effect of oleic, linoleic, γ -linolenic, and α -linoleic acids on VLDL-TG and cholesterol synthesis in rat primary cultured hepatocytes. **Pathophysiology**, v.1, p.143-9, 1994.

GAGLIARDI, A.C.M.; MANCINI-FILHO, J.; SANTOS, R.D. Perfil nutricional de alimentos com alegação de zero gordura trans. **Rev Assoc Med Bras**, v.55, n.1, p.50-3, 2009.

Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.27, p.2292-301, 2007.

GARNER, B. *et al.* Oxidation of high density lipoproteins. II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII. **J Biol Chem**, v.273, p.6088-95, 1998.

GENESTRA, M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. **Cellular Signalling**, v.19, p.1907-1819, 2007.

GENG, Y-J; JONASSON, L. Linking immunity to atherosclerosis: Implications for vascular pharmacology – A tribute to Göran K. Hansson. **Vascular Pharmacology**, v.56, p.29-33, 2012.

GHOSH, S. *et al.* Role of dietary fatty acids and acute hyperglycemia in modulating cardiac cell death. **Nutrition**, v.20, n.916-23, 2004.

GIRARD, A. *et al.* Changes in lipid metabolism and antioxidant defense status in spontaneously hypertensive rats and Wistar rats fed a diet enriched with fructose and saturated fatty acids. **Nutrition**, v.21, p.240-8, 2005.

GRAY, K.; BENNETT, M. Role of DNA damage in atherosclerosis- Bystander or participant?. **Biochemical Pharmacology**, v.82, p.693-700, 2011.

GREIG, F.H; KENNEDY, S.; SPICKETT, C.M. Physiological effects of oxidized phospholipids and their cellular signaling mechanisms in inflammation. **Free Radical Biology & Medicine**, v.52, p.266-80, 2012.

GU, X.; LI, D. Fat nutrition and metabolism in piglets: a review. *Animal Feed Science and Technology*, v.109, p.151-70, 2003.

GUERRA, A. *et al.* Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. **Trends in biotechnology**, v.30, n.11, p.591-600, 2012.

GUPTA, M.; CHATURVEDI, R.; JAIN, A. Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) as an immune-diagnostic biomarker in the pathogenesis of chronic periodontal disease. **Cytokine**, IN PRESS, 2013.

GUZIK, T.J. *et al.* Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase – Association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. **Circ Res**, v.86, p.e85-e90, 2000.

HANSSON, G.K.; HERMANSSON, A. The immune system in atherosclerosis. **Nat. Immunol.**, v.12, p.204-12, 2011.

HARDWICK, J.P. Cytochrome P450 omega hydroxylase (CYP4) function in fatty acid metabolism and metabolic diseases. **Biochemical Pharmacology**, v.75, p.2263-75, 2008.

HARRINGTON, L.S. *et al.* Reduced endothelial dependent vasodilation in vessels from TLR4^{-/-} mice is associated with increase superoxide generation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.408, p.511-5, 2011.

HARVEY, E.J.; RAMJI,D.P. Interferon-gamma and atherosclerosis: pro or anti atherogenic? **Cardiovasc. Res.**, v.67, p.11-20, 2005.

HARVEY, K.A. *et al.* Long-chain saturated fatty acids induce pro-inflammatory responses and impact endothelial cell growth. **Clinical Nutrition**, v.29, p.492-500, 2010.

HARVEY, K.A. *et al.* Oleic acid inhibits stearic acid-induced inhibition of cell growth and pro-inflammatory responses in human aortic endothelial cells. **J. Lipid Res.**, v.51, p.3470-80, 2010.

HENNIG, B. *et al.* Fatty acid-mediated activation of vascular endothelial cells. **Metabolism**, v.49, n.8, p.1006-13, 2000.

HERMANSSON, A. *et al.* Inhibition of T cell response to native low-density lipoprotein reduces atherosclerosis. **J. Exp. Med.**, v.207, p.1081-93, 2010.

HILL, K.D.; HAMID, R.; EXIL, V.J. Pediatric cardiomyopathies related to fatty acid metabolism. **Progress in Pediatric Cardiology**, v.25, p.69-78, 2008.

HODSON, L.; SKEAFF, C.M.; FIELDING. B.A. Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. **Progress in Lipid Research**, v.47, p.348-80, 2008.

HOPKINS, A.M.; BAIRDB, A.W.; NUSRAT, A. ICAM-1: targeted docking for exogenous as well as endogenous ligands. **Advanced Drugs Delivery Reviews**, n.56, p.763-78, 2004.

HU, F.B. *et al.* Dietary saturated fats and their food sources in relation to the risk of coronary heart disease in women. **Am J Clin Nutr**, v.70, p.1001-8, 1999.

HU, Y-F. *et al.* Impact of circulating monocyte CD36 level on atrial fibrillation and subsequent catheter ablation. **Heart Rhythm**, v.8, p.650-6, 2011.

HUESCA-GÓMEZ, C. *et al.* Chronic hypothyroidism induces abnormal structure of high-density lipoproteins and impaired kinetics of apolipoprotein A-I in the rat. **Metabolism**, v.51, p.443-50, 2002.

HUFNAGEL, B. *et al.* Unsaturated fatty acids isolated from human lipoproteins activate protein phosphatase type 2C β and induce apoptosis in endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 180, p.245-54, 2005.

HUNG, C-F *et al.* Lycopene inhibits TNF- α -induced endothelial ICAM-1 expression and monocyte-endothelial adhesion. **European Journal of Pharmacology**, v.586, p.275–282, 2008.

HUNTER, J.E.; ZHANG, J.; KRIS-ETHERTON, P.M. Cardiovascular disease risk of dietary stearic acid compared with *trans*, other saturated, and unsaturated fatty acids: a systematic review. **Am J Clin Nutr**, v.91, p.46-63, 2010.

HUNTER, K.A. *et al.* A residential study comparing the effects of diets rich in stearic acid, oleic acid, and linoleic acid on fasting blood lipids, hemostatic variable and platelets in young healthy men. **J. Nutr. Biochem.**, v.11, p.408-16, 2000.

INOGUCHI, T. *et al.* High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C – dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. **Diabetes**, v.49, p.1939-45, 2000.

IQBAL, J.; HUSSAIN, M.M. Intestinal lipid absorption. **Am J Physiol Endocrinol Metab** v.296, p.E1183–E94, 2009.

ISHIYAMA, J. *et al.* Palmitic acid enhances lectin-like oxidized LDL receptor (LOX-1) expression and promotes uptake of oxidized LDL in macrophage cells. **Atherosclerosis**, v.209, p.118-24, 2010.

JACKSON, M.J. An overview of methods for assessment of free radical activity in biology. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.58, n.4, p.1001-1006, 1999.

JENTZSCH, A.M. *et al.* Improved analysis of malondialdehyde [MDA] in human body fluids. **Free Radical Biology & Medicine**, v.20, n.2, p.251-256, 1996.

JEZEK, P.; HLAVATÁ, L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues and organism. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, n.37, p.2478-2503, 2005.

JIANG, H. *et al.* Palmitic acid promotes endothelial progenitor cells apoptosis via p38 JNK mitogen-activated protein kinase pathways. **Atherosclerosis**, v.210, p.71-7, 2010.

JOHNSON, G.H.; FRITSCH, K. Effect of Dietary Linoleic Acid on Markers of Inflammation in Healthy Persons: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. **J Acad Nutr Diet**, v.112, p.1029-41, 2012.

JOHNSON, P. Antioxidant enzyme expression in health and disease: effects of exercise and hypertension. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v.133, p.493-505, 2002.

JULVE, J. et al. Human apolipoprotein A-II determines plasma triglycerides by regulating lipoprotein lipase activity and high-density lipoprotein proteome.

Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.30, p.232-8, 2010.

KAMP, F. et al. Rapid flip-flop of oleic acid across the plasma membrane of adipocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, n.10, p.7988-95, 2003.

KAPERONIS, E.A. et al. Inflammation and atherosclerosis. **Eur J Vasc Endovasc Surg**, v. 31, p.386-93, 2006.

Karabina SA et al. Atherogenic properties of LDL particles modified by human group X secreted phospholipase A2 on human endothelial cell function. **FASEB J**, v.20, p.2547–49, 2006.

KARIHTALA, P.; SOINI, Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. **APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, n.115, p.81-103, 2007.

KARUPAIAH, T. et al. The chain length of dietary saturated fatty acids affects human postprandial lipemia. **Journal of the American College of Nutrition**, v.30, n.6, p.511-21, 2011.

KATCHER, H.I. et al. Lifestyle approaches and dietary strategies to lower LDL-cholesterol and triglycerides and raise HDL-cholesterol. **Endocrinol Metab Clin N Am**, v.38, p.45-78, 2009.

KATSOULIERIS, E. et al. α -linolenic acid protects renal cells against palmitic acid lipotoxicity via inhibition of endoplasmic reticulum stress. **European Journal of Pharmacology**, v.623, p.107-12, 2009.

KAWAI, T.; FUSHIKI, T. Importance of lipolysis in oral cavity for orosensory detection of fat. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.285, p.R447-R54, 2003

KAWAKAMI A, et al. Apolipoprotein CIII induces expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vascular endothelial cells and increases adhesion of monocytic cells. **Circulation**, v.114, p.681– 87, 2006.

KELLER, J. et al. A modified ¹³C-mixed triglyceride breath test detects moderate pancreatic exocrine insufficiency. **Pancreas**, v.40, p.1201-5, 2011.

KENEDDY, S. et al. Mast cells and vascular diseases. **Pharmacology & Therapeutics**, IN PRESS, 2013.

KEYS, A.; ANDERSON, J.T.; GRANDE, F. Prediction of serum-cholesterol responses of man to changes in fats in the diet. **Lancet**, v.273, p.959-66, 1957.

KIM, C-S et al. Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. **International Journal of Obesity**, v.30, p.1347–55, 2006.

KIM, F. et al. Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. **Circ Res**, v.100, p.1589-96, 2007.

KIM, F. et al. Vascular inflammation, insulin resistance and reduced nitric oxide production precede the onset of peripheral insulin resistance. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.28, p.1982-88, 2008.

KINDEL ,T.; LEE, D.M.; TSO, P. The mechanism of the formation and secretion of chylomicrons. **Atherosclerosis Supplements**, v.11. p.11-6, 2010.

KLEINBONGARD, P.; HEUSCH, G.; SCHULZ, R. TNF α in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure. **Pharmacology & Therapeutics**, v.127, p.295-314, 2010.

KLUMPP, S. *et al.* Relationship between protein phosphatase type 2C activity and induction of apoptosis in cultured neuronal cells. **Neurochem Int**, v.41, p.251-9, 2002.

KLUMPP, S.; THISSEN, M.C.; KRIEGLSTEIN, J. Protein phosphatases types 2C α and 2C β in apoptosis. **Biochem Soc Trans**, v.34, p1370-5, 2006.

KOK, B.P.C.; BRINDLEY, D.N. Myocardial fatty acid metabolism and lipotoxicity in the setting of insulin resistance. **Heart Failure Clin**, v.8, p.643-61, 2012.

KONIOR, A. *et al.* Seasonal superoxide overproduction and endothelial activation in guinea-pig heart; seasonal oxidative stress in rats and humans. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.50, p.686-94.

KOTA, N.; KRISHNA, P.; POLASA, K. Alterations in antioxidant status of rats following intake of ginger through diet. **Food Chemistry**, v.106, p.991-996, 2008.

KRIEGER, M.H. *et al.* Antiatherogenic effects of S-nitroso-Nacetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. **Nitric Oxide**, v.14, p.12-20, 2006.

KRIEGLSTEIN, J. *et al.* Damage of guinea pig heart and arteries by a tioleate-enriched diet and of cultured cardiomyocytes by oleic acid. **PLoS ONE**, v.5, n.3, p.e9561, 2010.

KRIEGLSTEIN, J. *et al.* Influence of various fatty acids on the activity of protein phosphatase type 2C and apoptosis of endothelial cells and macropahges. **Eur J Pharm Sci**, v.35, p.397-403, 2008.

KRIPA RAMAN, BSc *et al.* Genetic Markers of Inflammation and Their Role in Cardiovascular Disease. **Canadian Journal of Cardiology**. V.29, p.67-74, 2013.

KRIS-ETHERTON, P.M. *et al.* Dietary stearic acid and risk of cardiovascular disease: intake, sources, digestion and absorption. **Lipids**, v.40, p.1193-200, 2005.

KRITCHEVSKY, D. History of recommendations to the public about dietary fat. **J Nutr**, v.128, p.449-52, 1998.

KUDO, I.; MURAKAMI, M. Phospholipase A₂ enzymes. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v.68, p.3-58, 2002.

KULKARNI, B.; MATTES, R. Evidence for presence of nonesterified fatty acids as potential gustatory signaling molecules in humans. **Chem. Senses**, v.38, p.119-27, 2013.

KURBEL, S.; KURBEL, B.; VCEV, A. Intestinal gases and flatulence: Possible causes of occurrence. **Medical Hypotheses**, v.67, p.235-9, 2006.

KURUSHIMA, H. *et al.* Opposite effects on cholesterol metabolism and their mechanisms induced by dietary oleic acid and palmitic acid in hamsters. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1258, p.251-6, 1995.

KZHYSHKOWSKA, J.; NEYEN, C.; GORDON, S. Role of macrophage scavenger receptors in atherosclerosis. **Immunobiology**, *In Press*, 2012.

KZHYSHKOWSKA, J.; NEYENC, C.; GORDON, S. Role of macrophage scavenger receptors in atherosclerosis. **Immunobiology**, v.217, p.492-502, 2012.

LABREUCHE, J. *et al.* Association between change in plasma triglyceride levels and risk of stroke and carotid atherosclerosis – Systematic review and meta-regression analysis. **Atherosclerosis**, v.212, p.9-15, 2010.

LANDMESSER U, HORNIG B, DREXLER H. Endothelial function. A critical determinant in atherosclerosis. **Circulation**; v.109 (Suppl III), p. III27–III33, 2004.

LE, W. et al. Long-chain acyl-CoA dehydrogenase is a key enzyme in the mitochondrial L-oxidation of unsaturated fatty acids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1485, p.121-8, 2000.

LEMIEUX, H. et al. Dietary fatty acids and oxidative stress in the heart mitochondria. **Mitochondrion**, v.11, p.97–103, 2011.

LEONARDUZZI, G. et al. Inflammation-related gene expression by lipid oxidation-derived products in the progression of atherosclerosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v.52, p.19-34, 2012.

LEVY, E. et al. Characterization of gastric lipolytic activity. **Biochimica et Biophysics Acta**, v.664, p.316-26, 1981.

LEWIN, T.M.; COLEMAN, R.A. Regulation of myocardial triacylglycerol synthesis and metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1634, p.63–75, 2003.

LI, J.M.; SHAH, A.M. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. **Am J Physiol**, v.287, r1014-30, 2004.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v.420, p.868–74, 2002.

LIND, P.M; OLSÉN, L.; LIND, L. Circulating levels of metals are related to carotid atherosclerosis in elderly. **Science of the Total Environment**, v.416, p.80-8, 2012.

LINIC, I.S. et al. Predicting carotid restenosis by comparison of plaque MCP-1 mRNA expression and serum levels. **Medical Hypotheses**, v.80, p. 26–8, 2013.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-delta delta c(t)) method. **Methods**, v.25, p.402-8, 2001.

LOCKWOOD, J.F. et al. Human intestinal monoacylglycerol acyltransferase: differential features in tissue expression and activity. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.285, p.E927-E37, 2003.

LOPEZ-HUERTAS, E. Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA e DHA) enriched milks. A review of intervention studies. **Pharmacological Research**, v.61, p.200-7, 2010.

LOTTENBERG, A.M. et al. The role of dietary fatty acids in the pathology of metabolic syndrome. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.23, p. 1027-40, 2012.

LOUALA, S. *et al.* Effects of highly purified sardine proteins on lipid peroxidation and reverse cholesterol transport in rats fed a cholesterol-rich diet. **Journal of Functional Foods**, v.3, p.321-8, 2011.

LU, G. *et al.* Oleic acid-induced mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells. A role for protein kinase C. **Circ. Res.**, v.79, p.611-8, 1996.

LYKKESFELDT, J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by somokin. **Clinica Chimica Acta**, v.380, p.50-58, 2007.

MACKAY J, MENSAH G. Atlas of heart disease and stroke. **World Health Organization (WHO)**, Geneva Press; 2004.

MACKNESS, B. *et al.* Human paraoxonase-1 overexpression inhibits atherosclerosis in a mouse model of metabolic syndrome. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.26, p.1545-50, 2006.

MADAMANCHI, N.R.; RUNGE, M.S. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. **Circ Res**, v.100, p.460-73, 2007.

MADAMANCHI, N.R.; VENDROV, A.; RUNGE, M.S. Oxidative stress and vascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.25, p.29-38, 2005.

MALONEY, E. et al. Activation of NF κ B by palmitate in endothelial cells: a key role for NADPH oxidase-derived superoxide in response to TLR4 activation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.29, p.1370-5, 2009.

MANTOVANI, A. et al. Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: a question of balance. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.29, p.1419-23, 2009.

MARSCHE, G. et al. Inflammation alters HDL composition and function: Implications for HDL-raising therapies. **Pharmacology & Therapeutics**, IN PRESS, 2013.

MASSBERG, S. et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. **J. Exp. Med**, v.196, p.887-96, 2002.

McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase, an enzyme function for erythrocyte (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v.244, p.6049-6055, 1969.

MENSINK, R.P. et al. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. **Am J Clin Nutr**, v.77, p.1146-55, 2003.

MESTAS, J.; LEY, K. Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. **Trends Cardiovasc Med**, v.18, p.228-32, 2008.

MING, M. *et al.* Effect of the Lycium barbarum polysaccharides administration on blood lipid metabolism and oxidative stress of mice fed high-fat diet in vivo. **Food Chemistry**, v.113, p.872-7, 2009.

MOONEY, D.; MCCARTHY, C.; BELTON, O. Effects of conjugated linoleic acid isomers on monocyte, macrophage and foam cell phenotype in atherosclerosis. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, v.98, p.56– 62, 2012.

MOORE, K.J.; TABAS, I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. **Cell**, v.145, p.341-55, 2011.

MOTOJIMA, K. *et al.* Repetitive postprandial hypertriglyceridemia induces monocyte adhesion to aortic endothelial cells in Goto-Kakizaki rats. **Endocrine Journal**, v.55, n.2, 373-9, 2008.

MUNZEL, T. *et al.* Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. **Ann. Med.** v.40, p.180-96, 2008.

MUSTAD, V.A. *et al.* Comparison of the effects of diets rich in stearic acid versus myristic acid and lauric acid on platelet fatty acids and excretion of thromboxane A₂ and PGI₂ metabolites in healthy young men. **Metabolism**, v.42, n.4, p.463-9, 1993.

NAGY, Z.S.; CZIMMERER, Z.; NAGY, L. Nuclear receptor mediated mechanisms of macrophage cholesterol metabolism. **Molecular and Cellular Endocrinology**, IN PRESS, 2012.

NAPPO, F. *et al.* Postprandial endothelial activation in healthy subjects and in type 2 diabetic patients: role of fat and carbohydrate meals. **J Am Coll Cardiol**, v. 39, p.1145-50, 2002.

NEVIN, K.G.; RAJAMONHA, T. Virgin coconut oil supplemented diet increases the antioxidant status in rats. **Food Chemistry**, v.99, p.260–6, 2000.

NEZAMI, N. *et al.* Atherogenic changes of low-density lipoprotein susceptibility to oxidation, and antioxidant enzymes in pulmonary tuberculosis. **Atherosclerosis**, v.217, p.268-73, 2011.

NG, W.K.; LIM, P.K.; BOEY, P.L. Dietary lipid and palm oil source affects growth, fatty acid composition and muscle α -tocopherol concentration of African catfish, *Clarias gariepinus*. **Aquaculture**, v.215, p.229-43, 2003.

NISHI, K. *et al.* Clinicopathological significance of lipid peroxidation in carotid plaques. **Atherosclerosis**, v.160, p.289-96, 2002.

OOSTERVEER, M.H. *et al.* High fat feedings induces hepatic fatty acid elongation in mice. **PLoS One**, v.4, v.6, p.e6066, 2009.

OTHANI, H. *et al.* Effects of dietary cholesterol and fatty acids on plasma cholesterol level and hepatic lipoprotein metabolism. **J. Lipid Res.**, v.31, p.1413-22, 1990.

PACHECO, Y.M. *et al.* A meal rich in oleic acid beneficially modulates postprandial sICAM-1 in normotensive and hypertensive hypertriglyceridemic subjects. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.19, p.200-5, 2008.

PAL, M. HDL therapeutics for the treatment of atherosclerosis: a brief overview of the synthetic approaches. **Tetrahedron**, v.65, p.433-7, 2009.

PAN, P.H. *et al.* Stearic acid attenuates cholestasis-induced liver injury. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.391, p.1537-42, 2010.

PANEE, J. Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) in obesity and diabetes. **Cytokine**, v.60, p.1-12, 2012.

PAPAGEORGIOU, N. *et al.* Divergent anti-inflammatory effects of different oil acute consumption on healthy individuals. **Eur J Clin Nutr**, v.65, p.514-9, 2011.

PARK, J. Y. *et al.* Oleic acid induces endothelin-1 expression through activation of protein kinase C and NF- κ B. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.303, p.891-5, 2003.

PATIL, S.; CHAN, C. Palmitic and stearic fatty acids induce Alzheimer-like hyperphosphorylation of tau in primary rat cortical neurons. **Neuroscience Letters**, v.384, p.288-93, 2005.

PELLO, O.M. *et al.* A glimpse on the phenomenon of macrophage polarization during atherosclerosis. **Immunobiology**, v.216, p.1172-76, 2011.

PÉREZ-JIMÉNEZ, F. *et al.* Olive oil and haemostasis: a review on its healthy effects. **Public Health Nutrition**, v.9, n.8A, p.1083-1088, 2006.

PÉREZ-MENDÉZ, O. *et al.* Palmitic acid in HDL is associated to low apo A-I fractional catabolic rates *in vivo*. **Clinica Chimica Acta**, v.378, p.53-8, 2007.

PIEMONTI, L. *et al.* Association between plasma monocyte chemoattractant protein-1 concentration and cardiovascular disease mortality in middle-aged diabetic and nondiabetic individuals. **Diabetes Care**, v.32, p.2105-10, 2009.

PIETZSCH, J. *et al.* In vivo evidence for increased apolipoprotein A-I catabolism in subjects with impaired glucose tolerance. **Diabetes**, v.47, p.1928-34, 1998.

PONNUSWAMY, P. *et al.* Humoral and cellular immune responses in atherosclerosis: Spotlight on B and T cells. **Vascular Pharmacology**, *IN PRESS*, 2012.

PSARROS, C. *et al.* Nanomedicine for the prevention, treatment and imaging of atherosclerosis. **Maturitas**, v.73, p.52-60, 2012.

RAMOS, S.; RAMOS, M.E.M. Dieta e risco cardiovascular: ômega 3, óleo de oliva, oleaginosas, o que é fato? **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, n.6, p.10-11, 2005.

RAMSEY, J.J. et al. Influence of mitochondrial membrane fatty acid composition on proton leak and H₂O₂ production in liver. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.140, p.99–108, 2005.

RAUCH, B.H. et al. ICAM-1 and p38 MAPK mediate fibrinogen-induced migration of human vascular smooth muscle cells. **European Journal of Pharmacology**, v.577, p.54-7, 2007.

REINBOLD, M. et al. Unsaturated fatty acids liberated from VLDL cause apoptosis in endothelial cells. **Mol Nutr food Res**, v.52, p.581-8, 2008.

RHEE, S.K. et al. Desaturation and interconversion of dietary stearic and palmitic acids in human plasma and lipoproteins. **Am J Clin Nutr**, v.65, p.451-8, 1997.

RIEK, A.E.; OH, J.; BERNAL-MIZRACHI, C. 1,25(OH)₂ vitamin D suppress macrophage migration and reverses atherogenic cholesterol metabolism in type 2 diabetic patient. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, IN PRESS, 2013.

RODRÍGUEZ-CRUZ, M. et al. Coexisting role of fasting or feeding and dietary lipids in the control of gene expression of enzymes involved in the synthesis of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. **Gene**, v.496, p.28-36, 2012.

ROSA, A.; RAPOPORT, S.I. Intracellular and extracellular-derived Ca²⁺ influence phospholipase A₂-mediated fatty acid release from brain phospholipids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1791, p.697-705, 2009.

ROSENBLAT, M. et al. Paraoxonase 1 (PON1) enhances HDL-mediated macrophage cholesterol efflux via the ABCA1 transporter in association with increased HDL binding to the cells: a possible role for lysophosphatidylcholine. **Atherosclerosis**, v.179, p.69-77, 2005.

RUMSEY, S.C. *et al.* Lipoprotein lipase-mediated uptake and degradation of low density lipoproteins by fibroblasts and macrophage. **J. Clin. Invest.**, v.90, p.1504-12, 1992.

SAHADE, V. *et al.* Obesity and postprandial lipemia in adolescents: Risk factors for cardiovascular disease. **Endocrinol Nutr.**, v.59, n.2, p.131-9, 2012

SALA-VILA, A. *et al.* Inverse association between serum phospholipid oleic acid and insulin resistance in subjects with primary dyslipidaemia. **Clinical Nutrition**, v.30, p.590-2, 2011.

SAMPATH, H.; NTAMBI, J.M. The fate and intermediary metabolism of stearic acid. **Lipids**, v.40, p.1187-91, 2005.

SANT'ANA, L.S. Mecanismos bioquímicos envolvidos na digestão, absorção e metabolismo dos ácidos graxos ômega. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v.17, n.4, p.211-6, 2004.

SCHALOSKE, R.H.; DENNIS, E.A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1761, p.1246-59, 2006.

SCHÖNFELD, P.; WOJTCZAK, L. Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. **Free Radical Biology & Medicine**, v.45, p.231-41, 2008.

SCHWARTZ, P.D.; REAVEN, P.D. Lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins, vascular inflammation, and atherosclerosis. **Biochim. Biophys. Acta** (2011), doi: 10.1016/j.bbalip. 2011.09.021.

SCWARZ, S. *et al.* Protein phosphatase type 2C α and 2C β are involved in fatty acid-induced apoptosis of neuronal and endothelial cells. **Apoptosis**, v.11, p.1111-9, 2006.

SELJESKOG, E.; HERVIG, T.; MANSOOR, M.A. A novel HPLC method for the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS): a comparison with a commercially available kit. **Clinical Biochemistry**, v.39, p.947-954, 2006.

SENEVIRATNE, A.N.; SIVAGURUNATHAN, B.; MONACO, C. Toll-like receptors and macrophage activation in atherosclerosis. **Clinica Chimica Acta**, v.413, p.3-14, 2012.

SENEVIRATNE, A.N.; SIVAGURUNATHAN, B.; MONACO, C. Toll-like receptors and macrophage activation in atherosclerosis. **Clinica Chimica Acta** v.413, p.3-14, 2012.

SEO, T. *et al.* Saturated fat-rich diet enhances selective uptake of LDL cholesteryl esters in the arterial wall. **J. Clin. Invest.**, v.115, p.2214-22, 2005.

SEO, T. *et al.* Selective uptake from LDL is stimulated by unsaturated fatty acids and modulated by cholesterol content in the plasma membrane: role of plasma membrane composition in regulating non-SR-BI-mediated selective lipid transfer. **Biochemistry**, v.41, p.7885-94, 2002.

SHEN, L.C. *et al.* Effects of Suxiao Jiuxin Pill on oxidative stress and inflammatory response in rats with experimental atherosclerosis. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, v.31, n.2, p.107-11, 2011.

SHÉRAZÈDE, B. *et al.* Reverse cholesterol transport in hypercholesterolemic rats fed different proteins and lipids origins. **Nutrition and Food Sciences**, v.39, n.2, p.128-141, 2009

SIM, K.G.; HAMMOND, J.; WILCKEN, B. Strategies for the diagnosis of mitochondrial fatty acid β -oxidation disorders. **Clinica Chimica Acta**, v.323, p.37-58, 2002.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção Da Aterosclerose. v.88, Suplemento I, 2007.

STANLEY, M.C.; RECCHIA, F.A.; LOPASCHUK, G.D. Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart. **Physiol Rev**, v.85, p.1093–1129, 2005.

STENTZ, F.B.; KITABCHI, A.E. Palmitic acid-induced activation of human T-lymphocytes and aortic endothelial cells with production of insulin receptors, reactive oxygen species, cytokines, and lipid peroxidation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.346, p.721-6.2006.

STEWART, B.W.; NAGARAJAN, S. Recombinant CD36 inhibits oxLDL-induced ICAM-1-dependent monocyte adhesion. **Molecular Immunology**, v.43, p.255–67, 2006.

STEWART, J.E. et al. Oral sensitivity to fatty acids, food consumption and BMI in human subjects. **Br J Nutr**, v.104, n.1, p.145-52, 2010.

STORCH, J.; THUMSER, A.E.A.The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1486, p.28-44, 2000.

SUDHEENDRAN, S.; CHANG, C.C.; DECKELBAUM, R.J. N-3 vs. saturated fatty acids: Effects on the arterial wall. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.82, p.205-9, 2010.

SUGANAMI, T. et al. Role of the toll-like receptor4/NFκB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. **Arteriosclr Thromb Vasc Biol**, v.27, p.84-91, 2007.

SUGANO, M.; IMAIZUMI, K. Effect of different saturated fatty acids as interesterified triacylglycerols on lipid metabolism in rats and hamsters. **J. Nutr. Biochem.**, v.6, p.195-200, 1995.

SUN, L. *et al.* Serum palmitic acid-oleic acid ratio and the risk of coronary artery disease: a case-control study. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.22, p.311-17, 2011.

TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. **Physiol. Rev.**, v.86, p.515-581, 2006.

THIJSSSEN, M.A.; MENSINK, R.P. Small differences in the effects of stearic acid, oleic acid, and linoleic acid on the serum lipoprotein profile of humans. **Am J Clin Nutr**, v.82, p.510-6, 2005.

THIJSSSEN, M.A.M.A.; HORNSTRA, G.; MENSINK, R.P. Stearic, oleic, and linoleic acids have comparable effects on markers of thrombotic tendency in healthy human subjects. **J. Nutr.**, v.135, p.2805–11, 2005.

THOLSTRUP, T.; TENG, K-T.; RAFF, M. Dietary cocoa butter or refined olive oil does not alter postprandial hsCRP and IL-6 concentrations in health human. **Lipids**, v.46, p.365-70, 2011.

TOUYZ, R.M. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension – What is the clinical significance? **Hypertension**, v.44, p.248-52, 2004.

TRETJAKOV, P. *et al.* Relation of inflammatory chemokines to insulin resistance and hypoadiponectinemia in coronary artery disease patients. **Eur J Intern Med**, v.20, p.712-7, 2009.

TUOMASJUKKA, S.S.; VIITANEN, M.H.; KALLIO, H.P. Regio-distribution of stearic acid is not conserved in chylomicrons after ingestion of randomized stearic acid-rich fat in a single meal. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.20, p.909-15, 2009.

TURHAN H et al. Increased plasma soluble adhesion molecules; ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin levels in patients with slow coronary flow. **International Journal of Cardiology**, v.108, p.224 – 30, 2006.

TURPEINEN, A.M. *et al.* Similar Effects of Diets Rich in Stearic Acid or *trans*-Fatty Acids on Platelet Function and Endothelial Prostacyclin Production in Humans. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.18, p.316-22, 1998.

UAUY, R.; VALENZUELA, A. Marine oils: the health benefits of n-3 fatty acids. **Nutrition**, v.16, n.7/8, p.680-684.

URPI-SARDA M. et al. Virgin olive oil and nuts as key foods of the Mediterranean diet effects on inflammatory biomarkers related to atherosclerosis. **Pharmacological Research**, v.65, p. 577– 83, 2012.

URPI-SARDA, M. *et al.* Virgin olive oil and nuts as key foods of the Mediterranean Diet effects on inflammatory biomarkers related to atherosclerosis. **Pharmacological Research**, v.65, n.6, p.577-83, 2012.

VALENZUELA, A.; DELPLANQUE, B.; TAVELLA, M. Stearic acid: a possible substitute for trans fatty acids from industrial origin. **Grasas y Aceites**, v.62, n.2, p.131-8, 2011.

VALKO, M. *et al.* Free-radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v.160, n.1, p.1-40, 2006.

VALLIM, T.; SALTER, A.M. Regulation of hepatic gene expression by saturated fatty acids. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.82, p.211-8, 2010.

VALLVÉ, J-C, et al. Unsaturated fatty acids and their oxidation products stimulate CD36 gene expression in human macrophages. **Atherosclerosis**, v.164, p.45-56, 2000.

VASSILIOU, E.K. *et al.* Oleic acid and peanut oil high in oleic acid reverse the inhibitory effect of insulin production of the inflammatory cytokine tnf-alpha both in vitro and in vivo system. **Lipids Health Dis**, v.8, p.8-25, 2009.

VASUDEVAN, A.R; GARBER, A.J. Diabetic dyslipidemia and the heart. **Heart Failure Clin**, v.2, p.37-52, 2006.

VERNA L, GANDA C, STEMERMAN MB. In vivo low-density lipoprotein exposure induces intercellular adhesion molecule-1 and vascular celladhesion molecule-1 correlated with activator protein-1 expression. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.26, p.1344 –1349, 2006.

VISSER, W.F. et al. Metabolite transport across the peroxisomal membrane. **Biocehm J.**, v. 401, p.365-75, 2007.

VRIES-SEIMON, T. *et al.* Cholesterol-induced macrophage apoptosis requires ER stress pathways and engagement of the type A scavenger receptor. **The Journal of Cell Biology**, v.171, n.1, p.61-73, 2005.

WANDERS, R.J.; WATERHAM, H.R. Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. **Annu Rev Biochem**, v.75, p.295-332, 2006.

WANDERS, R.J.A. Peroxisomes, lipid metabolism and peroxisomal disorders. **Molecular Genetics and Metabolism**, v.83, p.16-27, 2004.

WANG, J.N; SHI, N.; CHEN, S.Y. Manganese superoxide dismutase inhibits neointima formation through attenuation of migration and proliferation of vascular smooth muscle cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v.52, p.173-81, 2012.

WANG,Z.J. *et al.* Neuroprotective effect of the stearic acid against oxidative stress via phosphatidylinositol 3-kinase pathway. **Chemico-Biological Interactions**, v.160, p.80-7, 2006.

WATSON, A. *et al.* Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase: inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. **J Clin Invest**, v.96, p.2882-91, 1995.

WEISMANN, D.; BINDER, C.J. The innate immune response to products of phospholipid peroxidation. **Biochimica et Biophysica Acta**, *IN PRESS*, 2012.

WESTIN, M.A.; HUNT, M.C.; ALEXSON, S.E. The identification of a succinyl-CoA thioesterase suggests a novel pathway for succinate production in peroxisomes. **J Biol Chem**, v.280, p.38125–32, 2005.

WIJENDRAN, V. *et al.* Dietary trans-18:1 raises plasma triglycerides and VLDL cholesterol when replacing either 16:0 or 18:0 in gerbils. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.14, p. 584–90, 2003.

WINTERBOURN, C.C.; GUTTERIDGE, J.M.C.; HALLIWELL, B. Doxorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O₂. **Journal of Free Radicals in Biology & Medicine**, v.1, n.1, p.43-49, 1985.

WOODSIDE, J.V.; KROMHOUT, D. Fatty acids and CHD. **Proc Nutr Soc**, v.64, n.4, p.554-64, 2005.

World Health Organization, Cardiovascular Diseases,
http://www.who.int/topics/cardiovascular_diseases/en/

WUNG, B.S. *et al.* Resveratrol suppresses IL-6-induced ICAM-1 gene expression in endothelial cells: Effects on the inhibition of STAT3 phosphorylation. **Life Sciences**, v.78, p.389 – 97, 2005.

XIAO, X. et al. Pancreatic lipase-related protein-2 (PLRP2) can contribute to dietary fat digestion in human newborns. **The Journal of Biological Chemistry**, v.286, n.30, p.26353-63, 2011.

XIE, S. et al. TR4 nuclear receptor functions as a fatty acid sensor to modulate CD36 expression and foam cell formation. **PNA**, v.106, n.32, p.13353–58, 2009.

YEN, C-L.E. The triacylglycerol synthesis enzyme DGAT1 also catalyzes the synthesis of diacylglycerols, waxes and retinyl esters. **J. Lipid Res.**, v.46, p.1502-11, 2005.

YOUSSEF-ELABD, E.M. et al. Acute and chronic saturated fatty acid treatment as a key instigator of the TLR mediated inflammatory response in human adipose tissue, in vitro. **J Nutr Biochem**, v.23, n.1, p.39-50, 2012.

YU, J. et al. Lipoprotein lipase activator ameliorates the severity of dietary steatohepatitis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.356, n.1, p.53-9, 2007.

YU, K.; MAMO, J. Chylomicron-remnant-induced foam cell formation and cytotoxic: a possible mechanism of cell death in atherosclerosis. **Clin. Sci.** v.98, p.183-92, 2000.

ZAMORA, C. et al. Functional consequences of CD36 downregulation by TLR signals. **Cytokine**, v.60, p.257–65, 2012.

ZHANG, F. et al. Inhibition of TNF- α induced ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression by selenium. **Atherosclerosis**, v.161, n.2, p.381-6, 2002.

ZHANG, L. et al. Role of fatty acid uptake and fatty acid β -oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1801, p.1-22, 2010.

ZHANG, T. et al. Chronic unpredictable stress accelerates atherosclerosis through promoting inflammation in apolipoprotein E knockout mice. **Thrombosis Research**, v.126, p.386-92, 2010.

ANEXO 1

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão Interna de Biossegurança

Of.CIBio/0822010/FCF

São Paulo, 25 de novembro de 2010

Senhor Professor,

Conforme parecer favorável do relator, e em reunião da Comissão Interna de Biossegurança da Faculdade de Ciências Farmacêuticas realizada em 24 de novembro p.p., informo a Vossa Senhoria que foi aprovado o Projeto "Avaliação comparativa do efeito dos ácidos graxos palmítico, esteárico e trans (elaídico) sobre marcadores aterogênicos", sob sua coordenação.

Lembramos que, quando da elaboração do Relatório Anual a ser encaminhado à Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, esta Comissão solicitará a V.Sa. comprovante de participação em treinamentos de Biossegurança de sua equipe para manutenção do credenciamento.

Atenciosamente,

Prof. Dr. MARIO HIROYUKI HIRATA
Presidente da CIBio

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. JORGE MANCINI FILHO

Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF-USP

NESTA

ANEXO 2

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/20/2011

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto **"Avaliação comparativa do efeito dos ácidos graxos palmítico, esteárico e trans (ácido eláidico) sobre marcadores aterogênicos"** (Protocolo CEUA/FCF/290), de responsabilidade da pesquisadora **Claudimar de Jesus Oliveira** sob a orientação do Prof. Dr. Jorge Mancini Filho, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 14 de março de 2011.

São Paulo, 15 de março de 2011.

Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP